



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ**  
**CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE**  
**FACULDADE DE MEDICINA**  
**DEPARTAMENTO DE FISIOLOGIA E FARMACOLOGIA**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FARMACOLOGIA**

**EFEITOS COMPORTAMENTAIS, METABÓLICOS E CIRCUITOS NEURONAIS DO  
AGONISTA DE GLP-1 LIRAGLUTIDA, NO MODELO DE DEPRESSÃO INDUZIDA POR  
ESTRESSE CRÔNICO IMPREVISÍVEL**

**CHARLIENE FREIRE XAVIER VIEIRA**

**FORTALEZA**

**2020**

CHARLIENE FREIRE XAVIER VIEIRA

**EFEITOS COMPORTAMENTAIS, METABÓLICOS E CIRCUITOS NEURONAIS DO  
AGONISTA DE GLP-1 LIRAGLUTIDA, NO MODELO DE DEPRESSÃO INDUZIDA POR  
ESTRESSE CRÔNICO IMPREVISÍVEL**

Tese de doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Farmacologia do Departamento de Fisiologia e Farmacologia da Faculdade de Medicina da Universidade Federal do Ceará como parte dos requisitos para a obtenção do título de Doutora em Farmacologia. Área de concentração: Neurofarmacologia.

Orientadora: Prof<sup>a</sup> Dra Silvânia Maria Mendes Vasconcelos

FORTALEZA

2020

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação  
Universidade Federal do Ceará  
Biblioteca Universitária

Gerada automaticamente pelo módulo Catalog, mediante os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

---

- V714e Vieira, Charliene Freire Xavier Vieira.  
Efeitos Comportamentais, Metabólicos e Circuitos Neurais do Agonista de GLP-1  
Liraglutida, em Modelo de Depressão Induzida Por Estresse Crônico Imprevisível /  
Charliene Freire Xavier Vieira Vieira. – 2022.  
121 f. : il. color.

Tese (doutorado) – Universidade Federal do Ceará, Faculdade de Medicina, Programa  
de Pós-Graduação em Farmacologia, Fortaleza, 2022.

Orientação: Profa. Dra. Silvânia Maria Mendes Vasconcelos.

1. Depressão. 2. Liraglutida. I. Título.

CDD 615.1

---

CHARLIENE FREIRE XAVIER VIEIRA

**EFEITOS COMPORTAMENTAIS, METABÓLICOS E CIRCUITOS NEURONAIS DO  
AGONISTA DE GLP-1 LIRAGLUTIDA, NO MODELO DE DEPRESSÃO INDUZIDA POR  
ESTRESSE CRÔNICO IMPREVISÍVEL**

Tese de doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Farmacologia do Departamento de Fisiologia e Farmacologia para a obtenção do título de Doutora em Farmacologia. Área de concentração: Neurofarmacologia.

Orientadora: Prof<sup>a</sup> Dra Silvânia Maria Mendes Vasconcelos

Aprovada em: \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_

**BANCA EXAMINADORA**

---

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup> Silvânia Maria Mendes Vasconcelos  
Universidade Federal do Ceará (UFC)

---

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup> Danielle Macêdo Gaspar  
Universidade Federal do Ceará (UFC)

---

Prof<sup>a</sup>. Dr Carlos Clayton Torres Aguiar  
Universidade de Ciências Farmacêuticas (Unifor)

---

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup> Rita Neuma Dantas Cavalcante de Abreu  
Universidade de Fortaleza (Unifor)

---

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup> Elaine Cristina Gavioli  
Universidade Federal do Rio Grande do Norte (UFRN)

**FORTALEZA**

2020

**A Deus** toda Glória!

Aos meus queridos **pais Maria do Socorro e José Xavier**, amado **marido Orlando Vieira e filhos Sarah e Isac** Terceiro, minha eterna gratidão!

## AGRADECIMENTOS

A Deus, toda honra, toda Glória e todo louvor! Obrigada Senhor, porque Tu és soberano em minha vida e pela graça do Espírito Santo me sondas, me conheces e me sustentas pela mão. Sem Ti, nada seria possível de existir e de realizar.

À Profa. Dra. Silvânia Maria Mendes de Vasconcelos, minha orientadora, por ter sido sempre tão generosa e acolhedora no Laboratório de Neuropsicofarmacologia. Agradeço pela maestria na orientação deste trabalho e pela paciência dispensada a mim. Minha admiração pelo seu exemplo de pessoa bondosa e profissional exemplar.

Aos amigos e companheiros de todas as horas Adriano Filho, Tatiana Queiroz, Kátia Cilene, Talita Matias e Lucas Teixeira meus sinceros agradecimentos. Obrigada pelo apoio sempre presente nos momentos difíceis e alegres que passamos juntos. À professora Maria de Jesus Ferreira Marinho, obrigada pelos conselhos sempre valorosos e incentivadores.

Aos amigos e companheiros de Laboratório pela amizade e apoio (Michelle, Paloma, Larissa, Polyana, Natássia, Dino, Germana, Caren, Naiara, Manuel, Ingridy, Cid), pois sem a contribuição de vocês tudo se tornaria mais difícil.

Agradeço especialmente a Morgana, aluna de Enfermagem e iniciação científica. Obrigada por estar disponível sempre que precisei sem colocar obstáculos.

Aos profissionais da equipe de apoio técnico e serviços gerais que tanto se empenham em realizar o seu trabalho, sendo indispensáveis, e em especial à Vilanir pelo apoio e amizade.

A todos os professores do Programa de Pós-graduação em Farmacologia, pelos ensinamentos.

Aos animais por viabilizarem não apenas o meu estudo, mas o aprimoramento do conhecimento científico e da qualidade de vida.

A todos que direta ou indiretamente contribuíram para a conclusão deste trabalho.

À Capes pelo apoio financeiro à pesquisa científica, tecnológica e à formação de recursos humanos.

**“A morte não é a maior perda da vida. A maior perda da vida é o que morre dentro de nós enquanto vivemos...”**

**(Pablo Picasso)**

## RESUMO

A Depressão é um transtorno afetivo caracterizado por sentimento de tristeza, indiferença e desânimo, sendo uma das desordens psiquiátricas mais comuns que afeta a população em algum momento da vida e atinge 322 milhões de pessoas no mundo (OMS, 2018). A Liraglutida (LIRA) é um fármaco utilizado para tratar diabetes melitus e tem demonstrado ação neuroprotetora e indutora da neurogênese. O presente estudo foi proposto para avaliar os efeitos comportamentais, metabólicos e neuroquímicos da administração repetida da LIRA, um agonista de GLP-1, em modelo de depressão induzida por estresse crônico imprevisível (ECI) que pode produzir efeito similar a depressão clínica. Foram utilizados camundongos *Swiss* fêmeas (25-30g) submetidos a 21 dias de ECI, sendo adicionado LIRA (120 ou 240 µg/Kg, via subcutânea) ou Fluoxetina (10 mg/Kg, via oral) do 15<sup>o</sup> ao 21<sup>o</sup> dias de tratamento. No 22<sup>o</sup> dia os animais foram submetidos aos testes comportamentais de nado forçado, splash teste, campo aberto, labirinto em cruz elevada, reconhecimento do objeto novo, esquiva passiva, labirinto em Y. Após os testes, os camundongos foram eutanasiados e dissecadas as adrenais e áreas do córtex pré-frontal (CF) hipocampo (HC) para realização da avaliação de alterações metabólicas (peso das adrenais, peso dos animais e glicemia) e neuroquímicas (estresse oxidativo, Fator Neurotrófico Derivado do Cérebro-BDNF, níveis de corticosterona, histologia do córtex adrenal, proteína ácida fibrilar glial-GFAP, Golgi-Cox, sinaptossomas e receptor de glicocorticoides). Os resultados comportamentais demonstraram que o ECI diminuiu o percentual de entrada nos braços abertos no teste de labirinto de cruz elevada e aumentou o tempo de imobilidade no nado forçado. Estes efeitos foram revertidos pela LIRA, na maior dose. Com relação aos resultados de metabolismo foi observado que os animais ECI apresentaram uma redução do ganho de peso em 50% em relação ao grupo controle, sendo revertido pelas duas doses de LIRA. Quanto ao estudo do estresse oxidativo foi observado uma diminuição dos níveis de GSH somente no HC, contudo a LIRA ou FXT não foram capazes de revertê-lo. Uma diminuição nas concentrações do BDNF foi observada no HC, sendo esse efeito revertido pela LIRA. Um aumento na atividade de GFAP foi observado nas três áreas hipocâmpais avaliadas (CA1, CA3 e giro denteado). Entretanto nenhum efeito foi observado após a administração da LIRA ou FXT nos níveis de GFAP. Os animais do ECI apresentaram uma redução da densidade sináptica e no número de receptores de glicocorticoides não sendo revertido pelo tratamento com LIRA. Em conclusão, os nossos resultados mostraram que os animais submetidos ao ECI apresentaram comportamentos tipo ansiogênicos e depressivos. Sendo esses efeitos revertido pela LIRA. A camada cortical da adrenal revelou hipertrofia que foi revertida pela LIRA na maior dose. Embora tenha existido uma relação entre estudo comportamental, aumento do estresse oxidativo e diminuição dos níveis de BDNF nos animais ECI, essa relação não foi diretamente proporcional ao estresse oxidativo nos animais submetidos ao tratamento com LIRA. O modelo de ECI aumentou a expressão de GFAP e a densidade dos espinhos dendríticos hipocâmpais e aumentou a intensidade de receptores de glicocorticoides.

Palavras-chave: depressão; estresse crônico imprevisível; Liraglutida, circuitos neuronais.



## ABSTRACT

Metabolic behavioral effects and neuronal circuitry of GLP-1 agonist liraglutide in the unpredictable chronic stress induced depression model

Depression is an affective disorder characterized by feelings of sadness, indifference and discouragement, being one of the most common psychiatric disorders that affects the population at some point in life and affects 322 million people in the world. Liraglutide (LIRA) is a drug used to treat diabetes mellitus and has demonstrated neuroprotective action and induction of neurogenesis. The present study was proposed to evaluate the behavioral, metabolic and neurochemical effects of repeated administration of LIRA, a GLP-1 agonist, in an unpredictable chronic stress-induced depression (ECI) model that may produce an effect similar to clinical depression. Female Swiss mice (25-30g) submitted to 21 days of ECI were used, being added either LIRA (120 or 240 µg / kg subcutaneously) or FXT (10 mg / kg orally) from the 15th to 21st days of treatment. On the 22nd day the animals were submitted to forced swim test, splash test, open field, elevated maze, new object recognition, passive avoidance, Y-maze, behavioral tests. After the tests, the mice were euthanized and the adrenal and areas of the prefrontal cortex (CF) hippocampus (HC) were dissected to evaluate metabolic (adrenal weight, animal weight and glycemia) and neurochemical (oxidative stress, Brain-Derived Neurotrophic Factor-BDNF, corticosterone levels, adrenal cortex histology, glial fibrillary acid protein-GFAP, Golgi-Cox, synaptosomes and glucocorticoid receptor). The behavioral results showed that the ECI decreased the open arms entry percentage in the elevated cross maze test and increased the forced swimming immobility time. These effects were reversed by LIRA at the highest dose. Regarding the metabolism results it was observed that the ECI animals showed a 50% reduction in weight gain compared to the control group, being reversed by the two doses of LIRA. Regarding the study of oxidative stress, a decrease in GSH levels was observed only in HC, however LIRA or FXT were not able to reverse it. A decrease in BDNF concentrations was observed in HC and this effect was reversed by LIRA. An increase in GFAP activity was observed in the three hippocampal areas evaluated (CA1, CA3 and dentate gyrus). However no effect was observed after administration of LIRA or FXT on GFAP levels. ECI animals showed a reduction in synaptic density and in the number of glucocorticoid receptors not being reversed by treatment with LIRA. In conclusion, our results showed that animals undergoing ECI showed anxiogenic and depressive behaviors. These effects being reversed by LIRA. The adrenal cortical layer revealed hypertrophy that was reversed by the LIRA at the highest dose. Although there was a relationship between behavioral study, increased oxidative stress and decreased BDNF levels in ECI animals, this relationship was not directly proportional to oxidative stress in animals undergoing LIRA treatment. The ECI model increased GFAP expression and density of hippocampal dendritic spines and increased glucocorticoid receptor intensity.

Keywords: depression; unpredictable chronic stress; Liraglutide, neuronal circuits.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1	- Mecanismos fisiopatológicos da depressão .....	20
Figura 2	- Áreas cerebrais envolvidas na depressão.....	23
Figura 3	- Eixo hipotálamo-hipófise-adrenal.....	26
Figura 4	- Representação morfológica dos espinhos dendríticos.....	27
Figura 5	- A via neural da ação do GLP-1.....	32
Figura 6	- Fórmula estrutural da Liraglutida (Victoza).....	33
Figura 7	- Fluxograma de tratamento.....	39
Figura 8	- Cronograma de indução de depressão por ECI.....	41
Figura 9	- Teste de nado forçado. ....	41
Figura 10	- Teste de borrifagem de sacarose (splash test).....	42
Figura 11	- Tempo de campo aberto.....	43
Figura 12	- Teste de labirinto em cruz elevado (plus maze).....	44
Figura 13	- Teste de reconhecimento de objeto novo.....	44
Figura 14	- Teste do esquivo passiva .....	45
Figura 15	- Teste de labirinto em Y (Y-maze).....	46
Figura 16	- Alteração do tempo de imobilidade e climbing no teste de nado forçado nos animais submetidos ao modelo de depressão induzida pelo ECI e submetidos ao tratamento com LIRA ou FXT.	54
Figura 17	- Alteração do auto cuidado pelo teste de borrifagem de sacarose (splash test) dos animais submetidos ao modelo de depressão induzida pelo ECI e submetidos ao tratamento com LIRA ou FXT.	56
Figura 18	- Alteração da atividade locomotora, grooming e rearing em campo aberto nos animais submetidos ao modelo de depressão induzida pelo ECI e submetidos ao tratamento com LIRA ou FXT.	58
Figura 19	- Alteração do percentual do tempo de permanência nos braços abertos, % de entrada nos braços abertos e número total de entradas no teste de plus maze nos animais submetidos ao modelo de depressão induzida pelo ECI e submetidos ao tratamento com LIRA ou FXT.	60
Figura 20	- Alteração do tempo de imobilidade e <i>climbing</i> do teste de nado forçado nos animais submetidos ao modelo de depressão induzida pelo ECI e submetidos ao tratamento com LIRA ou FXT.	62
Figura 21	- Alteração de memória operacional no teste de labirinto em Y em animais submetidos ao modelo de depressão pelo ECI e submetidos ao tratamento com LIRA ou FXT.	63
Figura 22	- Alteração de memória operacional no teste de labirinto em Y em animais	64

	submetidos ao modelo de depressão induzida por ECI e submetidos ao tratamento com LIRA ou FXT.	
Figura 23	Glicemia capilar dos animais submetidos ao modelo de depressão induzida por ECI e submetidos ao tratamento com LIRA ou FXT.	65
Figura 24	Peso das adrenais direita 23A e esquerda 23B respectivamente dos animais submetidos ao modelo de depressão induzida pelo ECI e tratados com LIRA ou FXT.	66
Figura 25	Avaliação de peso dos animais submetidos ao modelo de depressão induzida pelo ECI e tratados com LIRA ou FXT.	68
Figura 26	Expressão de glutathiona reduzida (GSH) no córtex pré-frontal 25A e hipocampo 25B dos animais submetidos ao modelo de depressão induzida pelo ECI e tratados com LIRA ou FXT.	69
Figura 27	Determinação de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico no córtex pré-frontal 26A e hipocampo 26B dos animais submetidos ao modelo de depressão induzida pelo ECI e tratados com LIRA ou FXT.	71
Figura 28	Expressão dos níveis de nitrito no córtex pré-frontal 27A e hipocampo 27B dos animais submetidos ao modelo de depressão induzida pelo ECI e tratados com LIRA ou FXT.	73
Figura 29	Concentrações dos níveis de BDNF em área cerebral do hipocampo dos animais submetidos ao modelo de depressão induzida pelo ECI e tratados com LIRA ou FXT.	75
Figura 30	Concentrações dos níveis séricos de Corticosterona em área cerebral do hipocampo dos animais submetidos ao modelo de depressão induzida pelo ECI e tratados com LIRA ou FXT.	66
Figura 31	Histologia das adrenais por eosina/hematoxilina	77
Figura 32	Proteína Glial Fibrilar Ácida – GFAP	79
Figura 33	Morfologia e densidade dos espinhos dendríticos	86
Figura 34	Sinaptossomas MTT	87
Figura 35	Receptor de Glicocorticóides	88

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ACTH	Hormônio adrenocorticotrófico
ADTs	Antidepressivos tricíclicos
APA	Associação de Psiquiatria Americana
AKT	Proteína quinase B
Arg	Arginina
BDNF	Fator neurotrófico derivado do cérebro
CEUA	Comissão de ética no uso de animais
Capex	Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior
CE	Corpo estriado
CF	Córtex pré-frontal
cm	Centímetro
CNPq	Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico
Col	Colaboradores
CRH	Hormônio liberador de corticotrofina
CTL	Controle
DA	Dopamina
DM	Diabetes mellitus
DM2	Diabetes mellitus tipo 2
DPP-4	Dipeptidil-peptidase 4
DSM	Manual Diagnóstico e Estatístico de Transtornos Mentais
ECI	Estresse crônico imprevisível
EROs	Espécies reativas de oxigênio
Fig	Figura
FXT	Fluoxetina
GABA	Ácido gamaaminobutírico
GD	Giro Denteado
GFAP	Proteína Glial Fibrilar Ácida
GLP-1	Peptídeo semelhante a glucagon 1
GLP-1R	Receptor de peptídeo semelhante a glucagon 1
GSH	Glutathiona reduzida

HC	Hipocampo
HHA	Eixo hipotálamo-hipófise-adrenal
IMAO	Inibidores da monoaminaoxidase
ISRSs	Inibidores da recaptção de serotonina
ISRSNs	Inibidores da recaptção de serotonina e noradrenalina
LIRA	Liraglutida
Lys	Lisina
mA	Miliampere
MAO	Monoaminaoxidase
MAOA	Monoaminaoxidase A
MAOB	Monoaminaoxidase B
MD	Diferença de média
MDA	Malondialdeído
NA	Noradrenalina
NO	Óxido nítrico
NO <sub>2</sub>	Nitrito
NO <sub>3</sub>	Nitrato
OMS	Organização Mundial da Saúde
ONU	Organização das Nações Unidas
PNS	Pesquisa Nacional de Saúde
RGs	Receptores de glicocorticóides
RMs	Receptores de mineralocorticoides
s.c.	Subcutâneo
5-HT	Hidroxitriptamina
SNC	Sistema nervoso central
TBARS	Substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico
TDM	Transtorno depressivo maior
UFC	Universidade Federal do Ceará
v.o.	Via oral

## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO</b>	14
<b>1.1 Contextualização histórica da depressão</b>	14
<b>1.2 Epidemiologia da depressão</b>	16
<b>1.3 Fisiopatologia da depressão</b>	19
<b>1.3.1 Áreas cerebrais envolvidas na depressão</b>	22
<b>1.3.2 Contribuição do estresse na base da etiologia da depressão</b>	23
<b>1.3.3 Estresse crônico imprevisível</b>	24
<b>1.3.4 Disfunção do eixo hipotálamo-hipófise-adrenal</b>	25
<b>1.3.5 Circuitos neuronais</b>	27
<b>1.4 Tratamento farmacológico e não farmacológico da depressão</b>	28
<b>1.4.1 Inibidores da monoaminoxidase</b>	29
<b>1.4.2 Antidepressivos tricíclicos</b>	29
<b>1.4.3 Inibidores seletivos da recaptção de serotonina</b>	30
<b>1.4.4 Inibidores seletivos da recaptção de serotonina e noradrenalina</b>	30
<b>1.4.5 Outros antidepressivos</b>	31
<b>1.5 Sistema GLP-1 e incretinomimético</b>	31
<b>1.5.1 Liraglutida</b>	32
<b>2. RELEVÂNCIA E JUSTIFICATIVA</b>	35
<b>3. OBJETIVOS</b>	37
<b>3.1 Objetivo Geral</b>	37
<b>3.2 Objetivos Específicos</b>	37
<b>4 MATERIAIS E MÉTODOS</b>	38
<b>4.1 Animais</b>	38
<b>4.2 Drogas</b>	38
<b>4.2.1 Liraglutida</b>	38
<b>4.2.2 Fluoxetina</b>	38
<b>4.3 Desenho experimental</b>	39
<b>4.4 Indução de depressão por estresse crônico imprevisível</b>	40
<b>4.5 Testes comportamentais</b>	41
<b>4.6 Parâmetros metabólicos</b>	46
<b>4.7 Testes neuroquímicos</b>	47

<b>4.8 Determinação do Fator Neurotrófico Derivado do Cérebro (BDNF)</b>	48
<b>4.9 Determinação dos níveis séricos de corticosterona</b>	48
<b>4.10 Histologia das adrenais por eosina/hematoxilina</b>	49
<b>4.11 Proteína glial fibrilar ácida – GFAP</b>	49
<b>4.12 Coloração de Golgi-Cox</b>	50
<b>4.13 Sinaptossomas MTT</b>	51
<b>4.14 Receptor de Glicocorticóides - RG</b>	52
<b>4.15 Análise estatística</b>	53
<b>5 RESULTADOS</b>	54
<b>5.1 Avaliação Comportamental</b>	54
<b>5.2 Avaliação da glicemia, peso das adrenais e peso dos animais</b>	66
<b>5.3 Avaliação Neuroquímica</b>	69
<i>5.3.1 Efeitos de LIRA e FXT sobre as concentrações de glutatona reduzida em áreas cerebrais de camundongos submetidos a ECI.</i>	69
<i>5.3.2 Efeitos de LIRA e FXT sobre os níveis de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) em áreas cerebrais de camundongos submetidos a ECI.</i>	71
<i>5.3.3 Efeitos de LIRA e FXT sobre as concentrações de nitrito em áreas cerebrais de camundongos submetidos a ECI.</i>	73
<i>5.3.4 Efeitos de LIRA e FXT sobre as concentrações de BDNF em áreas cerebrais de camundongos submetidos a ECI.</i>	75
<i>5.3.5 Efeitos de LIRA e FXT sobre as concentrações de corticosterona sérica de camundongos submetidos a ECI.</i>	76
<i>5.3.6 Histologia das adrenais</i>	77
<i>5.3.7 Proteína ácida fibrilar glial – GFAP</i>	79
<i>5.3.8 Golgi-cox</i>	86
<i>5.3.9 Viabilidade dos sinaptossomas-MTT</i>	87
<i>5.3.10 Receptor de Glicocorticóides</i>	88
<b>6. DISCUSSÃO</b>	95
<b>7. CONCLUSÃO</b>	107
<b>REFERÊNCIAS</b>	108

## 1. INTRODUÇÃO

### 1.1 Contextualização histórica da depressão

O termo melancolia surgiu em meados de 1680 para denominar o estado de desânimo ou perda de interesse. As crenças mágicas e supersticiosas declinaram, e as alterações de humor e melancolia deram lugar ao termo depressão, surgido no início do século XVII, assim como o entendimento dos transtornos mentais (ROUSSEAU, 2000).

Hipócrates entendia que a doença era manifestação do desequilíbrio entre quatro fluidos: bile, fleugma, sangue e bile negra. Então, desenvolveu seu modelo dos quatro humores: colérico, fleugmático, sanguíneo e melancólico, respectivamente, explicando a regulação das emoções, descrevendo e nomeando a melancolia, onde do grego "melas" significa negro, e "kholé", bile. A intoxicação do cérebro pela bile negra gerava melancolia e um quadro de medo, tristeza, falta de ânimo, inquietação, falta de apetite que perduravam por longo período (CORDÁS, 2002). Aristóteles corroborou com o modelo de Hipócrates e afirmava que o excesso de bile negra resultava em estados graves de doença mental (RADDEN, 2000).

Com a queda do Império Romano, século V, e o fim da Antiguidade, veio a Idade Média, e surgiu uma visão religiosa sobre os transtornos mentais, e a acídia (melancolia) foi incluída entre os sete pecados capitais. A penitência era atenuada até surgir a Inquisição da Igreja Católica em 1233 que condenava, entre outros, doentes mentais. Enquanto isso, teorias foram sendo formadas como a de Avicenna (980-1037), que postulava sinais e sintomas da melancolia relacionados a presença anormal de bile negra, com sinais de desconforto físico até desequilíbrios mentais. Ishaq Ibn Imran, médico árabe, também contribuiu nesse período e acrescentou sinais e sintomas como choro, desânimo, distúrbios de sono, imobilidade e risco de suicídio. Ainda na Idade Média, a freira alemã Hildegard (1098-1179) abordou o assunto e apontou melancolia como causa para doenças mentais e modos diferentes da manifestação entre homens e mulheres (RADDEN, 2000).

Com o advento da Idade Moderna, século XV, surge a ciência moderna. O italiano Marsílio Ficino (1433-1499) apresenta sua teoria, baseado em Aristóteles e relaciona melancolia, astrologia, e ainda melancolia com genialidade e brilhantismo. Posteriormente, o psiquiatra Robert Burton (1577-1640) diferencia melancolia da loucura e



encontrava divergências em sua etiologia e afirmava que nenhum homem estaria livre da mesma (RADDEEN, 2000; NICOL, 1948).

Também contribuíram Tereza de Ávila (1515-1582) que distinguiu melancolia e estados mentais relacionados e Timothie Bright (1550-1615) que teve uma das primeiras publicações sobre transtornos mentais baseada em conceitos médicos. O médico Hermann Boerhaave (1668-1738) substituiu a teoria dos humores para o campo da medicina. William Cullen (1710-1790), descrevia a melancolia como insanidade parcial causada por torpor na atividade do sistema nervoso. Enfim, o termo depressão emergiu e permaneceu (LAWLOR, 2012).

Em 1827, Johann Christian August Heinroth (1773-1842), então professor alemão de psiquiatria, mostrou sua visão holística sobre mente e corpo e definiu o termo psicossomático. Na primeira metade do século XIX, os franceses Philippe Pinel (1745-1826) e Jean-Etienne Dominique Esquirol (1772-1840) contribuíram com publicações influenciando pesquisadores no assunto. Esquirol, discípulo de Pinel, altera o conceito de melancolia para uma perturbação das emoções e não do intelecto (LAWLOR, 2012).

Um dos primeiros a explicar biologicamente e classificar a depressão foi Emil Kraepelin (1856-1926) atribuindo a etiologia da doença a fatores hereditários, enfatizando uma base bioquímica interna e que as mulheres eram mais suscetíveis que os homens (GONÇALVES; MACHADO, 2007). Definitivamente, a evolução do pensamento de Emil Kraepelin consolidou a psiquiatria moderna no início do século XX com influência nas práticas em saúde mental, fundamentada em bases neurofisiológicas, também com influência nas definições da síndrome depressiva, introduzidas tanto no Manual de diagnóstico e estatístico de transtornos mentais (DSM) como na CID-10 (Classificação internacional das doenças (CID-10) (CUNNINGHAM, *et al.*, 2006).

Os primeiros relatos de substâncias consideradas anti-depressivas datam na década de 40, pois possuíam efeito anti-histamínico e ansiolíticos. Mas, a utilização para tratar transtornos mentais começam na década de 50, quando foi observado que algumas drogas melhoravam o humor de pacientes com sintomas depressivos, ocasionando um avanço no tratamento de pacientes com depressão (QUEVEDO; SILVA, 2013).

Muitas foram as drogas utilizadas com o intuito de tratar a melancolia desde a antiguidade até os dias atuais, entre elas: o ópio, álcool, láudano, cannabis, cocaína, sonífero, calmante, anfetaminas e estimulantes, porém, com risco de gerar dependência, além de inúmeros efeitos colaterais. Ainda na década de 50, foram descobertos acidentalmente os inibidores da monoaminaoxidase como a iproniazida, os anti-

depressivos tricíclicos como a imipramina, dentre outros (GONÇALES; MACHADO, 2007). Além disso, em 1974, surgiram os inibidores da recaptação da serotonina como a fluoxetina. Contudo, apesar de todo o indiscutível avanço da tecnologia e da descoberta de novos fármacos, existe a necessidade de compreendermos melhor a fisiopatologia e tratamentos da depressão, como também, avançarmos nas pesquisas, pois ainda há muito a ser descoberto sobre essa complexa patologia.

## **1.2 Epidemiologia da depressão**

A depressão é um problema de saúde pública que atinge pessoas independentemente de idade, raça, etnia e gênero, resultando em vários efeitos adversos à saúde psíquica, nos relacionamentos humanos, assim como na função cognitiva, concomitantemente gerando incapacidade e comorbidades com outros transtornos (WARAICH, 2004; CUIJPERS, 2012). Conforme dados da Organização Mundial da Saúde (OMS, 2018), essa patologia atinge mundialmente mais de 322 milhões de pessoas, sendo 10% somente no Brasil.

Ainda conforme a OMS, (2018), a depressão constitui uma síndrome complexa, sendo a principal causa de incapacidade, chegando a afetar mais de 121 milhões de pessoas de todas as idades no mundo em 2012 e aumentando em 18% entre 2005 e 2015, sendo o registro em mulheres superior aos números de casos de depressão em homens. Além disso, a pessoa afetada com depressão terá sua capacidade prejudicada de trabalhar, estudar e conviver em família comprometidos, além de ideação suicida, todavia, são registradas aproximadamente 800.000 mil mortes de suicídios por ano, por consequência tornou-se a segunda causa de morte entre 15 a 29 anos de idade. Embora existam tratamentos eficazes, menos da metade dessas pessoas que sofrem com depressão não recebem tratamento, são diagnosticadas incorretamente ou não têm o distúrbio e fazem uso de antidepressivo. Em 2020, a previsão é de que será a segunda causa de incapacidade em países desenvolvidos e a primeira em países em desenvolvimento.

A Organização das Nações Unidas (ONU, 2017) alertava que a síndrome já era considerada a principal causa de problemas de saúde e incapacidades em todo o mundo, e que em países de alta renda, quase 50% dos indivíduos com depressão não recebiam tratamento, precisando concentrar mais atenção e investimentos nessa área.

De acordo com a Associação de Psiquiatria Americana (APA, 2017), a depressão (transtorno depressivo maior) é definida como sendo uma doença comum, séria e tratável, variando de transtornos leves a graves, que provoca sentimento de tristeza, perda de interesse em atividades antes apreciadas, alterações no apetite, no sono, perda de energia e aumento da fadiga, sentimentos de desvalorização e culpa, dificuldade de pensar, concentrar ou tomar decisões, assim como pensamentos de morte e suicídio. Estima-se uma prevalência de 7,4% da população geral e que uma em cada seis pessoas (16,6%) sofrerá depressão em algum momento de sua vida, principalmente no final da adolescência, e que um terço das mulheres experimentará um episódio depressivo maior durante a vida.

Conforme o Manual Diagnóstico e Estatístico de Transtornos Mentais – DSM-5 (2013, p. 255) que foi a classificação mais recentemente publicada, o transtorno depressivo tem como características: “presença de humor triste, vazio ou irritável, acompanhado de alterações somáticas e cognitivas que afetam significativamente a capacidade de funcionamento do indivíduo”. Ainda, classificam os transtornos em transtorno disruptivo da desregulação do humor, transtorno depressivo maior (TDM), transtorno depressivo persistente, transtorno disfórico pré-menstrual, transtorno depressivo induzido por substância/medicamento, transtorno depressivo devido á outra condição médica, outro transtorno depressivo especificado e transtorno depressivo não especificado. A depressão, dentre todas as classificações, tem o transtorno depressivo maior, destacado pela alta mortalidade, podendo levar ao ato suicida.

Segundo ainda o Manual de DSM-5 (2013, p. 162), o transtorno depressivo maior se caracteriza por humor deprimido e deve estar presente na maior parte do dia, além de estar presente quase todos os dias. Nove critérios para depressão são estipulados, dos quais cinco devem estar presentes. Para firmar um diagnóstico, é necessário que os sintomas estejam presentes pelo menos por duas semanas, e que um deles seja obrigatoriamente humor deprimido ou perda de interesse ou prazer.

A disfunção cognitiva é uma manifestação residual frequente na depressão, e durante a fase de remissão pode persistir. De fato, os antidepressivos clássicos reduzem a disfunção cognitiva, porém uma parte dessas pessoas atingidas não é alcançada (BORTOLATO, *et al.*, 2016). A disfunção cognitiva tem sido amplamente relatada de maneira extensa entre os pacientes com depressão maior (FAVA, 2006). Disfunção cognitiva engloba déficits de atenção, aprendizagem verbal e não verbal, memória de curto prazo e de trabalho, processamento visual e auditivo, resolução de problemas, velocidade

de processamento e funcionamento motor (LAM, *et al.*, 2014). A disfunção cognitiva pode ser um mediador primário do comprometimento funcional no TDM. O manejo da disfunção cognitiva continua uma necessidade no tratamento do TDM, sendo esperado o desenvolvimento de novos alvos terapêuticos que possam contribuir para a "remissão cognitiva" e auxilie na recuperação funcional do TDM (BORTOLATO, *et al.*, 2016).

O Brasil é líder de casos de depressão na América Latina. Apesar de 10% da população sofrer com a doença, conforme dados divulgados da OMS, cerca de uma em cada dez pessoas com depressão não possui diagnóstico precoce e a adesão ao tratamento por vezes é inadequada. Além de possuir um caráter endógeno, possui um caráter ambiental reativo, onde o ambiente pode desencadear um quadro depressivo. Por ser uma doença psiquiátrica em ascendência, e a terceira principal causa de incapacidade em todo o mundo, dados da OMS afirmam que em 2030 a depressão será a doença mais prevalente do planeta.

Determinada pesquisa populacional realizada no Brasil em 2013, apontou segundo a Pesquisa Nacional de Saúde (PNS), que a prevalência da depressão maior é mais significativa entre mulheres que vivem em áreas urbanas, com baixos níveis de escolaridade e com doenças crônicas associadas como hipertensão arterial e diabetes mellitus. Foi verificado que a maioria dos brasileiros com sintomas depressivos clinicamente relevantes (78,8%) não recebia qualquer tipo de tratamento (LOPES, *et al.*, 2016).

Estudos têm apontado que a prevalência da depressão é expressivamente maior entre pessoas com maior número de doenças crônicas, podendo ser bidirecional a relação entre depressão e doenças crônicas, reduzindo, assim, a qualidade de vida. Pessoas com doenças crônicas podem apresentar limitações nas atividades da vida diária. Com isso, os problemas e implicações inerentes dessas restrições podem levar a transtornos de humor e depressão (WANG, *et al.*, 2008; BOING, *et al.*, 2012). Por ser considerada uma doença multifatorial, com causas diversas, a depressão está associada com o risco de desenvolver doenças graves em relação às pessoas não depressivas (VAN DER KOOY, *et al.*, 2007).

Assim sendo, os pacientes com doença crônica e depressão apresentam um pior prognóstico quando comparados com aqueles sem depressão, por exemplo, em pacientes com *diabetes mellitus* (DM), a depressão pode levar a alterações neuroquímicas e hormonais e produzir efeitos hiperglicemiantes ocasionando distúrbios no metabolismo

glicêmico (MOREIRA, *et al*, 2003). Em contrapartida, o DM tem efeitos neuroquímicos sobre os sistemas centrais serotoninérgicos, noradrenérgicos e dopaminérgicos, levando a uma diminuição da função monoaminérgica, à semelhança do que ocorre na depressão. A sobreposição de alterações fisiopatológicas de condições anteriormente citadas, poderia explicar a ocorrência frequente de sintomas depressivos em pacientes diabéticos (MOREIRA, *et al.*, 2003).

A remissão completa de sintomas deve ser objetivo principal de qualquer tratamento antidepressivo. Existem evidências consistentes na literatura de que a permanência de sintomas residuais de depressão estão associados a pior qualidade de vida e funcionalidade, maior risco de suicídio e de recaída, como também o aumento de consumo de serviços de saúde, conseqüentemente, onerando economicamente o governo (MCINTYRE, O'DONOVAN, 2004; KENNEDY, EMSLEY, 2006). A OMS prevê um aumento financeiro global, de modo que a depressão passará da quarta posição (2000), para segunda doença mais cara do mundo até 2020.

Em face do exposto, foi constatado, e é possível verificar a crescente tendência do número de pessoas afetadas pela depressão e que essa desordem psiquiátrica complexa deve ser melhor compreendida em todos os seus aspectos para que haja efetiva redução do número de casos, assim como redução do número de mortes por pessoas que interrompem a própria vida precocemente.

### **1.3 Fisiopatologia da depressão**

Devido à heterogeneidade clínica e etiológica dos transtornos depressivos, tem sido difícil elucidar por completo a fisiopatologia da depressão. Por ser uma doença multifatorial, necessita de várias estratégias para o seu tratamento. As teorias disponíveis são baseadas em estudo que investigam o estresse psicossocial (hormônios do estresse), os neurotransmissores (serotonina, noradrenalina, dopamina, glutamato e ácido gama-aminobutírico (GABA), os neurocircuitos, os fatores neurotróficos e o ritmo circadiano (HASLER, 2010).

Considera-se que as teorias da depressão aplicam-se aparentemente a apenas alguns tipos de pacientes com depressão, mas não a outros, e, além disso, tem-se observado que a fisiopatologia depressiva pode variar consideravelmente em todo o curso da doença. Diante dessas evidências, defende-se que não há uma hipótese única que explique os casos de depressão. Conseqüentemente, os tratamentos antidepressivos,

incluindo abordagens psicológicas e farmacológicas, devem ser adaptados de acordo com o indivíduo e o estado da doença (HASLER, 2010).

Dentre as teorias sobre a etiologia biológica da depressão, a teoria clássica propõe a hipótese de que a doença deve-se à diminuição de neurotransmissores monoaminérgicos: noradrenalina (NA), dopamina (DA) e serotonina (5-HT). Conforme essa teoria, o sistema neurotransmissor trimonoaminérgico pode estar disfuncional em diversos circuitos cerebrais, com diferentes neurotransmissores envolvidos, dependendo do perfil de sintomas do paciente, podendo provavelmente ser secundária a um evento primário (STAHL, 2014; HASLER, 2010; SOUSA, *et al.*, 2015).

Figura 1. Mecanismos fisiopatológicos da depressão



Fonte: Adaptado de Chopra, Kumar e Kurah, 2011.

HPA – Hipotâmalo-ptuitária-adrenal

As evidências diretas da hipótese monoaminérgica ainda não são robustas. No entanto, alguns estudos apresentam como resultado de investigação baixos níveis de metabólitos monoaminérgicos no líquido cefalorraquidiano de pacientes deprimidos. Estes achados estão em conformidade com a observação da efetividade clínica dos

antidepressivos, que agem aumentando a sinalização monoaminérgica (NUTT, 2008; LEONARD, 2010).

A teoria clássica foi levada um passo adiante quando formularam a hipótese dos receptores monoaminérgicos. Esta hipótese sugere que a depleção dos neurotransmissores verificada nos pacientes deprimidos seria responsável por uma supra-regulação compensatória dos receptores pós-sinápticos. As evidências diretas disso ainda são escassas, mas estudos *post mortem* mostraram consistentemente o aumento no número de receptores de serotonina no córtex pré-frontal de pacientes que cometeram suicídio e, além disso, estudos de neuroimagem identificaram anormalidades nos receptores de serotonina em pacientes deprimidos (STAHL, 2010).

Todos os antidepressivos eficazes reforçam a ação sináptica de uma ou mais monoaminas (NA, DA, 5-HT) e, dessa forma, revertem, teoricamente, a supra-regulação compensatória dos receptores ao longo do tempo. Esse fenômeno é mediado provavelmente pelo processo de supra-regulação de genes relacionados com a síntese de receptores. Vale destacar ainda que as alterações na expressão gênica também podem incluir o aumento de fatores neurotróficos, como o fator neurotrófico derivado do cérebro (BDNF), importantes reguladores da sobrevivência, desenvolvimento, função da plasticidade neuronal (STAHL, 2010). Estudo aponta o envolvimento do BDNF na fisiopatologia da depressão (VASCONCELOS, *et al.*, 2015). Porém, a redução do BDNF não é exclusiva desse transtorno mental (BELMARKER, *et al.*, 2008).

Além disso, a produção excessiva de espécies reativas de oxigênio (EROs), gera estresse oxidativo e estimula a produção de citocinas inflamatórias como IL-1 $\beta$ , IL-6 e TNF- $\alpha$  com ativação de neutrófilos, macrófagos e outras células do sistema imunológico. A ativação de macrófagos leva a secreção de glutamato que promove um aumento no metabolismo do ácido araquidônico com conseqüente produção de mais radicais livres que causam danos neurais (MAES, *et al.*, 2011). Esses dados podem comprometer áreas cerebrais como hipocampo e causar uma perda neuronal nessa região, levando a uma redução da estrutura hipocampal (MAES, *et al.*, 2011).

As citocinas no cérebro são responsáveis pela ativação neuroendócrina e neuronal, regulam o crescimento e a proliferação das células gliais, modulam a atividade dos peptídeos opióides endógenos e ativam o eixo HHA. Também podem afetar o metabolismo dos sistemas noradrenérgico, serotoninérgico e dopaminérgico (SILVERMAN, *et al.*, 2005). Vários e múltiplos estímulos regulam a produção de citocinas. A maioria das citocinas pró-inflamatórias é produzida em resposta a patógenos ou a produtos

patogênicos. A produção central de citocinas pode ser desencadeada pelo estresse, exercício físico, isquemia, dentre outros (LICINIO, 2003).

Pesquisas têm sugerido a possível implicação do óxido nítrico (NO) na fisiopatologia de desordens psiquiátricas como esquizofrenia, desordem bipolar e depressão. O NO tem sido implicado na influência na liberação de neurotransmissores, aprendizado, memória e neurodesenvolvimento. A detecção de NO é feita pela quantificação no plasma em nitrito NO<sub>2</sub> e nitrato NO<sub>3</sub>, e a mensuração dos níveis de nitrito e nitrato tem sido correlacionados com o nível de NO (WANG, CHENG, ZHRANG, 2008; DHIR; KULKARNI, 2011).

Além de fatores genéticos e ambientais também fazerem parte dos mecanismos fisiopatológicos, destaca-se o estresse como um fator ambiental que pode desencadear papel importante no desenvolvimento da depressão maior. Várias linhas de pesquisa indicam a existência da associação entre o estresse, a depressão e a hiperatividade do eixo hipotálamo-pituitária-adrenal (HPA) (MCFARLANE, *et al.*, 2005). Estudos em animais têm demonstrado que o modelo de estresse crônico em roedores tem induzido prejuízo na neuroplasticidade associado a indução ou exacerbação da depressão (PITTENGER; DUMAN, 2008). Apesar de vários trabalhos relacionarem o papel do estresse com a depressão maior, ainda é incerto as causas neurobiológicas, pois existem subtipos diferentes de depressão que percorrem diferentes vias (KRISHNAN; BERTON; NESTLER, 2008).

### 1.3.1 Áreas cerebrais envolvidas na depressão

Diferentes regiões cerebrais e seus circuitos estão envolvidos na diversidade dos sintomas relacionados a depressão, sendo as áreas frontais e temporais mais estudadas. As alterações no córtex pré-frontal em quadros depressivos estão relacionadas à atenção, à psicomotricidade, capacidade executiva e de tomada de decisão, além de alterações na anatomia como a redução dessa região também estaria implicada na fisiopatologia da depressão (LORENZETTI, *et al.*, 2009; ZANDIO, *et al.*, 2002; MALETIC, *et al.*, 2009).

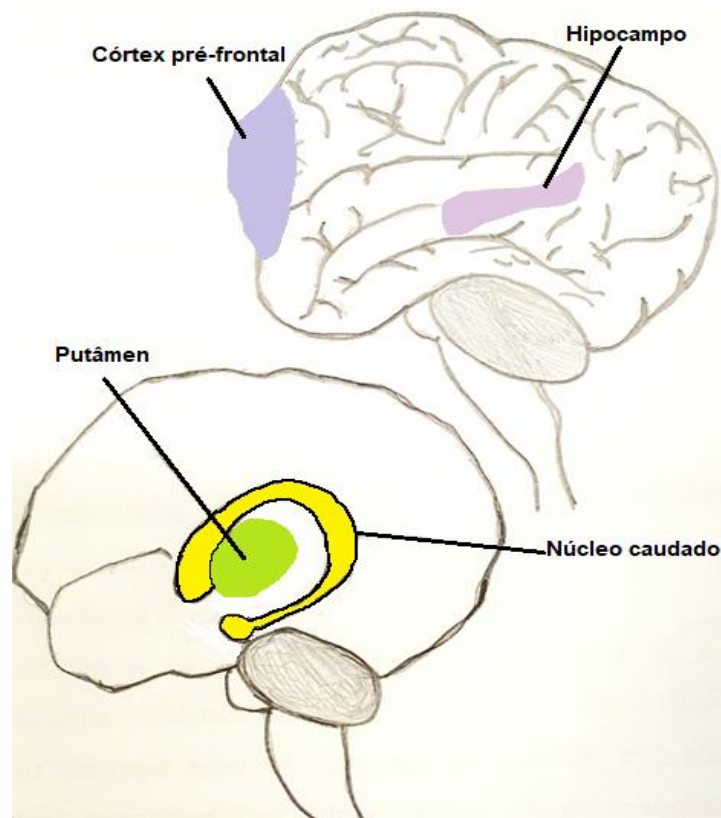
Já o hipocampo, está relacionado a processos cognitivos como aprendizado e memória, além de alterações como perda de interesse, apatia e déficit de memória, podem estar presentes e serem alterados pela exposição a diversos estressores significativos, e parece ter um importante papel na mediação dos efeitos terapêuticos dos tratamentos antidepressivos. Corroborando a importância do hipocampo, nele estão presentes



receptores de glicocorticoides que regulam o eixo HPA, tornando-o mais vulnerável ao estresse e à depressão (LIU, *et al.*, 2017; DUMAN, *et al.*, 2016).

No corpo estriado, formado pelo núcleo caudado, putâmen e globo pálido, pode ocorrer mudanças morfológicas em sub-regiões que sugerem anormalidades e tem um papel importante em memórias emocionais e cognitivas associadas com anedonia na depressão maior (FURUYASHIKI e DEGUCHI, 2012).

Figura 2. Áreas cerebrais envolvidas na depressão



Fonte: Arquivo pessoal

### 1.3.2 Contribuição do estresse na base da etiologia da depressão

A exposição a longo prazo por fatores estressores de vida incontrolláveis e imprevisíveis muitas vezes é considerada um fator determinante no desenvolvimento de depressão. Porém, existem casos que se desenvolvem na ausência de estresse e outros que são expostos ao estresse crônico e não desenvolvem depressão, que pode ser devido a diferentes vulnerabilidades e resiliência dos indivíduos. Sendo assim, a exposição a estressores da vida é um dos fatores precipitantes mais consistentes para desenvolver episódio depressivo (KENDLER, *et al.*, 1999; FEDER, *et al.*, 2009).

Experiências estressantes de vida podem também exercer um papel proeminente no desenvolvimento da depressão maior. Várias linhas de pesquisa sugerem a associação entre o estresse, a depressão e a hiperatividade do eixo HHA (MACFARLANE, *et al.*; 2005).

Sinais de estressores ambientais como perigo para a vida, estressores sociais e respostas a lesões no corpo são primeiramente interpretados pelos sistemas nervosos sensoriais, e depois a informação sequente é processada pelos chamados circuitos emocionais no cérebro. Até o presente momento, não existe uma compreensão completamente elucidada dos circuitos neurais subjacentes à patologia da depressão, os diversos sintomas da depressão implicam que em muitas regiões do cérebro poderiam estar envolvidas nos distúrbios da doença (HYMAN, 2017).

### 1.3.3 *Estresse crônico imprevisível*

A origem do modelo de estresse crônico imprevisível (ECI) surgiu de uma série de estudos de Katz e col., realizados no início dos anos 80, onde ratos foram expostos continuamente a uma variedade de estressores graves, e os efeitos do estresse foram avaliados com mudanças no comportamento e que foram revertidas especificamente pelo tratamento crônico com antidepressivos. A severidade de estressores foi reduzida por motivos éticos e surgiu o termo "moderadamente estressante". Estresse crônico imprevisível, estresse crônico leve, estresse crônico imprevisível leve e estresse crônico variável são termos diferentes e utilizados com um objetivo comum (variedade de estressores diferentes realizados de maneira crônica) (WILNER, 2017).

A validade de modelos animais em desordens psiquiátricas é usualmente avaliada usando a abordagem da validade preditiva, validade de face e validade constructo. Estes princípios foram propostos em relação ao modelo de depressão animal por Wilner em 1984 e o modelo de estresse foi o primeiro modelo a ser implementado nas pesquisas (WILNER, 1997).

O modelo de estresse crônico possui ainda características importantes, que é a gama de mudanças comportamentais e fisiológicas observadas após a exposição ao estresse crônico que se relaciona com os sintomas de depressão, fortalecendo a validade aparente do modelo (KUMAR, KUHAD, CHOPRA, 2011). O modelo possui validade de face, constructo e preditiva, além de mimetizar fatores ambientais que predisõem à depressão em humanos.

O modelo de estresse crônico imprevisível de depressão proposto por WILNER, et al., (1992); WILNER, (1997) é frequentemente considerado modelo padrão. Neste modelo, ratos ou camundongos são expostos cronicamente a um bombardeio constante de micro-estressores imprevisíveis, desenvolvendo inúmeras de mudanças comportamentais, incluindo redução da resposta às recompensas, relacionando com o comportamento do sintoma clínico central da depressão, anedonia.

#### *1.3.4 Disfunção do eixo hipotálamo-hipófise-adrenal*

O desequilíbrio do cortisol e a regulação deficiente do feedback de glicocorticóide têm sido repetidamente identificados como correlatos biológicos de transtornos depressivos e de ansiedade em adultos (BURKE, et al., 2005; YEHUDA, 2005).

Há várias evidências na literatura de que o eixo HHA possui um papel fundamental na predisposição e no início de depressão maior. O eixo HHA é um grande elemento do sistema do estresse e tanto o estresse agudo quanto o crônico podem desencadear depressão maior (KENDLER, et al., 2003).

O cortisol em humanos (corticosterona em animais) é o principal hormônio de resposta ao estresse e alterações podem levar a transtornos neuroendócrinos importantes. Estudos mostram que em pacientes deprimidos, o eixo HHA estando alterado, pode apresentar sua atividade aumentada ou reduzida, isso significaria uma hiperatividade ou hipoatividade respectivamente. Contudo, os níveis de cortisol entre pessoas deprimidas e não deprimidas, geralmente são os mesmos, mas, porém, quando a pessoa deprimida é submetida ao estresse, os níveis de cortisol tornam-se maiores do que os níveis de pessoas não deprimidas quando exposta ao mesmo estresse (JURUENA, 2013).

Enquanto ocorre o estresse agudo, ocorrem respostas fisiológicas adaptativas, incluindo aumento da secreção adrenocortical de hormônios, como o cortisol. A hipótese é que a disfunção contínua do sistema do estresse, tem um papel em várias condições, incluindo uma gama do espectro depressivo (JURUENA, 2013). Das alterações endocrinológicas em pessoas deprimidas, a mais investigada seria do eixo HHA. Após um evento estressor, o hipotálamo libera o hormônio liberador da corticotrofina (CRH), que é transportado para a hipófise anterior, onde estimula a secreção do hormônio adrenocorticotrófico (ACTH) (JURUENA, 2003).

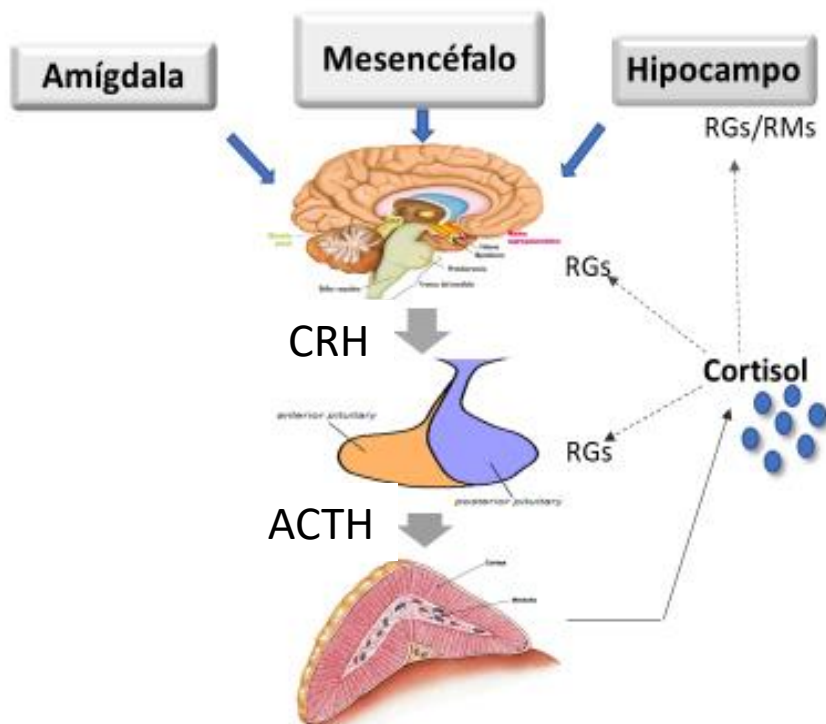
Sendo assim, ao ser liberado e transportado para o córtex da glândula adrenal, libera os glicocorticóides. Quando os níveis de cortisol se tornam elevados, como acontece

no estresse crônico, o tamanho do córtex da adrenal pode aumentar. Normalmente ocorre feedback negativo, que leva a um efeito inibitório à liberação hormonal em um ou vários pontos de liberação dos hormônios mencionados (TOFOLI, *et al.*, 2011). Os glicocorticoides, então, interagem com seus receptores em múltiplos tecidos-alvo, incluindo o eixo, onde são responsáveis pela inibição negativa por feedback da secreção do ACTH pela pituitária e do hormônio liberador de corticotrofina (CRH) pelo hipotálamo (TOFOLI, *et al.*, 2011).

Os efeitos dos glicocorticoides são mediados pelos receptores de glicocorticoides (RG). Estudo tem apontado que a função do RG se encontra prejudicada na depressão maior, resultando na diminuição de feedback negativo mediado por RG no eixo HHA e produção e secreção aumentadas de CRH em várias regiões cerebrais possivelmente envolvidas na etiologia da depressão. A sinalização deficiente pelo RG é um mecanismo-chave na patogênese da depressão (TOFOLI, *et al.*, 2011).

A figura apresentada a seguir ilustra o circuito do eixo HHA, assim como a sequência de hormônios que são estimulados e a alça de estimulação negativa.

Figura 3. Eixo hipotálamo-hipófise-adrenal



Fonte: Elaborado pela autora. RGs(receptor de glicocorticoide); RMs (receptor de mineralocorticoide); ACTH(hormônio adrenocorticotrófico); CRH(hormônio liberador de corticotrofina).

### 1.3.5 Circuitos neuronais

O estresse crônico é um dos fatores de risco ambiental para depressão e pode suprimir a formação de novos neurônios na região hipocampal, diminuir a densidade de espinhos dendríticos e sinapses, assim como, afetar negativamente a memória (QIAO, et al., 2016).

Além dos receptores de glicocorticoides, parâmetros morfológicos de neurônios como localização e aspecto do corpo celular, sua área ou volume e a forma que apresenta, servem para caracterizá-los no sistema nervoso. Essas modificações morfológicas dos espinhos dos neurônios e da árvore dendrítica, através da coloração de Golgi-cox, quando corados, refletem uma maior ou menor ocorrência de sinapses (MITRA, et al., 2005; MARCUZZO, et al, 2007).

Figura 4. Representação morfológica dos espinhos dendríticos  
(Da esquerda para a direita, possuem ordem crescente de estabilidade).



Fonte: Elaborado pela autora

Essa coloração de Golgi-cox foi descoberta por Camillo Golgi em torno de 1873, sendo este método amplamente utilizado, pois, visualiza-se seletivamente a morfologia neuronal sob um microscópio e traz resultados confiáveis (COX, 1891; KEMALI, 1976; YUSTE, 2015).

Outro parâmetro neuronal importante é a presença da proteína ácida fibrilar glial (GFAP), uma das principais proteínas de filamento intermediário proteico de astrócitos maduros, que além de seu papel fisiológico, controle da forma e movimento, os astrócitos desempenham um papel importante nas condições patológicas do sistema nervoso. Em resposta à lesão do sistema nervoso, reage acumulando fibras gliais, caracterizada por intensa proliferação de astrócitos e up-regulation de GFAP. Diminuições ou aumento na expressão de GFAP são relatadas em diferentes patologias (GOMES, et al., 1999).

Outro aspecto relevante é a viabilidade sináptica que pode ser avaliada por fracionamento usando centrifugação do tecido nervoso e isolando os terminais sinápticos. Hebb e Whittaker, em 1958, mencionaram os sinaptossomas primeiramente para definir

membranas pré-sinápticas formadas pelos terminais neurônicos e seu conteúdo, capazes de liberar neurotransmissores (DALEKE, et al., 2008). Além disso, os sinaptossomas servem para o estudo de doenças neurodegenerativas como Alzheimer (SOKOLOW, et al., 2015), Parkinson (HARISH, et al., 2013) e Huntington (VALENCIA, et al., 2013).

#### **1.4 Tratamento farmacológico e não farmacológico da depressão**

Conforme as diretrizes do tratamento da depressão unipolar no adulto, realizado pela Associação Brasileira de Psiquiatria em 2011, dependendo da gravidade e duração do quadro depressivo, o tratamento pode ser realizado isoladamente por fármacos, por psicoterapia ou pela combinação de uma técnica psicoterápica e do tratamento medicamentoso. Além dessas abordagens, existe também a eletroconvulsoterapia, a estimulação magnética transcutânea e a prática de exercícios físicos como tratamento da depressão.

Com o advento de drogas antidepressivas foi possível possibilitar um avanço significativo no tratamento da depressão, principalmente devido serem os agentes terapêuticos mais frequentemente prescritos para o tratamento desta patologia (DRAPIER et al., 2007). Porém, os medicamentos antidepressivos podem apresentar efeitos colaterais indesejáveis como: náusea, ganho de peso, tontura, sedação, dentre outros. Por conseguinte, pode reduzir a adesão ao tratamento ou descontinuação deste.

Várias classes de medicamentos foram desenvolvidas para tratar a depressão com base na teoria das monoaminas, no entanto, há um início tardio na remissão dos sintomas depressivos (HILLHOUSE; POTER, 2015). Apenas metade dos pacientes respondem ao primeiro tratamento com antidepressivos e a remissão gira em cerca de 30% (GODLEWSKA, et al., 2018).

Os antidepressivos têm por objetivo restaurar o humor através de vários mecanismos como o aumento das concentrações de neurotransmissores na fenda sináptica e da inibição do metabolismo, bloqueio de recaptura neuronal ou atuação em autorreceptores pré-sinápticos (MORENO, *et al.*, 1999). O mercado dispõe de diversos antidepressivos com estruturas e mecanismos de ação diferentes, além disso, há evidências de que o tratamento com antidepressivos seria capaz de induzir a neurogênese ao elevar os níveis de BDNF, principalmente no hipocampo (GONÇALVES; COELHO, 2006).

Os antidepressivos permanecem como tratamento apropriado para depressão moderada e severa e até mesmo para leves se a depressão for resistente. Os inibidores da recaptação de serotonina são a escolha de primeira linha devido a seu perfil seguro e melhor tolerado. Porém, a escolha depende de alguns fatores e o paciente deve ser sempre monitorado (BLEAKLEY, 2013).

Apesar dos avanços tecnológicos, das pesquisas científicas e do atual conhecimento sobre os mecanismos de ação dos agentes antidepressivos, a etiologia da depressão continua a ser um assunto não totalmente esclarecido e seu tratamento possui muitas falhas terapêuticas (KRISHNAN; NESTLER, 2008).

As principais classes de antidepressivos estão resumidamente descritas a seguir.

#### **1.4.1 *Inibidores da monoaminoxidase***

Sabe-se que a atividade da enzima monoaminoxidase (MAO) está inibida e que os subtipos da MAO, MAOA e MAOB, estão envolvidos no metabolismo de serotonina, noradrenalina e dopamina. A redução na atividade da MAO acarreta em aumento na concentração desses neurotransmissores nos locais de armazenamento no sistema nervoso central (SNC) e no sistema nervoso simpático. O incremento na disponibilidade de um ou mais neurotransmissor tem sido relacionado à ação antidepressiva dos IMAOs (HIMMELHOCH, 1995).

Dentre os fármacos dessa classe a moclobemida é um exemplo de antidepressivo inibidor seletivo da MAOA e reversível, ao passo que inibidores seletivos da MAOB, como a selegilina, não possuem ação antidepressiva significativa (BRUNTON; CHABNER; KNOLLMANN, 2012).

#### **1.4.2 *Antidepressivos tricíclicos***

O mecanismo de ação comum aos antidepressivos tricíclicos (ADTs) em nível pré-sináptico é o bloqueio da recaptação de monoaminas, principalmente norepinefrina (NE) e serotonina (5-HT) e, em menor proporção, dopamina (DA). A imipramina foi a primeira substância antipsicótica sintetizada, mas que demonstrou ação antidepressiva. Além disso, os ADTs bloqueiam receptores muscarínicos, histaminérgicos e alfa-adrenérgicos e, mais raramente, dopaminérgicos. Sendo que essas ações não se

correlacionam necessariamente com efeito antidepressivo, mas com efeitos adversos (BRUNTON; CHABNER; KNOLLMANN, 2012).

### ***1.4.3 Inibidores seletivos da recaptação de serotonina***

Os inibidores seletivos da recaptação de serotonina (ISRSs) estão entre os agentes antidepressivos de escolha e podemos mencionar alguns deles: citalopram, fluoxetina, fluvoxamina, paroxetina, sertralina e escitalopram), pois foram criados a partir dos ADTs, com poucos problemas de tolerabilidade e segurança, e inibem de forma potente e seletiva a recaptação de serotonina, resultando em sua potencialização. A potência da inibição da recaptação da serotonina é variada. Sertralina e paroxetina são os mais potentes inibidores da recaptação. Citalopram e fluoxetina, possuem perfil farmacodinâmico e farmacocinético variados, sendo que a fluoxetina (FXT) possui metabólito de ação prolongada e farmacologicamente ativo (MORENO; HUPFELD; SOARES, 1999). Entre os antidepressivos, os inibidores de captação de serotonina têm sido mais freqüentemente utilizados, por serem mais seguros e mais bem tolerados.

Os ISRSs são a classe de antidepressivos mais prescrita no mundo. Relativamente uma classe nova, a fluoxetina, o famoso Prozac®, começou a ser comercializada em 1987 e apresentou-se segura em doses elevadas, bem tolerado e com perfil de efeitos colaterais leves.

### ***1.4.4 Inibidores duplos da recaptação de serotonina e noradrenalina***

Os inibidores seletivos da recaptação de serotonina e noradrenalina (ISRSNs) têm a ação de inibir o transportador de recaptação dos mesmos e mais fracamente inibir os transportadores da recaptação de dopamina (BRUNTON; CHABNER; KNOLLMANN, 2012). A Venlafaxina possui potente efeito bloqueador serotoninérgico com leve efeito noradrenérgico; já a duloxetina é um potente inibidor da recaptação de serotonina e noradrenalina. Pelo fato de ISRSNs promoverem rápida downregulation (subsensibilização) de receptores, seus efeitos podem estar relacionados a um início de ação precoce (SCHATZBERG, et al., 2005).

### ***1.4.5 Outros antidepressivos***



Os mecanismos de ação propostos para os vários antidepressivos permanecem vinculados às teorias monoaminérgicas, pelo aumento da oferta de neurotransmissores na fenda sináptica e de subsensibilização de receptores pós-sinápticos. Os antidepressivos, além de aumentarem os níveis sinápticos de neurotransmissores, induzem a ativação de cascatas de sinais de transdução intracelulares, surgindo, por exemplo, o BDNF, fator que exerce uma forte influência no desenvolvimento, na sobrevivência, na manutenção e na plasticidade neuronal dentro do sistema nervoso. A partir dessas evidências, além da possível ação neurotrófica dos antidepressivos em pacientes deprimidos, despontam outros processos como a neurogênese (MAHLI, *et al.*, 2000).

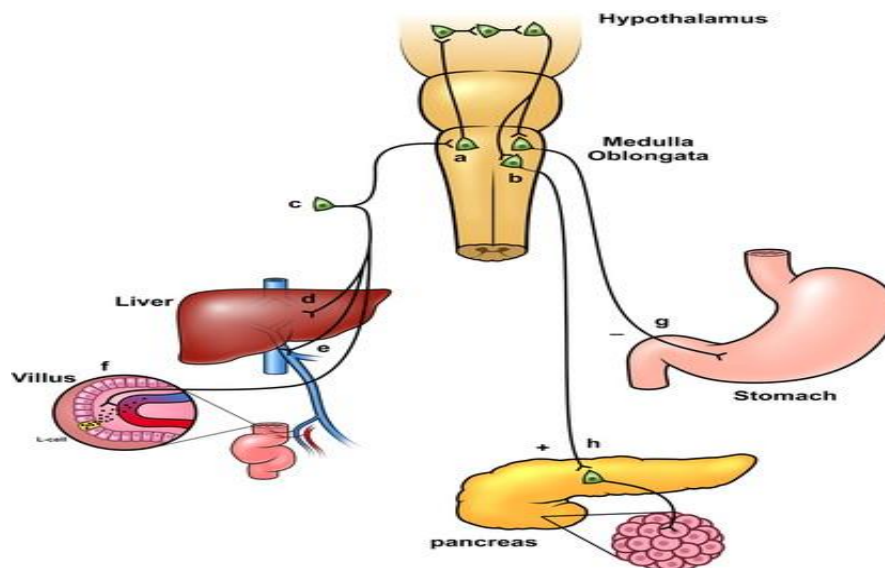
### **1.5 Sistema GLP-1 e incretinomimético**

Dos vários peptídeos que são derivados do pâncreas e intestino, o GLP-1 (peptídeo semelhante ao glucagon 1) é derivado do produto da transcrição do gene de pró-glucagon, sendo, portanto, uma incretina endógena. As incretinas, descobertas em meados de 1930 e reconhecidas por volta de 1960 por seu efeito insulínico, são hormônios liberados pelo pâncreas e intestino quando há consumo de nutrientes por via oral, principalmente com nível elevado de glicose (CARVALHO, *et al.*, 2016).

A quantidade fisiológica de GLP-1 depende de uma via reflexa, e a alta concentração depende da concentração de insulina no plasma, ou seja, quando o alimento atinge o intestino, GLP-1 é produzido e age no hipotálamo, envia sinais colinérgicos e peptidérgicos pelo vago, inibindo o esvaziamento gástrico, estimula a secreção de insulina e inibe glucagon (SCHIRRA, *et al.*, 2006, YOUNG, 2005).

GLP-1 é secretado pelas células L, principalmente encontradas no íleo. Esse peptídeo é metabolizado rapidamente pela enzima dipeptidil peptidase 4 (DPP-4). O receptor de GLP-1, GLP-1R, está amplamente distribuído no pâncreas, cérebro (incluindo hipotálamo, hipocampo e córtex), coração, rim e trato gastrointestinal (ALVAREZ, *et al.*, 2005).

Figura 5: A via neural da ação do GLP-1



Fonte: The Physiology of Glucagon-like Peptide 1, 2006

(Stomach = estômago; lever = fígado)

Estudos com roedores indicam que os agonistas do GLP-1R reduzem a ingestão de alimentos quando injetados periféricamente ou no SNC, e sua injeção repetida inibe significativamente não somente a ingestão de alimentos, mas pode inibir o ganho de peso (TANG-CHRISTENSEN, et al., 1996; TURTON, et al., 1996; MEERAN, et al., 1999; BAGGIO, et al., 2004A; ABBOTT, et al., 2005).

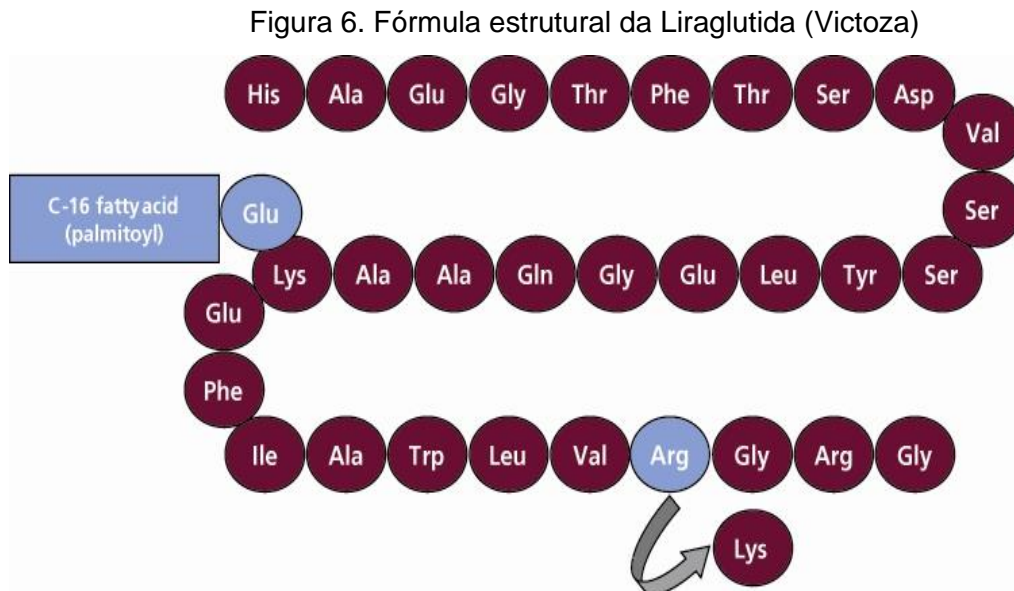
Os incretinomiméticos são fármacos destinados ao tratamento do Diabetes Melitus (DM2), e isso levou ao desenvolvimento de compostos que ativassem o GLP-1R como o agonista de GLP-1, originando a Liraglutida, um incretinomimético, capaz de mimetizar os efeitos das incretinas (KIM; EGAN, 2008).

### 1.5.1 Liraglutida

A Liraglutida (LIRA) é um hormônio sintetizado e faz parte dos mais novos fármacos utilizados no tratamento do DM2. Esse grupo de fármacos tem como objetivo mimetizar os efeitos do GLP-1 endógeno, com ação agonista nos receptores de GLP-1, ou antagonizar a enzima dipeptidil peptidase 4 (DPP-4) e conseqüentemente aumentar as concentrações do GLP-1 endógeno (NAUCK, et al., 2006).

A LIRA, análogo de GLP-1 e parcialmente resistente a DPP-4 contém arginina (Arg) ao invés de lisina (Lys) na posição 34 e um ácido glutâmico e um ácido graxo no 16-

C no lugar da Lys 26. Possui meia vida de aproximadamente 10-14 h após administração subcutânea em humanos uma vez ao dia. Náusea, vômitos e diarreia têm sido os efeitos adversos mais observados (MADSBAD, *et al.*, 2004).



Além disso, a LIRA provoca diversas ações que regulam a glicose similar à ação do GLP-1 endógeno. Ela suprime a glicemia pós-prandial, reduz a glicemia de jejum, aumenta a primeira fase de secreção de insulina após refeições e suprime a produção pós-prandial de glucagon (MADBAD, *et al.*, 2004). Também reduz a hemoglobina glicosilada, se comparada com placebo e tem sido uma opção eficaz em pacientes obesos, devido ao seu efeito redutor no peso corporal e baixo risco de hipoglicemia (MADBAD, *et al.*, 2004). Teoricamente, pode ser um agente útil no diabetes precoce ou pré-diabetes por interromper ou retardar a progressão de falhas das células beta do pâncreas, e por ajudar a manter a glicemia normal (VISBOLL, *et al.*, 2006).

Estudos recentes têm documentado vários efeitos das incretinas sobre estrutura e função no cérebro, pois estas se encontram tanto periféricamente como no sistema nervoso central (SNC) e GLP-1R têm sido encontrados em áreas cerebrais como hipocampo, sendo envolvidos na modulação hipocampal (HISADOME, *et al.*, 2010; KOSHAL, *et al.*, 2016).

Os efeitos neurológicos das incretinas têm sido evidenciados em modelos animais com desordens neurodegenerativas, transtornos de humor, déficits cognitivos, que

também são encontrados em populações com doenças metabólicas como DM tipo 2 (HISADOME, *et al.*, 2010).

As alterações metabólicas e neuropsicológicas representam uma via possível para tratamento integrado com LIRA em distúrbios neuropsiquiátricos, como depressão (MCINTYRE *et al.*, 2013).

Pesquisas têm apontado propriedades neuroprotetoras na modulação do GLP-1R contra várias condições neurodegenerativas e tem sido evidenciado plasticidade sináptica, melhora no processo cognitivo, aumento de BDNF e proteção cerebral contra agentes oxidativos além de sugerido que a LIRA apresenta efeitos ansiolíticos e antidepressivos (WEINA, *et al.*, 2018, KOSHAL, *et al.*, 2016).

## 2. RELEVÂNCIA E JUSTIFICATIVA

A depressão é uma desordem psiquiátrica multifatorial, prevalente, incapacitante e recorrente que pode atingir pessoas de todas as idades. No mundo, é possível observarmos a crescente tendência de casos de pessoas afetadas pela depressão e essa doença psiquiátrica deve ser melhor estudada nos campos da prevenção, diagnóstico, tratamento e falha terapêutica, para que haja efetiva redução do número de doentes, assim como redução do número de casos de suicídio.

Experiências estressantes de vida têm exercido um papel proeminente no desenvolvimento da depressão maior. Estudos realizados têm mencionado a associação entre o estresse, a depressão e a hiperatividade do eixo HHA (MACFARLANE, *et al.*; 2005). A exposição a longo prazo a estressores de vida incontrolláveis e imprevisíveis muitas vezes é considerada um fator determinante no desenvolvimento da depressão. Sendo assim, a exposição a estressores é um dos fatores precipitantes mais consistentes para desenvolver a doença (KENDLER, *et al.*, 1999; FEDER, *et al.*, 2009).

Existe uma complexa relação entre situações de estresse, reação do corpo ao estresse e o início da depressão clínica. Vários estressores crônicos imprevisíveis podem produzir uma condição com semelhanças fenotípicas à depressão clínica, e modelos animais podem ser usados para a avaliação pré-clínica de antidepressivos (KUMAR; KUHAD; CHOPRA, 2011). Vale salientar que o modelo de depressão induzido por estresse crônico imprevisível é um modelo de depressão que mimetiza a depressão humana com boa validade de face, construto e preditiva.

Receptores para GLP-1 são encontrados em várias áreas cerebrais como hipotálamo e tronco cerebral e parecem desempenhar importantes ações neuroprotetoras (WEINA, *et al.*, 2018). Provavelmente, o GLP-1, seja melhor descrito como um neuropeptídeo com efeitos fisiológicos e farmacológicos relevantes na ingestão de alimentos e no peso corporal a nível de SNC, e também exerça funções neuromodulatórias em doenças neurodegenerativas como Alzheimer, Parkinson e acidente vascular cerebral, bem como depressão e ansiedade (KNUDSEN, LAU, 2019).

A liraglutida, um agonista análogo da incretina GLP-1, devido aos seus efeitos anti-inflamatórios, antioxidantes e neuroprotetores no Sistema Nervoso Central (SNC), também poderiam ser capazes de tratar doenças neurodegenerativas e doenças neuropsiquiátricas (WEINA, *et al.*, 2018). Estes efeitos, portanto, justificariam o uso deste

fármaco na depressão que, por sua vez, está relacionada a processos inflamatórios e oxidativos no SNC. Além disso, os antidepressivos convencionais tem seu início de ação lento e possui vários efeitos adversos.

Assim, a pesquisa da ação antidepressiva da Liraglutida no modelo de depressão induzida por estresse crônico imprevisível trará uma perspectiva de redirecionamento do uso clínico desse fármaco, chegando ao mercado em menor tempo. Não estamos nos referindo a cura, mas, redução dos sintomas da doença, no qual o estudo de novos fármacos ou redirecionamento é fortemente encorajado.

### **3. OBJETIVOS**

#### **3.1 Objetivo geral**

- Estudar os efeitos comportamentais, metabólicos e neuroquímicos do incretinomimético liraglutida em modelo animal de depressão induzido por estresse crônico imprevisível em camundongos fêmeas.

#### **3.2 Objetivos específicos**

- Analisar o efeito do tratamento do incretinomimético liraglutida sobre os parâmetros comportamentais por modelo de depressão e ansiedade induzido por estresse crônico imprevisível em camundongos fêmeas;

- Determinar as alterações induzidas pelo tratamento com LIRA no peso corporal, peso das adrenais e glicemia capilar de camundongos fêmeas submetidos ao modelo de depressão induzido por estresse crônico imprevisível.

- Investigar o efeito do tratamento com liraglutida sobre as alterações de estresse oxidativo (TBARS, Nitrito e GSH) nas áreas cerebrais do hipocampo e córtex pré-frontal em modelo animal de depressão induzido por estresse crônico imprevisível;

- Avaliar o efeito do tratamento com liraglutida sobre as concentrações de fator neurotrófico derivado do cérebro (BDNF) e concentrações de corticosterona de camundongos fêmeas submetidas ao modelo animal de depressão induzida por estresse crônico imprevisível;

- Avaliar a histologia da adrenais, Proteína Ácida Fibrilar Glial (GFAP), morfologia dos neurônios (Golgi-Cox); Sinaptossomas-MTT; e Receptor de glicocorticoides (GR).

## 4. Materiais e Métodos

### 4.1 Animais

Foram utilizados camundongos *Swiss* fêmeas, com peso entre 25-30g, mantidos em número de oito por caixa, provenientes do Biotério do Departamento de Fisiologia e Farmacologia da Universidade Federal do Ceará (UFC) e mantidos em ambientes com temperatura controlada ( $22\pm 1^{\circ}\text{C}$ ), com ciclo claro/escuro de doze horas e recebendo água e comida à vontade, exceto nos períodos de estresse para indução de comportamento depressivo. A pesquisa foi aprovada pelo Comitê de Ética e Pesquisa Animal (CEPA) da UFC através do protocolo 76/2017 e os experimentos foram conduzidos de acordo com o Guia de Cuidados e Usos de Animais de Laboratório do Departamento de Saúde e Serviços Humanos dos Estados Unidos da América (NIH 1996).

### 4.2. Drogas

#### 4.2.1 Liraglutida

Liraglutida (Laboratório Novo Nordisk) foi diluída em solução salina e administrada por via subcutânea (s.c.), durante 7 dias consecutivos nas doses de  $120\mu\text{g}/\text{Kg}$  ou  $240\mu\text{g}/\text{Kg}$ . Estas doses correspondem a menor dose diária usada em humanos de 0,6 mg e a dose seguinte de 1,2 mg/Kg, respectivamente (NYBORG, *et al.*, 2012). Após o último dia de tratamento os animais foram submetidos aos testes de comportamento.

#### 4.2.2 Fluoxetina

Fluoxetina (FXT) (Sigma, St. Louis, USA) foi diluída em solução salina 0,9% e administrada por via oral (v.o.), durante 7 dias consecutivos, na dose de 10mg/kg e administrada em um volume de 0.1mL/10g através de uma cânula de aço inox com agulha curva de gavagem para camundongos (4cm) (KUMAR; KUHAD; CHOPRA, 2011).



### 4.3 Desenho experimental

O protocolo (figura 8) foi proposto para avaliar os efeitos comportamentais, metabólicos e neuroquímicos da administração de LIRA no modelo animal de depressão induzido por estresse crônico imprevisível (KUMAR; KUHAD; CHOPRA, 2011). Iniciamos o protocolo com os animais na idade adulta e foram divididos da seguinte forma:

- **Grupo controle (CTL):** animais foram mantidos na caixa sem nenhum fator estressor durante 21 dias. Adicionalmente, no 15º dia os animais receberam a administração diária de solução salina 0,9% por via subcutânea (s.c.).
- **Grupo estresse crônico imprevisível (ECI):** animais foram mantidos na caixa e submetidos aos fatores estressores, durante 21 dias. Adicionalmente, no 15º dia os animais receberam a administração diária de solução salina 0,9% por via s.c.
- **Grupos tratados com Liraglutida (LIRA):** animais foram submetidos a fatores estressores durante 21 dias e a uma injeção diária de LIRA (120µg/Kg ou 240µg/Kg) por via s.c. entre o 15 e 21º dias.
- **Grupo tratado com Fluoxetina (FXT):** animais foram submetidos a fatores estressores durante 21 dias e a uma administração diária de Fluoxetina (10mg/kg) por via oral (v.o.) entre o 15º e 21º dias.

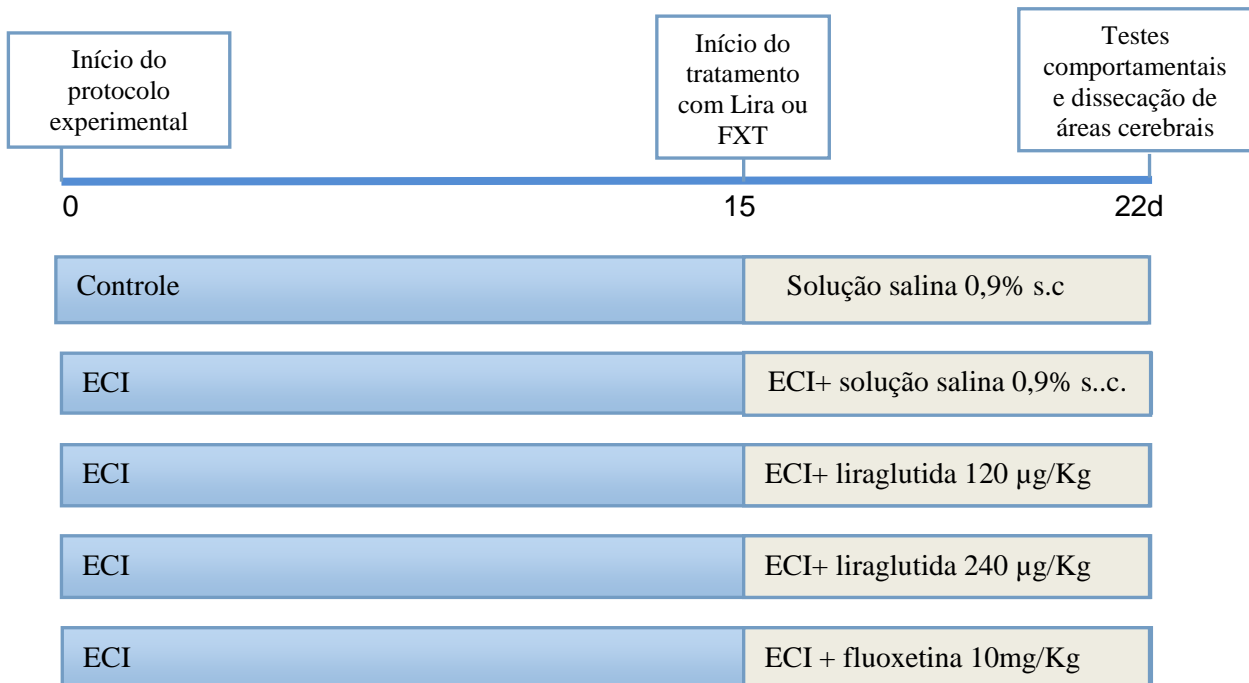


Figura 7. Fluxograma de tratamento

No 22º dia do protocolo, após meia hora da última administração de Liraglutida ou FXT, os animais foram submetidos aos seguintes testes comportamentais (entre 8h e 14h): campo aberto, labirinto em cruz elevada (plus maze), labirinto em Y (Y-maze), suspensão de cauda, nado forçado, teste da borrifagem de sacarose (splash test), reconhecimento de objeto novo, esquivas passivas, sendo que os animais não passaram por todos os testes ao mesmo tempo. Os grupos realizaram no máximo quatro testes. Imediatamente após os testes comportamentais os animais foram eutanasiados para os ensaios neuroquímicos, sendo (CF) e (HC) dissecados e rapidamente congelados e armazenados a  $-80^{\circ}$  até os ensaios.

#### 4.4 Indução de depressão por estresse crônico imprevisível

Trinta minutos após os tratamentos, os camundongos foram submetidos a fatores estressores como descrito por (KUMAR; KUHAD; CHOPRA, 2011). Um fator estressante foi aplicado uma vez ao dia durante 21 dias de modo que não se repetiram durante o protocolo de estresse, portanto imprevisíveis. Os fatores estressores foram aplicados conforme o cronograma seguinte:

Período	Estímulo estressor	Tempo	
1º dia	Natação em ambiente frio ( $12^{\circ}\text{C}$ )	5 min	Manhã
2º dia	Pinça da cauda	30 s	Tarde
3º dia	Privação de água e comida	24 h	Noite
4º dia	Iluminação noturna	12 h	Noite
5º dia	Ausência de estresse	-	-
6º dia	Natação em temperatura ambiente ( $23 \pm 2^{\circ}\text{C}$ )	15 min	Manhã
7º dia	Pinça da cauda	60 s	Tarde
8º dia	Natação em ambiente frio ( $12^{\circ}\text{C}$ )	5 min	Manhã
9º dia	Iluminação noturna	12 h	Noite
10º dia	Ausência de estresse	-	-
11º dia	Natação em temperatura ambiente ( $23 \pm 2^{\circ}\text{C}$ )	10 min	Manhã
12º dia	Pinça da cauda	90 s	Tarde
13º dia	Natação em ambiente frio ( $12^{\circ}\text{C}$ )	5 min	Manhã

<b>14º dia</b>	Privação de água e comida	24 h	Noite
<b>15º dia</b>	Iluminação noturna	12 h	Noite
<b>16º dia</b>	Ausência de estresse	-	-
<b>17º dia</b>	Pinça da cauda	60 s	Tarde
<b>18º dia</b>	Natação em temperatura ambiente ( $23 \pm 2^{\circ}\text{C}$ )	15 min	Manhã
<b>19º dia</b>	Natação em ambiente frio ( $12^{\circ}\text{C}$ )	5 min	Manhã
<b>20º dia</b>	Iluminação noturna	12 h	Noite
<b>21º dia</b>	Privação de água e comida	24 h	Noite

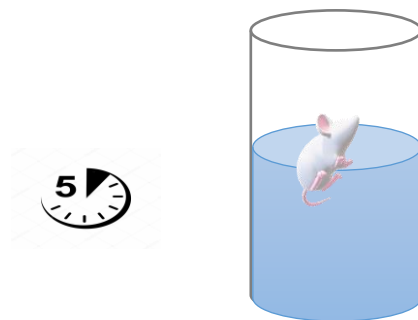
Figura 8. Cronograma de indução de depressão por estresse crônico imprevisível (KUMAR; KUHAD; CHOPRA, 2011).

## 4.5 Testes comportamentais

### 4.5.1 Teste do Nado Forçado

O procedimento experimental consiste em colocar os animais individualmente em cilindros de acrílico com dimensões: altura de 35cm, diâmetro de 18cm e contendo 20cm de água, por um período de 5 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 e o comportamento de climbing (PORSOLT, *et al.*, 1977). Considera-se como imobilidade quando o animal faz apenas os movimentos mínimos para manter a cabeça fora da água. O *climbing* é definido como o comportamento de escalada do animal com suas patas dianteiras contra as paredes do cilindro.

Figura 9 – Teste de nado forçado



Fonte: Arquivo pessoal

#### 4.5.2 Teste de borrifagem de sacarose (splash test)

O “*splash test*” foi utilizado para avaliar o comportamento dos animais com relação a auto-limpeza (*grooming*), após borrifar duas vezes no dorso do animal uma solução de sacarose a 10%. O tempo em que o animal permaneceu neste comportamento foi cronometrado durante 5 minutos (Figura 10), assim como a latência para iniciar o *grooming* e o número de vezes de *grooming*. O “*splash test*” é um marcador de auto cuidado, assim como comportamento motivacional, uma vez que animais submetidos a modelos comportamentais de depressão apresentam um tempo reduzido de auto limpeza quando comparados aos animais controle. Em modelos animais de depressão, a administração crônica de antidepressivos clássicos aumenta o tempo gasto neste comportamento (ISINGRINI, et al., 2010).

Figura 10– Teste de borrifagem de sacarose (splash test)

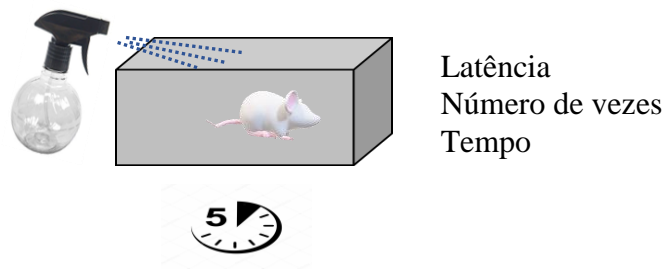
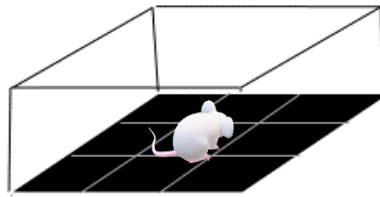


Figura: Arquivo pessoal

#### 4.5.3 Teste de campo aberto

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. A metodologia de ARCHER, (1973) foi utilizada para avaliar a atividade exploratória do animal. Os principais parâmetros para observação foram: número de cruzamentos nos quadrantes com as quatro patas (movimentação espontânea), número de comportamentos de autolimpeza (“*grooming*”), número de levantamentos (“*rearing*”), registrados durante um tempo de 5 minutos, após 1 minuto de habituação. Primeiramente, o animal é colocado no centro da arena, e após 1 minuto é registrado o número de cruzamentos, de *grooming* e de *rearing*. Esse teste foi realizado no vigésimo segundo dia de tratamento com os animais após tratados com as substâncias em teste.

Figura11 – Teste de campo aberto

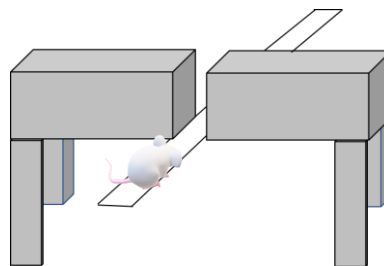


Fonte: Arquivo pessoal

#### 4.5.4 Teste de Labirinto em Cruz Elevado (Plus Maze)

Esse modelo de ansiedade é baseado na observação onde ratos e outros roedores permanecem em lugar elevado e aberto. O plus-maze elevado foi baseado na descrição de LISTER, (1987). Ele consiste em braços cruzados (50 x 10 cm), sendo dois braços abertos e dois braços fechados. O aparato é elevado a 70cm do chão e o animal é colocado no centro e permanece por 5min. É registrado o tempo e o número de vezes no braço aberto e no braço fechado. Drogas como antidepressivos aumentam o tempo gasto de entradas no braço aberto. Em contraste, o número de entradas no braço fechado não muda.

Figura 12 – Teste de labirinto em cruz elevado (plus maze)



Fonte: Arquivo pessoal

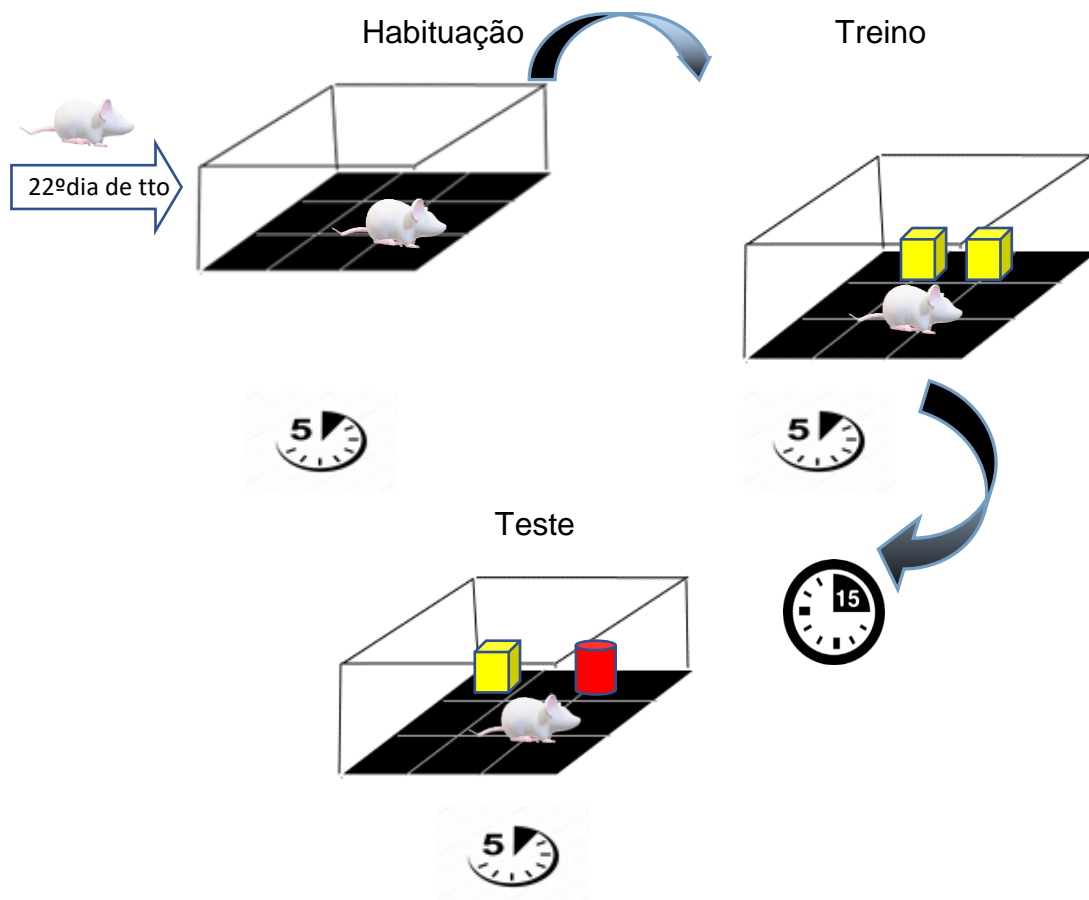
#### 4.5.5 Teste de reconhecimento de objeto novo

O teste de reconhecimento de objetos é realizado baseando-se na tendência natural do animal buscar o novo. No vigésimo segundo dia, o animal é habituado numa arena de campo aberto quadrada (30 x 30 x 15) de acrílico transparente e base preta por cinco minutos. Após um curto espaço de tempo, o animal é colocado novamente na arena contendo dois objetos iguais em cor, colocados de modo paralelos e afastados das

paredes laterais uns cinco centímetros, para uma fase de familiarização, por período de cinco minutos (ANTUNES; BIALA, 2012; GOULART, *et al.*, 2010). Então, retira-se o animal pelo tempo de quinze minutos e coloca-o novamente na mesma arena, substituindo um dos objetos familiares por um objeto novo, este sendo diferente na cor e formato e registra o teste por cinco minutos, no qual o animal irá explorar o objeto familiar e o novo. Exploração do objeto é definida pelo direcionamento do focinho a dois centímetros ou menos, como também aproximação para tocar ou cheirar o objeto. Os objetos e a arena são limpos com álcool após o uso de cada animal.

Para a análise dos resultados, foi utilizado um índice de reconhecimento de objeto novo, calculado pela fórmula:  $(ON - OF / ON + OF) \times 100$ , onde ON é o tempo gasto pelo animal para explorar o objeto novo e OF é o tempo gasto para explorar o objeto familiar.

Figura13 – Teste de reconhecimento de objeto novo



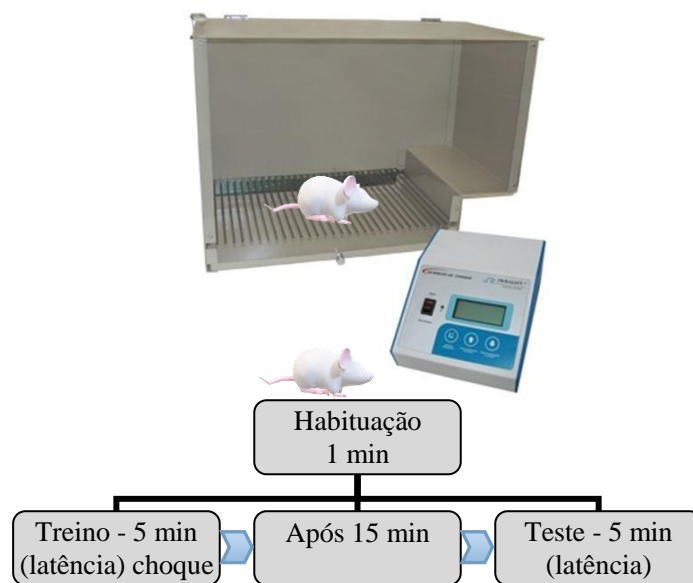
Fonte: Arquivo pessoal

#### 4.5.6 Teste de esquiva passiva

No vigésimo segundo dia de tratamento, foi realizado o teste de esquiva passiva com o objetivo de avaliar a memória aversiva recente (curta duração). O teste foi realizado em uma sala isolada, sendo cada animal primeiramente habituado durante um minuto no aparelho de esquiva passiva, este sendo um aparelho de acrílico (35cm x 28cm x 50cm) com o piso eletrificado e uma plataforma não eletrificada. Posteriormente, os camundongos foram retirados por 30 segundos e colocados novamente na plataforma por um tempo de 5 minutos (DeNoble, 1996). Normalmente o animal tende a explorar o ambiente, e quando esse desce da plataforma, ele recebe um choque de 1 mA durante 1 segundo, sendo registrado o tempo de latência de descida da plataforma para o piso.

Após o choque, o animal é retirado imediatamente e após 15 minutos colocado novamente na plataforma, sendo registrado o tempo de latência (memória recente) de descida para o piso, por um período de até 5 minutos. Na fase do teste, o animal não leva choque.

Figura 14 – Teste de esquiva passiva



Fonte: Arquivo pessoal

#### 4.5.7 Teste de Labirinto em Y (Y-Maze)

A memória operacional e a memória de trabalho foram avaliadas pela taxa de alterações espontâneas em um labirinto em Y (Figura 13) com três braços (40 x 5 x 16 cm) posicionados em ângulos iguais como descrito anteriormente (DALL'IGNA, et al.,

2007; YAMADA, et al., 1996). Antes do teste, os três braços foram identificados (A, B, C), e o animal foi colocado no centro do aparato e esse alternou espontaneamente as entradas nos braços durante 8 minutos. A sequência dos braços nos quais os animais entraram foi então registrada e as informações analisadas de forma a determinar o número de entradas no braço sem repetição.

Uma alternância foi considerada correta quando o animal visitou um novo braço e não retornou ao braço anteriormente visitado. Assim, a porcentagem das alternâncias foi calculada como a razão entre o número de acertos (n) e o número de entradas realizadas durante o período de observação (N-2), multiplicado por 100, conforme a fórmula a seguir:  $\% \text{ Alternações espontâneas} = n / N - 2 \times 100$

Figura 15 – Teste do labirinto em Y (Y-maze) – 8min



Fonte: Arquivo pessoal

## 4.6 Parâmetros metabólicos

### 4.6.1 Peso das Adrenais

Após os testes comportamentais, imediatamente depois do teste da glicemia, os animais que foram decapitados, tiveram as glândulas adrenais direita e esquerda retiradas e pesadas individualmente.

### 4.6.2 Determinação das alterações do peso corporal

O protocolo iniciou-se com os animais na fase adulta (25-30g), e o peso dos animais foi verificado numa balança digital a cada quatro dias durante todo o experimento para a observação da variação do peso em gramas (g).

### 4.6.3 Glicemia capilar



No vigésimo segundo dia, imediatamente depois de realizados os testes comportamentais, foi verificada a glicemia capilar dos animais através da retirada do sangue do final da cauda. A leitura foi feita pelo sistema de medição de glicose no sangue na tira reagente com o glicosímetro One Touch Ultra Mini (Johnson & Johnson). Essa aferição foi realizada em animais com acesso livre a água e comida.

#### **4.7 Testes Neuroquímicos**

Após os testes comportamentais, os animais foram sacrificados por decapitação e seus cérebros foram removidos e lavados em salina gelada. As regiões cerebrais hipocampo (HC) e córtex pré-frontal (CF) foram dissecadas, armazenadas e congeladas no freezer a -80 °C até a utilização nos ensaios de estresse oxidativo. Foram realizados estresse oxidativo (GSH, TBARS e Nitrito) do HC e do CF.

##### **4.7.1 Determinação de glutathiona reduzida (GSH)**

A determinação dos níveis de Glutathiona Reduzida (GSH) foram avaliados para estimar defesas endógenas contra o estresse oxidativo. O método é baseado na reação de reagente de Ellman (DTNB), com grupos tiol livres. As áreas do cérebro foram diluídas em tampão de 0,02 M de EDTA (10% w / v) e adicionadas a uma solução de ácido tricloroacético a 50%. Após centrifugação (3000 rpm/15 min), o sobrenadante do homogeneizado foi recolhido e os níveis de GSH foram determinados (SEDLAK; LINDSAY, 1968). Então, as amostras foram misturadas com 0,4 M de tampão tris-HCl, pH 8,9 e 0,01 M de DTNB. Níveis de GSH foram determinados por espectrofotometria a 412 nm, calculados com base numa curva padrão de glutathiona e expressos como ng de GSH/g de tecido úmido.

##### **4.7.2 Níveis de espécies reduzidas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS)**

A determinação dos níveis de espécies reativas ao ácido tiobarbitúrico ou peroxidação lipídica foi avaliada pela mensuração de substâncias tiobarbitúricas ácido-reativas (TBARS) nos homogenatos. As amostras foram homogenizadas com tampão fosfato de potássio monobásico 50 mM pH 7,4, 63µL do homogenato foi misturado a 100 µL de ácido perclórico 35%, sendo estas centrifugadas (7000 rpm/15 min), no qual 150 µL

do sobrenadante foram recuperados e misturado com 50 µL de ácido tiobarbitúrico 1,2%, e em seguida, estas amostras foram aquecidas em um banho de água fervente por 30 min. Após o resfriamento, a peroxidação lipídica foi determinada por absorvância a 535 nm e expressa como mcg de MDA / g de tecido úmido (OHKAWA; OHISHI; YAGI, 1979).

#### 4.7.3 Determinação dos níveis de nitrito

Na determinação dos níveis de nitrito, para avaliar os efeitos de tratamentos com as respectivas drogas na produção de NO, foram determinados níveis de nitrito em homogenatos dos cérebros dos camundongos imediatamente após a decapitação em todos os grupos. Após centrifugação (800 × g/10 min), o sobrenadante do homogeneizado foi coletado e a produção determinada com base na reação de Griess (GREEN; GOLDMAN, 1981; RADENOVIC; SELAKOVIC, 2005). Para esse experimento 100 µL do reativo de Griess (sulfanilamida a 1% / cloridrato de N-(1-naftil)- etilenediamina 0.1% / ácido fosfórico a 5% / água destilada, na proporção de 1:1:1:1) foi adicionado a 100 µL do sobrenadante do homogenato tecidual e incubado a temperatura ambiente por 10 min. A curva padrão foi elaborada com várias concentrações de NaNO<sub>2</sub> (variando de 0,75 a 100 mM) sob as mesmas condições e os brancos foram preparados pela adição de 100 µL do reativo de Griess a 100 µL do tampão usado para o homogenato. A absorvância foi medida em leitor de microplacas em 560 nm e expressa em nM de nitrito / g de tecido úmido.

#### **4.8 Determinação dos níveis de Fator Neurotrófico Derivado do Cérebro (BDNF)**

Após homogeneização da área cerebral (hipocampo) a 10 volumes de tampão PBS pH 7,4 foi adicionado inibidores de protease (Sigma – Aldrich ) e o nível de BDNF de cada amostra foi quantificado por ensaio imunoenzimático (ELISA; R&D Systems, USA) de acordo com as instruções do fabricante. Os resultados foram expressos em picograma de BDNF/ mg de tecido cerebral.

#### **4.9 Determinação dos níveis séricos de corticosterona**

A determinação da corticosterona foi realizada de acordo com o método

de fluorescência descrito anteriormente por (BUTTE, *et al.*, 1978; MATTINGLY, 1962). Resumidamente, as amostras de sangue fresco foram centrifugadas (1700 xg, 10 min, 4°C) para separar o soro. Os corticosteróides livres de soro foram extraídos por reação de diclorometano sob rotação moderada (33 rpm, 20 minutos, 4 ° C). A fase orgânica foi recolhida e incubada com reagente de fluorescência (7 volumes de ácido sulfúrico a 3 volumes de álcool etílico purificado) durante 13 minutos, protegido da luz e aquecendo a 4 ° C. A fluorescência foi medida em Cytation™ 3 Plate Reader (Biotek, EUA) usando os comprimentos de onda de 470 µm para excitação e 540 µm para emissão. A corticosterona sérica foi expressa em µg de corticosterona / ml de soro utilizando uma curva padrão de corticosterona variando de 100 a 0,5 µg de corticosterona / ml de soro.

#### **4.10 Histologia das adrenais por eosina/hematoxilina**

Após os animais terem sido sacrificados, além do cérebro, as adrenais foram retiradas e imersas em solução de formol a 10% (1L = 900ml de água destilada + 100ml de formol PA) e antes que se passassem 10 dias, essas foram colocadas em cassetes histológicos identificados por siglas com solução de fixação até a parafinização. Em seguida, foram cortadas e coradas com eosina/hematoxilina. Posteriormente foram fotografadas (Nikon *ECLIPSE* N; 10x) e mensuradas através do software *image J* em mm<sup>2</sup>.

#### **4.11 Proteína ácida fibrilar glial - GFAP**

Os animais de cada grupo foram anestesiados com xilazina e cetamina (10 mg/kg e 40 mg/kg, intraperitoneal) e perfundidos intracardiacamente com salina 20 ml, seguido por paraformaldeído 20 ml a 4% em PBS por três vezes. Os cérebros foram removidos e pós-fixados em 4% de PFA por 2 h e imersos por incubação em 30% sucrose/0,1 M de tampão fosfato. Uma vez retirados desta solução, os cérebros foram embebidos em Tissue-Tek (SakuraAméricas, EUA), congeladas a - 21°C. Os cérebros foram cortados em seções coronais de 15µm, utilizando um Criostato CM1850 para cortes em congelamento e acessórios da marca Leica Mikrosysteme. Fatias do hipocampo foram recolhidas em série e armazenadas, na forma de seções flutuantes imersas em PBS com 0,01% de NaN<sub>3</sub> (azida de sódio, em pó a partir de Sigma-Aldrich™, EUA), sendo

posteriormente lavadas novamente com PBS, fixadas e montadas em lâminas silanizadas. As lâminas foram retiradas da geladeira e deixadas em temperatura ambiente por quinze minutos. Incubadas com metanol 100% por cinco minutos a temperatura ambiente ou com PFA 4% por dez minutos a temperatura ambiente. Em seguida, lavadas por três vezes com PBS gelado com intervalos de cinco minutos. Para recuperação antigênica foram incubadas com tampão citrato de sódio (10 mM, 0,05% Tween 20%, pH 6.0) por dez minutos a 90° e lavadas novamente por três vezes com PBS gelado e intervalo de cinco minutos. Para permeabilização da membrana foram incubadas com tampão PBS contendo 0,5% triton x-100 por 20 minutos em temperatura ambiente. Em seguida, lavadas 3 vezes com PBS gelado com intervalos de cinco minutos. Incubadas com solução de bloqueio (1% BSA e 22,52 mg/ml de glicina no PBS com Tween 20).

Os cortes por sua vez passaram pelo processo de recuperação antigênica, sendo posteriormente realizada a imunomarcação de acordo com protocolo padrão, onde seções cerebrais foram incubadas com anticorpo de cabra policlonal anti-GFAP (MNK 4428, Wako pure Chemicals, Neuss, Germany) diluído na proporção de 1:400 em PBS com albumina sérica bovina a 5% (HARRISON et al., 2007). Os cortes permaneceram incubados nesse anticorpo por 12 horas a 4°C, sendo subsequentemente incubadas com o anticorpo secundário anti-goat IgG-Alexa-F 488 (Invitrogen, USA), diluído na proporção de 1:400 em PBS com albumina sérica bovina a 5% (Invitrogen, Karlsruhe, Germany) por 2 horas em temperatura ambiente (25°C) (AHMED et al., 2007). Por fim, os cortes foram marcados com 2-(4- Amidinophenyl)-6-indolecarbamide dihydrochloride (DAPI) (SigmaAldrich, USA) por 20 minutos segundo orientações do fabricante, para marcação nuclear. As lâminas foram então montadas com solução anti-desbotamento ProlongGold (Invitrogen, USA) e fotografadas, na magnificância de 10x e de 20x em leitor de lâminas e 34 microplacas Cytation 3 ImageReader (Biotek Instruments). A análise das imagens foi realizada com o Software Fiji ImageJ® versão para windows, sendo feita a quantificação de astrócitos por fatia cerebral nas regiões CA1, CA3 e GD.

#### **4.12 Coloração de Golgi-Cox**

O método de Golgi-Cox é considerado uma das técnicas mais bem estabelecidas para o estudo da arborização dendrítica e densidade sináptica em cérebro de mamíferos. Nesse estudo, foi reproduzido o método de coloração histoquímica de Golgi-Cox adaptado segundo (Zaqout and Kaindl, 2016). Para tanto, após o sacrifício por decaptação, cada

cérebro foi rapidamente dissecado, lavado com água bi-destilada, e cortado ao meio em dois hemisférios. As amostras foram então fixadas em solução 4% de para-formaldeído (PFA) por 1 hora, após o qual, foram gentilmente transferidas para frascos âmbar individuais preenchidos com solução Golgi-Cox de impregnação (5% K<sub>2</sub>Cr<sub>2</sub>O<sub>7</sub>, 5% HgCl<sub>2</sub>; 5% K<sub>2</sub>CrO<sub>4</sub>). Após 24 horas, os cérebros foram transferidos para um frasco com uma nova solução de Golgi-Cox e mantidos por 14 dias à temperatura ambiente e protegidos da luz. Após esse período, as amostras foram lavadas com água bi-destilada e transferidas para um novo frasco contendo solução crioprotetora. As amostras foram mantidas nessa solução por 4 a 7 dias, protegidas da luz e à 4°C. Diariamente, a solução protetora foi removida e substituída por uma solução fresca. As amostras então foram incluídas em um bloco de agarose 4%, e cortadas em aparelho de vibrátomo (Microm; HM\_650V, Thermo Fisher Scientific Inc., Germany) com espessura de 100 µm. Foram feitas secções de hipocampo segundo as coordenadas AP -2.0 mm do bregma, ML +1.4 mm, DV -1.5 mm. AP: -3.8 mm do bregma, ML +3.0 mm, DV -1.5 mm, conforme (Huang *et al.*, 2012). As secções de tecido foram então coletadas com uma pinça não metálica e transferidas para lâminas revestidas com solução de gelatina 4%. Aplicar-se-á uma pressão horizontal para baixo nas amostras no sentido de desprende-las do molde de agarose. As lâminas foram então transferidas para estantes e mantidas à temperatura e ar ambiente por 2 dias para secagem. Após isso, elas foram incubadas em solução de etanol 50% por 5 minutos e, em seguida, em solução de tiosulfato de sódio por 10 minutos protegidas da luz. As amostras foram contra-coradas com cresil violeta 1%, e passaram por desidratações sucessivas com banhos de etanol 70, 95, e 100% por 6 minutos cada. Ao fim, foram mantidas em xilol até o processo de montagem para leitura. As lâminas foram cobertas com lamínulas de vidro e seladas com solução impermeável. Foram então visualizadas em microscópio de luz Olympus IX81 (Zeiss, Göttingen, Germany), e as imagens resultantes serão processadas usando *Image J* Software.

#### **4.13 Sinaptossomas MTT**

As áreas cerebrais do hipocampo foram escolhidas e maceradas em solução sacarose gelada no "potter", sendo 1 mL de solução sacarose para cada hipocampo, sendo homogeneizadas. Logo após esse processo, foram centrifugadas a 3000G por 10 min, 4°C e sobrenadante coletados. Então, centrifugado novamente

o sobrenadante a 14000G por 12 min, 4°C. Descartado o sobrenadante e ressuspendido o pellet em 1 mL de solução com gradiente osmótico de Percoll 45%, separando os restos de membranas dos sinaptossomas de uso. Centrifugado novamente a 14000G por 2 min, 4°C e coletado a camada superior e ressuspendido em 1 mL de tampão Krebs. Centrifugado novamente a 14000G por 2 min a 4°C. Foi descartado o sobrenadante e ressuspendido o pellet em 1 mL de tampão Locke. A proteína foi dosada pelo método de Bradford. Pipetado 80µg por poço de sinaptossomas. Adicionado a Liraglutida com a curva de concentração (1,875; 3,75; 7,5; 15; 30; 60; 120; 240µg/ml). A placa foi incubada na estufa 5% CO<sub>2</sub>, 37°C por duas horas. Adicionado MTT (methylthiazolyldiphenil-tetrazolium) a 0,5mg/ml e incubado por uma hora a 37°C. Então, foi acrescentado 50µl de DMSO puro e deixado agir por 30 minutos. A placa foi quantificada por espectrofotômetro à 570nm sob agitação por um minuto.

#### **4.14 Receptor de Glicocorticóide - RG**

Os animais de cada grupo foram anestesiados com xilazina e cetamina (10 mg/kg e 40 mg/kg, intraperitoneal) e perfundidos intracardiacamente com salina 20 ml, seguido por paraformaldeído 20 ml a 4% em PBS por três vezes. Os cérebros foram removidos e pós-fixados em 4% de PFA por 2 h e imersos por incubação em 30% sucrose/0,1 M de tampão fosfato. Uma vez retirados desta solução, os cérebros foram embebidos em Tissue-Tek (SakuraAméricas, EUA), congeladas a - 21°C. Os cérebros foram cortados em seções coronais de 15µm, utilizando um Criostato CM1850 para cortes em congelação e acessórios da marca Leica Mikrosysteme. Fatias do hipocampo foram recolhidas em série e armazenadas, na forma de seções flutuantes imersas em PBS com 0,01% de NaN<sub>3</sub> (azida de sódio, em pó a partir de Sigma-Aldrich™, EUA), sendo posteriormente lavadas novamente com PBS, fixadas e montadas em lâminas silanizadas. As lâminas foram retiradas da geladeira e deixadas em temperatura ambiente por quinze minutos. Incubadas com metanol 100% por cinco minutos a temperatura ambiente ou com PFA 4% por dez minutos a temperatura ambiente. Em seguida, lavadas por três vezes com PBS gelado com intervalos de cinco minutos. Para recuperação antigênica foram incubadas com tampão citrato de sódio (10 mM, 0,05% Tween 20%, pH 6.0) por dez minutos a 90° e lavadas novamente por três vezes com PBS gelado e intervalo de cinco minutos. Para permeabilização da membrana foram incubadas com tampão PBS contendo

0,5% triton x-100 por 20 minutos em temperatura ambiente. Em seguida, lavadas 3 vezes com PBS gelado com intervalos de cinco minutos. Incubadas com solução de bloqueio (1% BSA e 22,52 mg/ml de glicina no PBS com Tween 20. Após as lâminas estarem no anticorpo primário anti-mouse Receptor de Glicocorticóide, estas foram lavadas três vezes com intervalos de 5 minutos com tampão fosfato-salino PBS e colocado o anticorpo secundário Alexa Fluor 594 Anti-mouse (vermelho –abcam). Sendo então diluído na proporção de 1:400 e calculado o volume de 250 µl por lâmina. Logo após, foi aguardado um período de 1 hora e trinta minutos e lavado novamente por três vezes com PBS num intervalo de 5 minutos. Após esse período, foi adicionado NeuN (já conjugado com o fluoróforo), diluído em 1:200 e calculado o volume de 250 µl por lâmina. Logo após, foi deixado novamente por um período de 1 hora e trinta minutos. Após isso, lavado novamente por três vezes com intervalos de cinco minutos com a solução de PBS. Por fim os cortes foram marcados com 2-(4- Amidinophenyl)-6-indolecarbamide dihydrochloride (DAPI) (SigmaAldrich, USA) por 15 minutos segundo orientações do fabricante, para marcação nuclear. Em seguida, foi lavado por cinco vezes com a solução de PBS e as lâminas foram então montadas com solução anti-desbotamento ProlongGold (Invitrogen, USA) e fotografadas, na magnificação de 10x e de 20x em leitor de lâminas e 34 microplacas Cytation 3 ImageReader (Biotek Instruments). A análise das imagens foi realizada com o Software Fiji ImageJ® versão para windows, sendo feita a quantificação de micróglia por fatia cerebral nas regiões CA1, CA3 e GD.

#### **4.15 Análise Estatística**

A análise dos dados foi realizada através do software Graph Prism versão 6.0 para Windows, GraphPad Software Inc, San Diego Califórnia EUA Copyright©. Os resultados foram expressos como média  $\pm$  EPM e foram comparados por análise de variância (one-way ANOVA), seguido pelo teste de Tukey para comparações múltiplas, exceto na esquia passiva (two-way ANOVA seguido por Bonferroni's) e histologia adrenal (one-way ANOVA seguido de Dunnett's). As diferenças foram consideradas estatisticamente significativas quando  $p < 0,05$ .

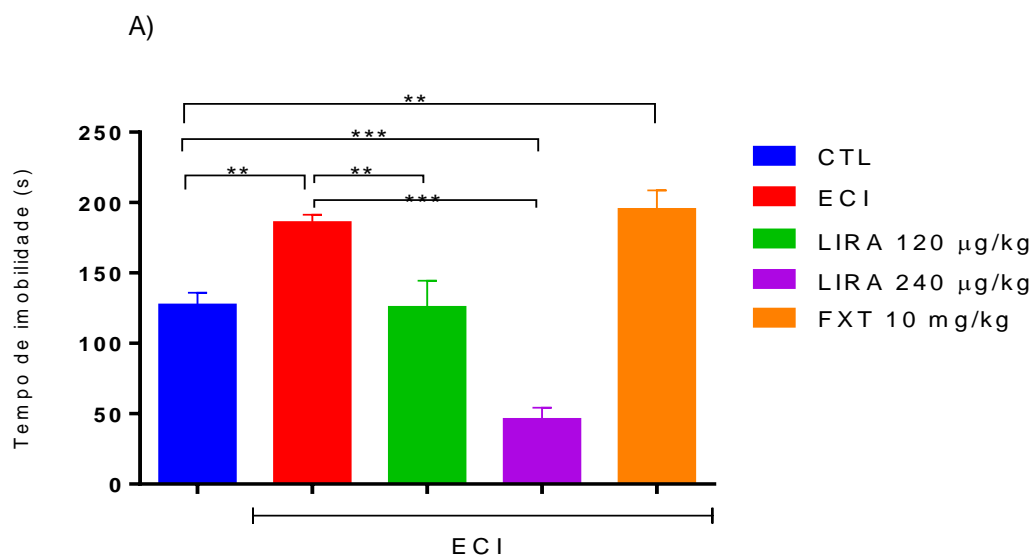
## 5. RESULTADOS

### 5.1 Avaliação comportamental

#### 5.1.1 Efeitos da administração da LIRA ou FXT sobre as alterações comportamentais em modelo de depressão induzido pelo ECI no teste de nado forçado.

Na Fig.16A, no teste de nado forçado, os resultados mostraram que houve diferença significativa [ $F(4,37)=23.32$   $P < 0,0001$ ] com aumento do tempo de imobilidade entre o grupo CTL para o grupo ECI  $p < 0,01$ . Entre o grupo ECI e o grupo tratado ECI + LIRA 120, foi observado uma redução significativa do tempo de imobilidade  $p < 0,01$ . Resultado semelhante foi encontrado entre o grupo ECI e o grupo ECI tratado com LIRA 240, apresentou uma redução do tempo de imobilidade  $p < 0,001$ . O grupo ECI + FXT não apresentou diferença significativa com o grupo apenas ECI. Na Fig.16B, com relação ao tempo de *climbing* não houve diferença significativa entre o grupo CTL e o grupo ECI. Nossos resultados mostraram diferença significativa [ $F(4,87)=5.843$   $P=0,0003$ ], entre o grupo ECI e o grupo ECI + LIRA 120 com um aumento do tempo de *climbing* no grupo tratado  $p < 0,05$ . Resultado semelhante foi encontrado entre o grupo ECI e o grupo ECI + FXT, mostrando um aumento do tempo de *climbing*  $p < 0,01$ .

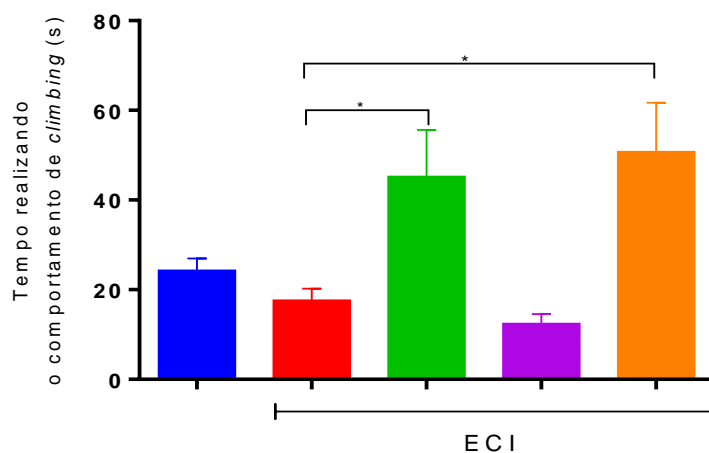
**Fig. 16A** Alteração do tempo de imobilidade do teste de nado forçado e **16B**. Tempo de *climbing* nos animais submetidos ao modelo de depressão induzida pelo estresse crônico imprevisível e submetidos ao tratamento com LIRA ou FXT.



CTL-controle; ECI-estresse crônico imprevisível; LIRA-liraglutida; FXT-fluoxetina



B)



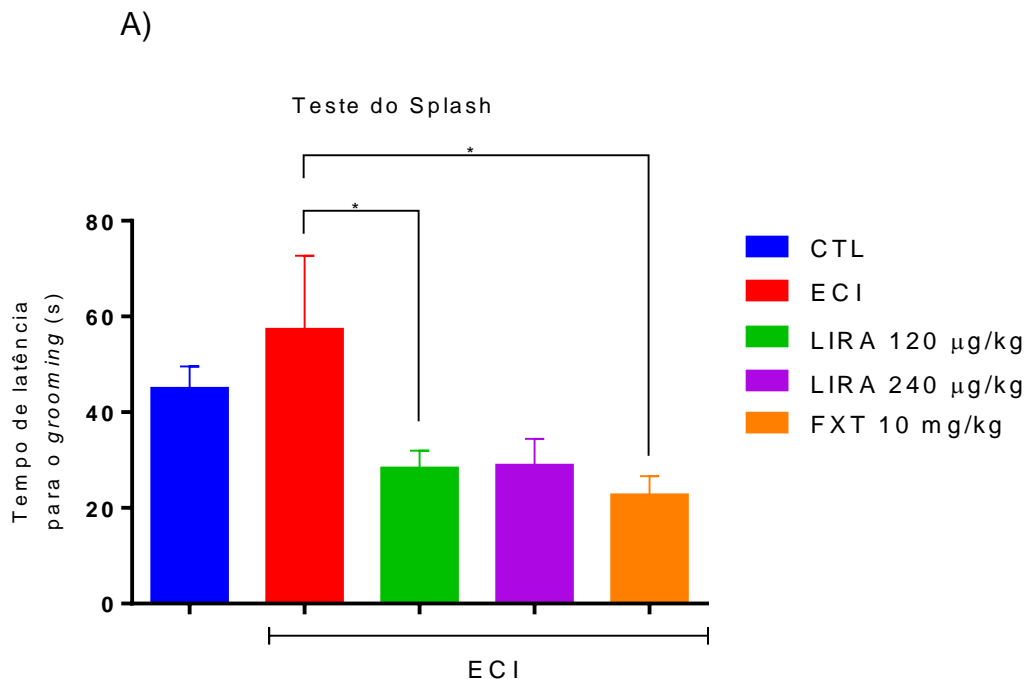
CTL-controle; ECI-estresse crônico imprevisível; LIRA-liraglutida; FXT-fluoxetina

Os animais foram submetidos ao ECI por 21 dias. Entre o 15<sup>o</sup> e 21<sup>o</sup> dias de tratamento, os animais receberam LIRA (120 $\mu$ g/kg; s.c) ou LIRA (240  $\mu$ g/kg; s.c.) ou FXT (10 mg/kg; v.o.). Cada barra representa a média  $\pm$  erro padrão da média (SEM) (n = 16-20 animais por grupo) de acordo com one-way ANOVA seguido pelo teste de *post hoc Tukey's*. \*p<0,05; \*\*p<0,01; \*\*\*p<0,001.

### 5.1.2 Efeitos da administração da LIRA ou FXT, sobre as alterações comportamentais em modelo de depressão induzido pelo estresse crônico imprevisível no teste de borrifagem de sacarose (*splash test*).

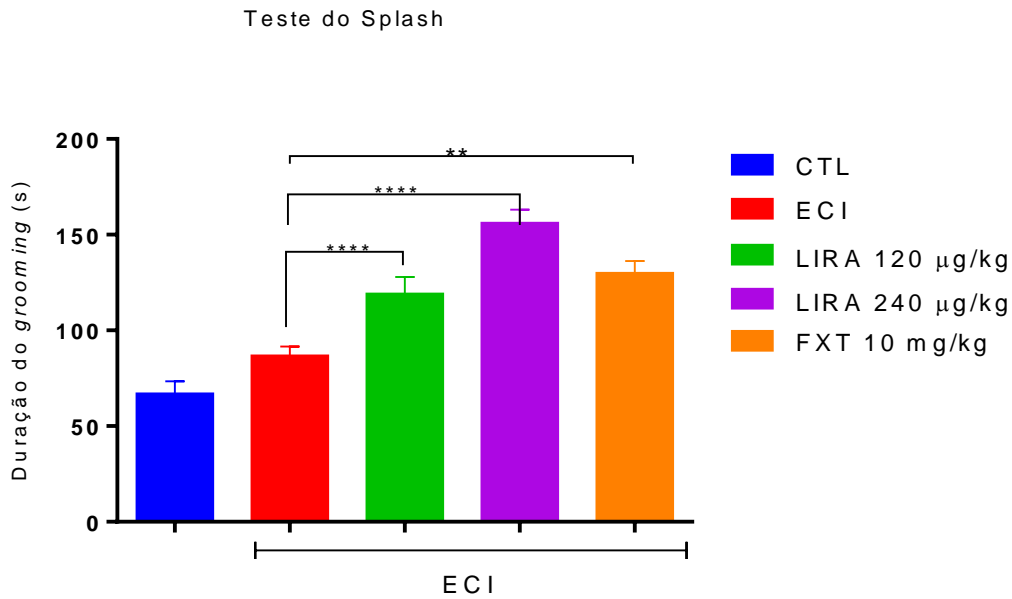
Como mostra a Fig.17A, não houve diferença significativa entre o grupo CTL e o grupo ECI. A administração crônica de LIRA 120 reverteu diminuindo significativamente [F(4,41) = 4.039; P = 0.0075] a latência do *grooming* dos animais quando comparado com o grupo ECI p < 0,05. Esse comportamento não foi revertido no grupo ECI + LIRA 240 quando comparado com o grupo ECI. Semelhantemente, o grupo ECI + FXT também reduziu a latência do *grooming* quando comparado ao grupo ECI p < 0,05. Os demais grupos não apresentaram alterações significativas. Na Fig.17B, com relação a duração do *grooming*, houve diferença significativa [F(4,44)= 26,86 P<0,0001] entre o grupo CTL e o grupo ECI, mostrando um aumento da duração do *grooming* no grupo ECI. A duração também aumentou no grupo ECI + LIRA 240 p < 0,0001 quando comparado ao grupo ECI, assim como o grupo FXT aumentou p < 0,05 em relação ao ECI. Na Fig.17C, houve um aumento significativo [F(4,40)=7.160 P=0,0002] entre o grupo CTL e o grupo ECI + LIRA 240, com aumento do número de grooming do grupo ECI + LIRA 240 p < 0,01.

**Fig.17. Latência de *grooming* 17A, duração de *grooming* 17B e nº de *grooming* 17C no Teste de borrifagem de sacarose dos animais submetidos ao modelo de depressão induzida por estresse crônico imprevisível e submetidos ao tratamento com LIRA ou FXT.**

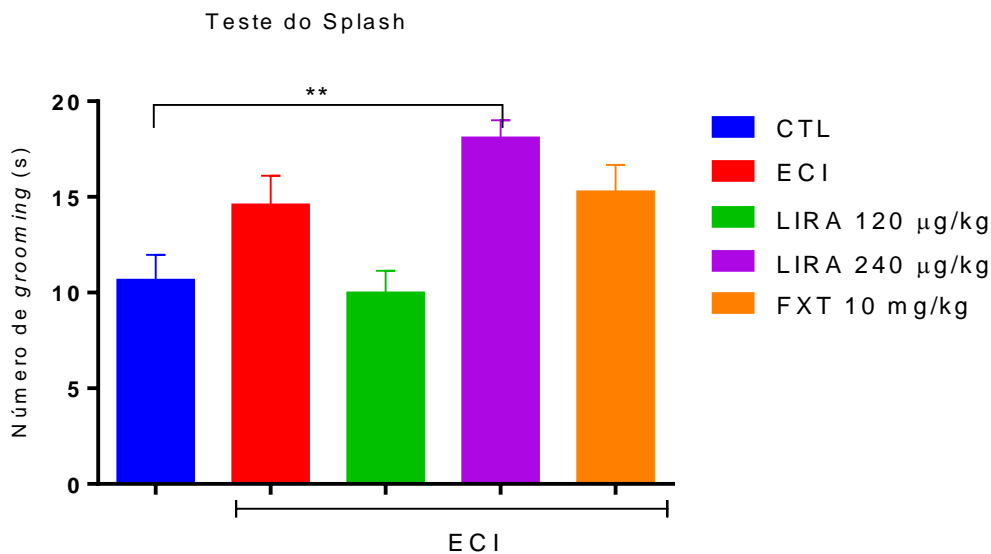


CTL-controle; ECI-estresse crônico imprevisível; LIRA-liraglutida; FXT-fluoxetina

B)



C)



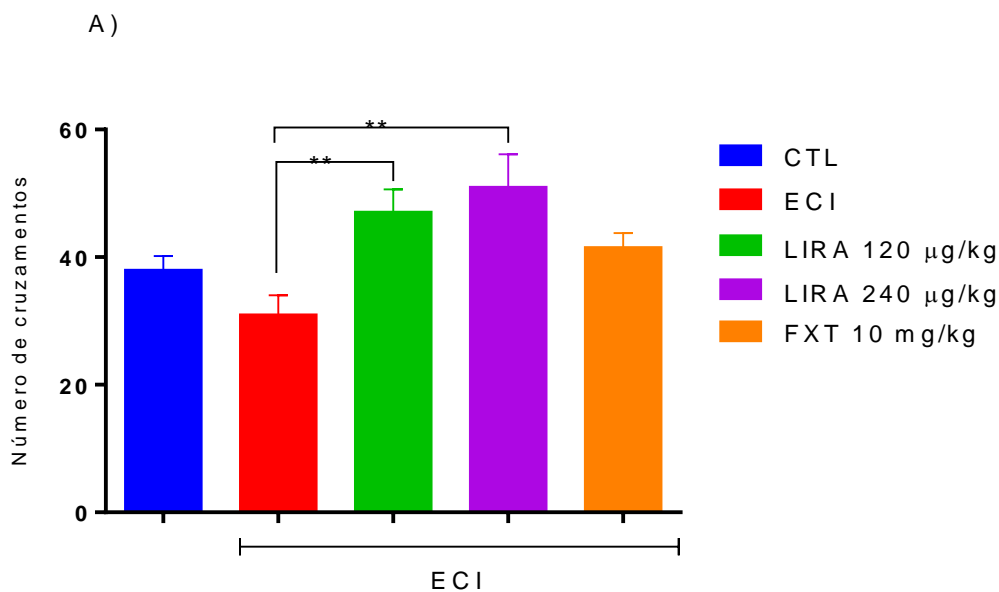
CTL-controle; ECI-estresse crônico imprevisível; LIRA-liraglutida; FXT-fluoxetina

Os animais foram submetidos ao ECI por 21 dias. Entre o 15<sup>o</sup> e 21<sup>o</sup> dias de tratamento, os animais receberam LIRA (120µg/kg; s.c) ou LIRA (240 µg/kg; s.c.) ou FXT (10 mg/kg; v.o.). Cada barra representa a média ± erro padrão da média (SEM) (n = 07-14 animais por grupo) de acordo com one-way ANOVA seguido pelo teste de *post hoc Tukey's*. \*p<0,05; \*\*p<0,01; \*\*\*\*p<0,0001.

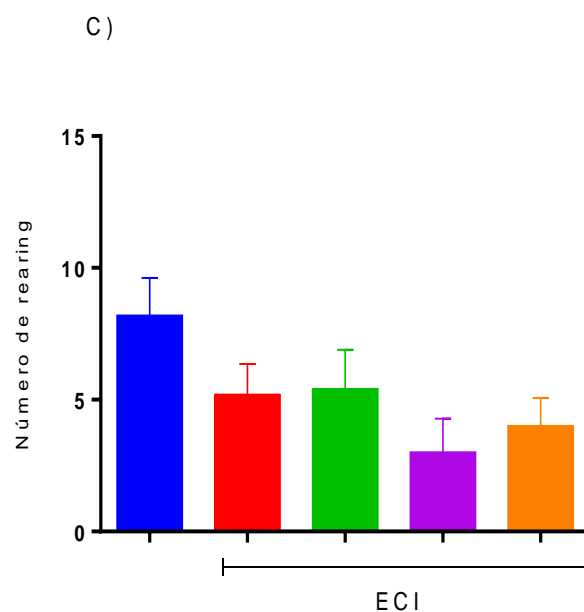
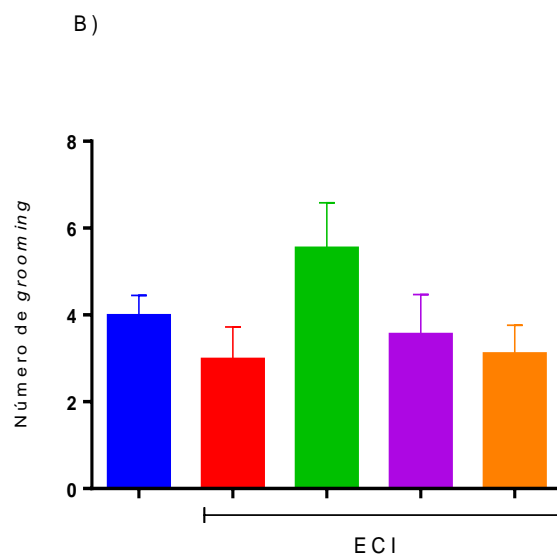
### 5.1.3 Efeitos da administração da LIRA ou FXT, sobre as alterações comportamentais em modelo de depressão induzido pelo estresse crônico imprevisível no teste de campo aberto.

No teste de campo aberto [ $F(4,40) = 5.586$   $P=0,0011$ ], nossos resultados mostraram que não houve diferença significativa no número de cruzamentos entre o grupo CTL e o grupo ECI. No entanto, o grupo ECI + LIRA 120 apresentou um aumento no número de cruzamentos em relação ao grupo ECI ( $p<0,01$ ). Resultado semelhante foi observado no grupo ECI + LIRA 240 quando comparado ao grupo ECI ( $p<0,01$ ). O grupo ECI + FXT não apresentou diferença significativa no número de cruzamentos com o grupo ECI (Fig. 18A). Em relação a rearing e a *grooming* não houve alterações significativas (Fig. 18B e 18C).

**Fig. 18A.** Alteração da atividade locomotora em campo aberto, 18B. número de grooming e 18C. número de rearing nos animais submetidos ao modelo de depressão induzida pelo estresse crônico imprevisível e submetidos ao tratamento com LIRA ou FXT.



CTL-controle; ECI-estresse crônico imprevisível; LIRA-liraglutida; FXT-fluoxetina

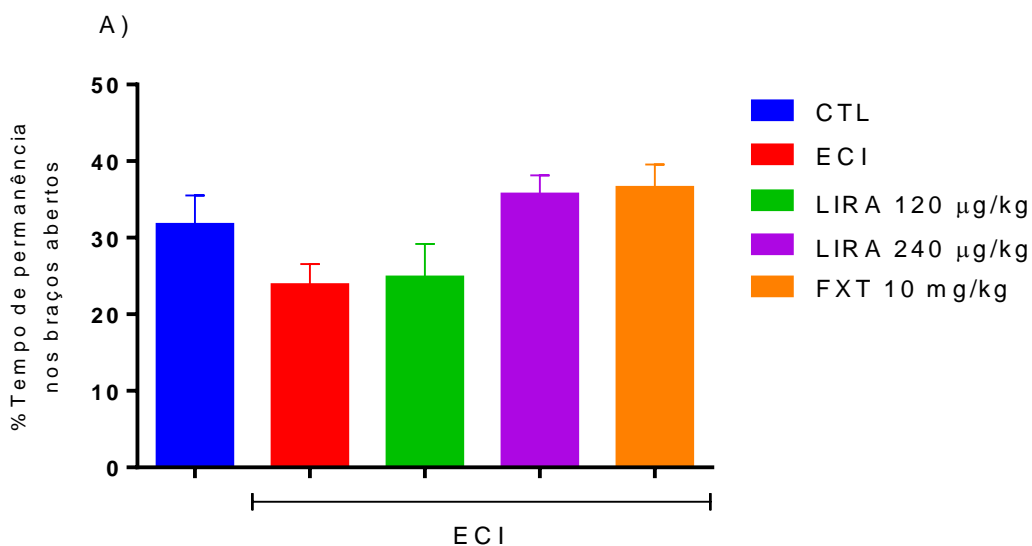


Os animais foram submetidos ao ECI por 21 dias. Entre o 15<sup>o</sup> e 21<sup>o</sup> dias de tratamento, os animais receberam LIRA (120µg/kg; s.c) ou LIRA (240 µg/kg; s.c.) ou FXT (10 mg/kg; v.o.). Cada barra representa a média ± erro padrão da média (SEM) (n = 08-10 animais por grupo) de acordo *one-way* ANOVA seguido pelo teste de *post hoc* Tukey. \*\*p<0,01

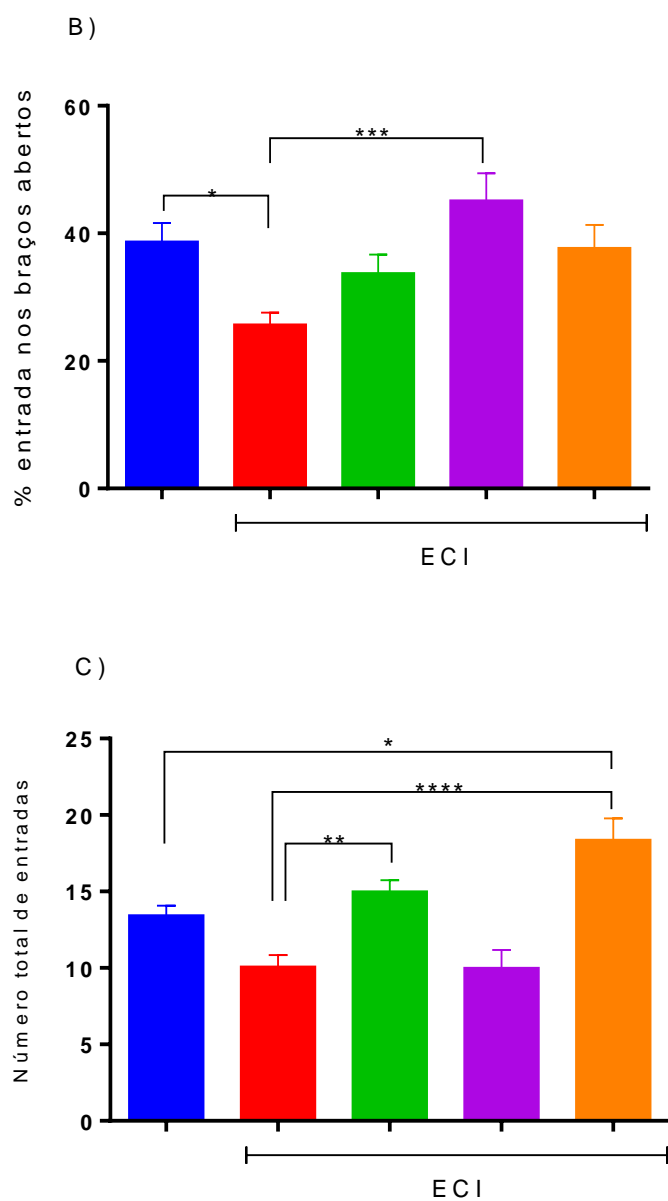
#### 5.1.4 Efeitos da administração da LIRA ou FXT, sobre as alterações comportamentais em modelo de depressão induzido pelo estresse crônico imprevisível no teste de labirinto em cruz elevada (plus maze).

No teste de labirinto em cruz elevada, nossos resultados mostraram que não houve diferença significativa no percentual de tempo de permanência nos braços abertos entre nenhum dos grupos (Fig. 19A). No entanto, com relação ao percentual de entradas nos braços abertos (Fig.19B) houve redução significativa do grupo CTL para o grupo ECI, [F(4,41)=5.018 P=0,0022], e o grupo tratado com LIRA na maior dose mostrou um aumento do percentual de entradas nos braços abertos quando comparado ao grupo ECI  $p < 0,001$ , enquanto que o grupo ECI + FXT não apresentou diferença significativa com o grupo ECI. O total de entradas observado na Fig.19C não apresentou diferença significativa entre o grupo CTL e o grupo ECI. Entretanto, houve um aumento do total de entradas do grupo ECI para o grupo ECI + LIRA 120, [F(4,41)=12.84 P<0,0001]. Resultado semelhante foi observado no grupo ECI quando comparado com o grupo ECI + FXT com  $p < 0,0001$

**Fig. 19A.** Alteração do percentual do tempo de permanência nos braços abertos; **19B.** % de entrada nos braços abertos e **19C.** número total de entradas nos animais submetidos ao modelo de depressão induzida pelo estresse crônico imprevisível e submetidos ao tratamento com LIRA ou FXT.



CTL-controle; ECI-estresse crônico imprevisível; LIRA-liraglutida; FXT-fluoxetina

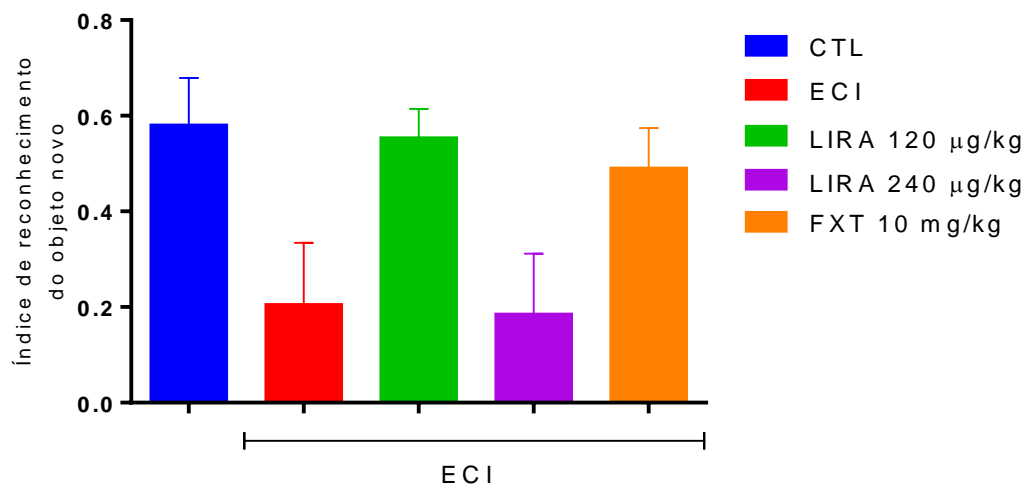


Os animais foram submetidos ao ECI por 21 dias. Entre o 15<sup>o</sup> e 21<sup>o</sup> dias de tratamento, os animais receberam LIRA (120µg/kg; s.c) ou LIRA (240 µg/kg; s.c.) ou FXT (10 mg/kg; v.o.). Cada barra representa a média ± erro padrão da média (SEM) (n = 08-10 animais por grupo) de acordo *one-way* ANOVA seguido pelo teste de *post hoc* Tukey. \* p < 0,05, \*\* p<0,01, \*\*\* p<0,001, \*\*\*\* p<0,0001

### 5.1.5 Efeitos da administração da LIRA ou FXT, sobre as alterações comportamentais em modelo de depressão induzido pelo estresse crônico imprevisível no teste de teste de reconhecimento de objeto novo.

No teste de reconhecimento de objetos, o estresse crônico imprevisível não promoveu diminuição significativa do grupo ECI quando comparado ao grupo controle  $F(4,53)=3,369$   $P= 0,0157$ . Não houve diferença no déficit de memória de curta duração com índice de reconhecimento de objetos no grupo ECI e nem os grupos tratados com LIRA 120 e LIRA 240, como também o grupo tratado com FXT. O grupo ECI + LIRA 120 e ECI + FXT apresentaram uma tendência no que se refere ao aumento do índice de reconhecimento de objeto novo em relação ao grupo estressado. A redução da diferença da média do grupo ECI em relação ao controle é de 0,3755 (64,55%). E a diferença da média do grupo ECI e ECI + LIRA 120 é de -0,3485 (62,82%).

**Fig. 20.** Alteração do índice de reconhecimento do objeto novo nos animais submetidos ao modelo de depressão induzida pelo estresse crônico imprevisível e submetidos ao tratamento com LIRA ou FXT.



CTL-controle; ECI-estresse crônico imprevisível; LIRA-liraglutida; FXT-fluoxetina

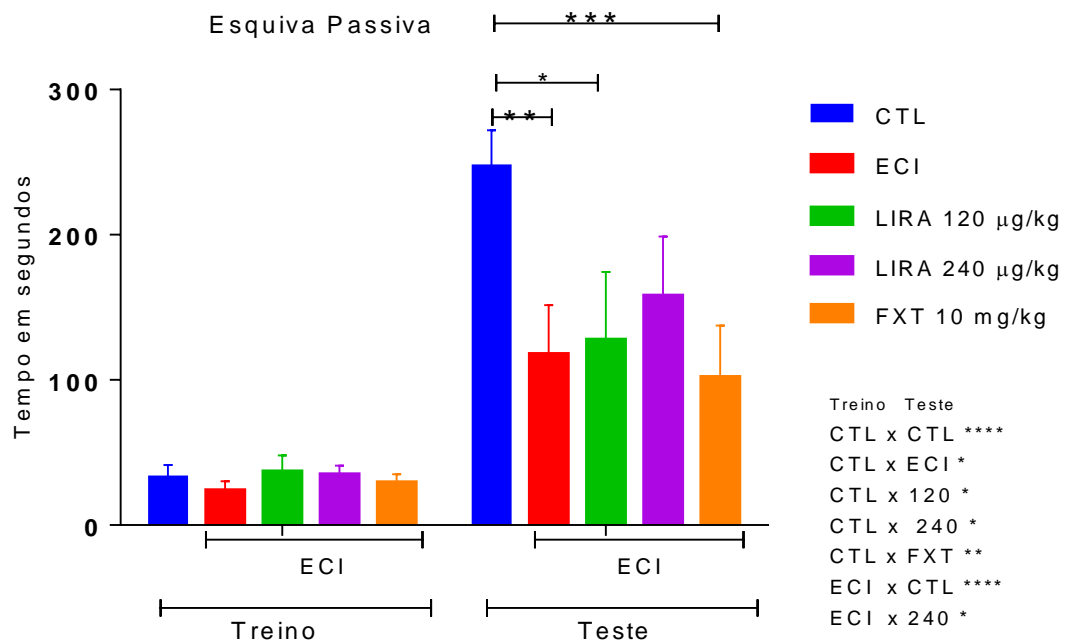
Os animais foram submetidos ao ECI por 21 dias. Entre o 15<sup>o</sup> e 21<sup>o</sup> dias de tratamento, os animais receberam LIRA (120µg/kg; s.c) ou LIRA (240 µg/kg; s.c.) ou FXT (10 mg/kg; v.o.). Cada barra representa a média ± erro padrão da média (SEM) (n = 08-10 animais por grupo) de acordo *one-way* ANOVA seguido pelo teste de *post hoc* Tukey.



### 5.1.6 Efeitos da administração da LIRA ou FXT, sobre as alterações comportamentais em modelo de depressão induzido pelo estresse crônico imprevisível no teste de esquiva passiva.

No teste de esquiva passiva, nossos resultados mostraram que não houve diferença significativa no tempo (s) nos grupos entre si durante o treino (Fig.21). No entanto existe diferença significativa  $\{F(4,66)=2.677 P=0,0393\}$  do CTL do teste com todos os grupos do treino e do grupo ECI do teste com o grupo CTL (treino)  $F((1,66)=52,54 P < 0,0001$  e ECI do teste com o grupo ECI + LIRA 240 (treino)  $F(4,66)=3.024 P=0,0237$ . No teste, houve redução significativa do tempo do grupo CTL com relação ao grupo ECI,  $p < 0,01$ , CTL com relação ao grupo LIRA 120,  $p < 0,01$  e CTL com relação ao grupo FXT,  $p < 0,0001$  (Fig.21).

**Fig. 21** Alteração do tempo (s) do teste de esquiva passiva nos animais submetidos ao modelo de depressão induzida pelo estresse crônico imprevisível e submetidos ao tratamento com LIRA ou FXT.



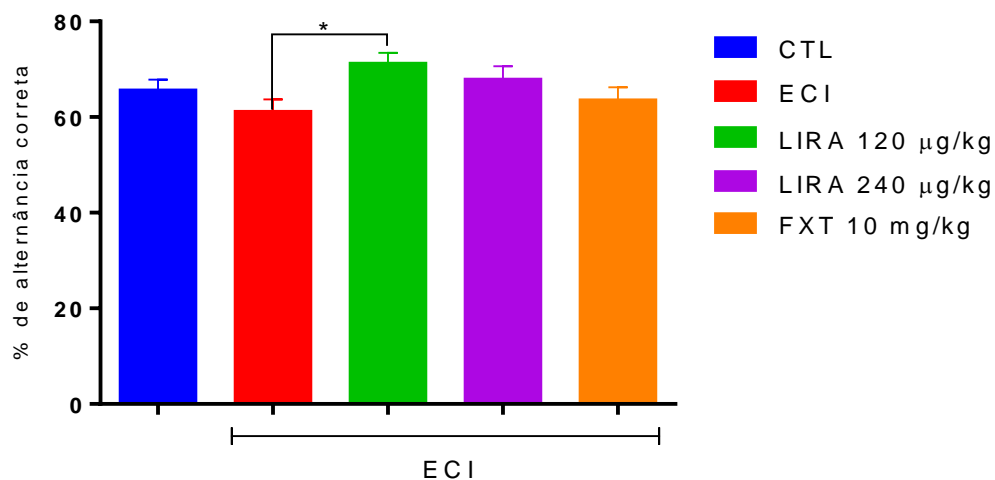
CTL-controle; ECI-estresse crônico imprevisível; LIRA-liraglutida; FXT-fluoxetina

Os animais foram submetidos ao ECI por 21 dias. Entre o 15º e 21º dias de tratamento, os animais receberam LIRA (120µg/kg; s.c) ou LIRA (240 µg/kg; s.c.) ou FXT (10 mg/kg; v.o.). Cada barra representa a média ± erro padrão da média (SEM) (n = 07-09 animais por grupo) de acordo two-way ANOVA seguido pelo teste de *post hoc Bonferroni's*. \* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$ ; \*\*\* $p < 0,001$ .

### 5.1.7 Efeitos da administração da LIRA ou FXT, sobre as alterações comportamentais em modelo de depressão induzido pelo estresse crônico imprevisível no teste de labirinto em Y (Y-maze).

No teste de labirinto em Y (Fig.22), o grupo CTL não apresentou diferença significativa com o grupo ECI, porém o grupo ECI tratado com LIRA 120 mostrou resultado significativo no % de alternância correta quando comparado com o grupo ECI apenas  $F(4,60)=2.754$   $P=0,360$ . O grupo ECI + LIRA 240 não mostrou resultado significativo em relação ao ECI, como também o grupo ECI + FXT em relação ao ECI.

**Fig.22. Alteração de memória operacional nos animais submetidos ao modelo de depressão por estresse crônico imprevisível e submetidos ao tratamento com LIRA ou FXT.**



CTL-controle; ECI-estresse crônico imprevisível; LIRA-liraglutida; FXT-fluoxetina

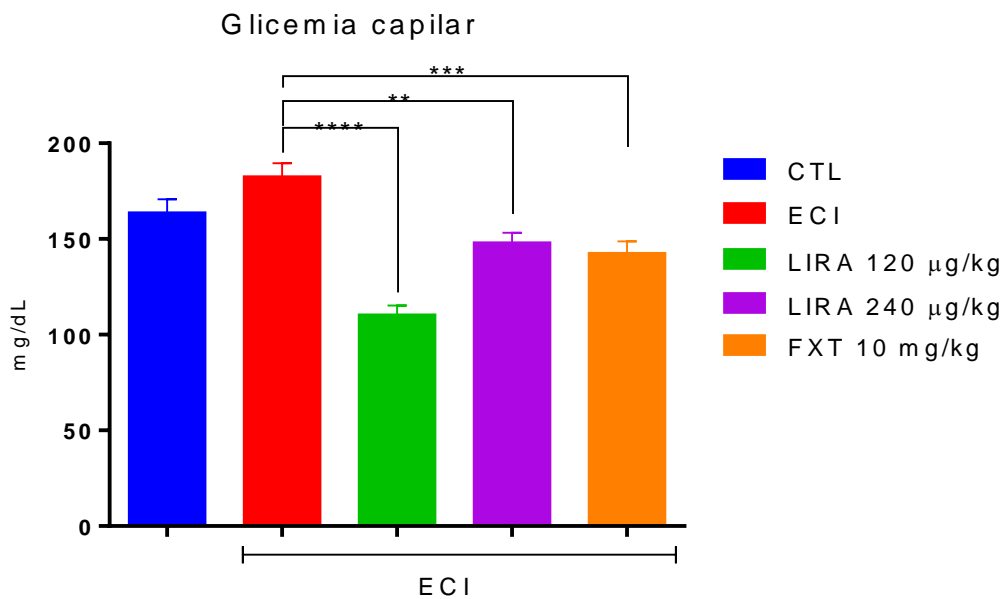
Os animais foram submetidos ao ECI por 21 dias. Entre o 15<sup>o</sup> e 21<sup>o</sup> dias de tratamento, os animais receberam LIRA (120µg/kg; s.c) ou LIRA (240 µg/kg; s.c.) ou FXT (10 mg/kg; v.o.). Cada barra representa a média ± erro padrão da média (SEM) (n = 13-17 animais por grupo) de acordo com one-way ANOVA seguido pelo teste de *post hoc* Tukey's. \* $p<0,05$ .

## 5.2 Avaliação da glicemia, peso das adrenais e peso dos animais.

### 5.2.1 Efeitos da administração da LIRA ou FXT, sobre a glicemia capilar verificada em modelo de depressão induzido pelo estresse crônico imprevisível.

Na verificação da glicemia capilar [ $F(4,28) = 18.17$   $P < 0,0001$ ], nossos resultados mostraram que não houve diferença significativa no valor da glicemia entre os grupos CTL e ECI Fig.23. Houve uma diminuição da glicemia do grupo ECI + LIRA 120 quando comparado ao grupo ECI como também ao grupo CTL,  $p < 0,0001$ . Semelhantemente o grupo ECI + LIRA 240 reduziu a glicemia em relação ao grupo ECI,  $p < 0,01$ . Verificamos que o grupo ECI + FXT diminuiu a glicemia comparado ao grupo CTL,  $p < 0,001$ .

**Fig.23 Glicemia capilar dos animais submetidos ao modelo de depressão induzida por estresse crônico imprevisível e submetidos ao tratamento com LIRA ou FXT.**



CTL-controle; ECI-estresse crônico imprevisível; LIRA-liraglutida; FXT-fluoxetina

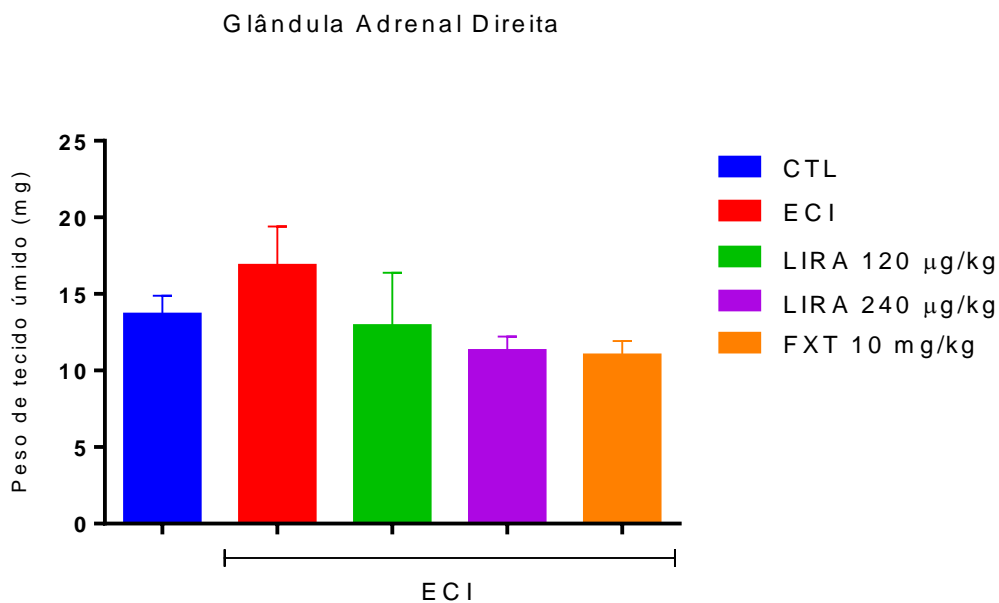
Os animais foram submetidos ao ECI por 21 dias. Entre o 15º e 21º dias de tratamento, os animais receberam LIRA (120µg/kg; s.c) ou LIRA (240 µg/kg; s.c.) ou FXT (10 mg/kg; v.o. Cada barra representa a média ± erro padrão da média (SEM) (n = 05-07 animais por grupo) de acordo com one-way ANOVA seguido pelo teste de *post hoc Tukey's*. \*\* $p < 0,01$ ; \*\*\* $p < 0,001$ ; \*\*\*\* $p < 0,0001$ .

### 5.2.2 Efeitos da administração da LIRA ou FXT, sobre o peso das adrenais verificados em modelo de depressão induzido pelo estresse crônico imprevisível.

Nossos resultados mostraram que não houve diferença significativa entre os grupos com relação ao peso da glândula adrenal direita [ $F(4,26)=1.412$   $P=0,2578$ ] Fig.24A. Porém, em relação ao peso da glândula adrenal esquerda, os resultados mostraram um aumento da glândula adrenal esquerda no grupo ECI e uma reversão do peso quando foram tratados com LIRA 120  $p < 0,01$  e LIRA 240  $p < 0,05$  [ $F(4,28)=5.770$   $P=0,0016$ ]. O grupo ECI + FXT não apresentou diferença significativa em relação ao grupo ECI.

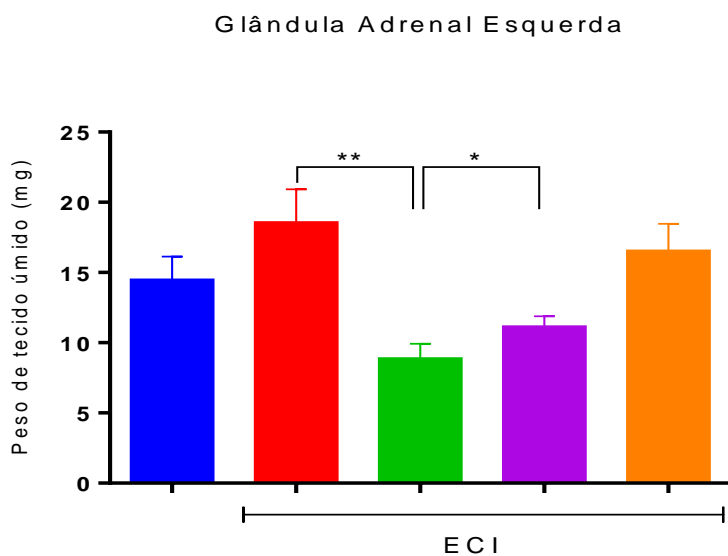
**Fig.24A e 24B** Peso das adrenais direita e esquerda respectivamente dos animais submetidos ao modelo de depressão induzida por estresse crônico imprevisível e tratados com LIRA ou FXT.

A)



CTL-controle; ECI-estresse crônico imprevisível; LIRA-liraglutida; FXT-fluoxetina

B)



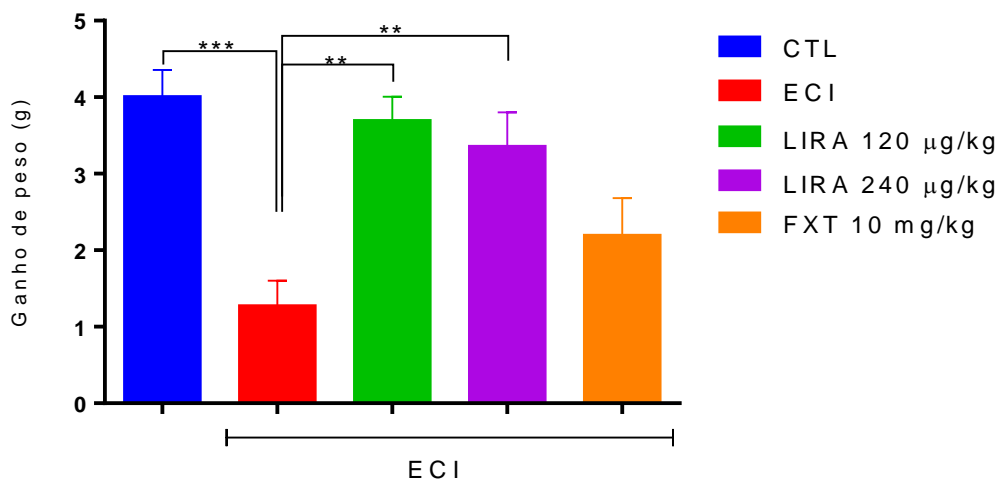
CTL-controle; ECI-estresse crônico imprevisível; LIRA-liraglutida; FXT-fluoxetina

Os animais foram submetidos ao ECI por 21 dias. Entre o 15<sup>o</sup> e 21<sup>o</sup> dias de tratamento, os animais receberam LIRA (120 $\mu$ g/kg; s.c) ou LIRA (240  $\mu$ g/kg; s.c.) ou FXT (10 mg/kg; v.o.). No 22<sup>o</sup> dia foram eutanasiados e retirados hipocampo e córtex pré frontal. Cada barra representa a média  $\pm$  erro padrão da média (SEM) (n = 06-07 animais por grupo) de acordo com one-way ANOVA seguido pelo teste de *post hoc* Tukey's. \*p<0,05; \*\*p<0,01.

### 5.2.3 Efeitos da administração da LIRA ou FXT, sobre a variação do ganho de peso dos animais verificado em modelo de depressão induzido pelo estresse crônico imprevisível.

Nosso resultado mostrou diferença significativa entre o grupo CTL e ECI,  $F(4,27)=8.493$   $P=0,0001$ . Os grupos ECI tratados com LIRA 120 e LIRA 240, como mostra a Fig.25, conseguiram reverter o ganho de peso (g) quando comparados com o grupo apenas estressado (ECI),  $p < 0,01$ . No entanto não foi encontrado diferença significativo entre o grupo ECI e o grupo tratado com FXT.

**Fig.25** Ganho de peso dos animais submetidos ao modelo de depressão induzida por estresse crônico imprevisível e tratados com LIRA ou FXT.



CTL-controle; ECI-estresse crônico imprevisível; LIRA-liraglutida; FXT-fluoxetina

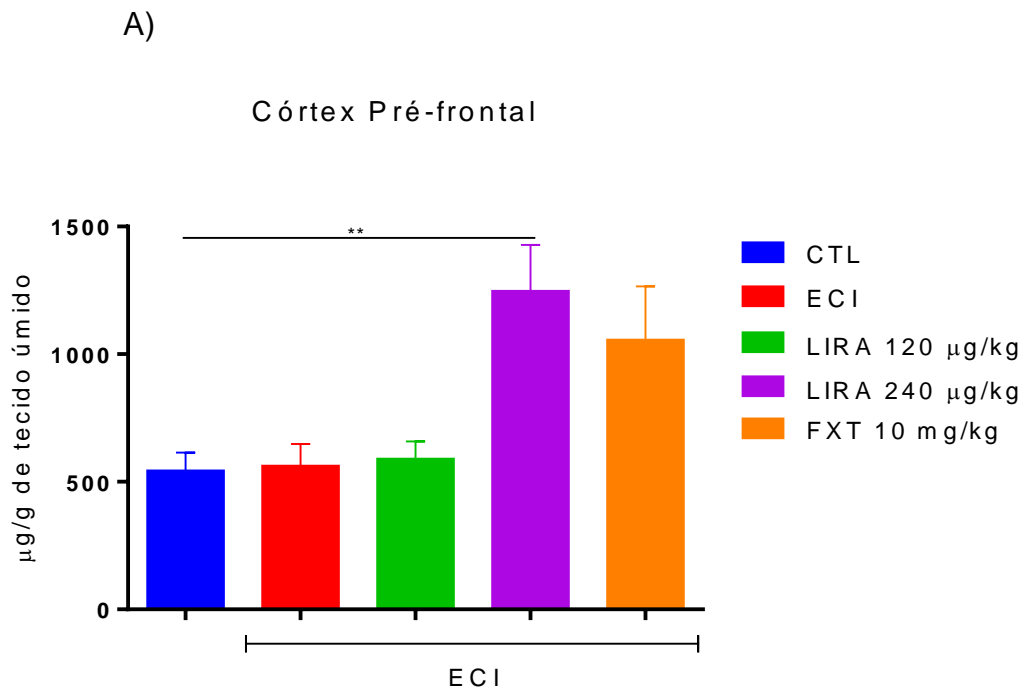
Os animais foram submetidos ao ECI por 21 dias. Entre o 15<sup>o</sup> e 21<sup>o</sup> dias de tratamento, os animais receberam LIRA (120µg/kg; s.c) ou LIRA (240 µg/kg; s.c.) ou FXT (10 mg/kg; v.o.). No 22<sup>o</sup> dia foram eutanasiados e retirados hipocampo e córtex pré frontal. Cada barra representa a média ± erro padrão da média (SEM) (n = 07-08 animais por grupo) de acordo com one-way ANOVA seguido pelo teste de *post hoc* Tukey's. \*\* $p < 0,01$ ; \*\*\* $p < 0,001$ .

### 5.3 Avaliação Neuroquímica

#### 5.3.1 Efeitos do ECI, LIRA e FXT sobre as concentrações de glutatona reduzida em áreas cerebrais de camundongos.

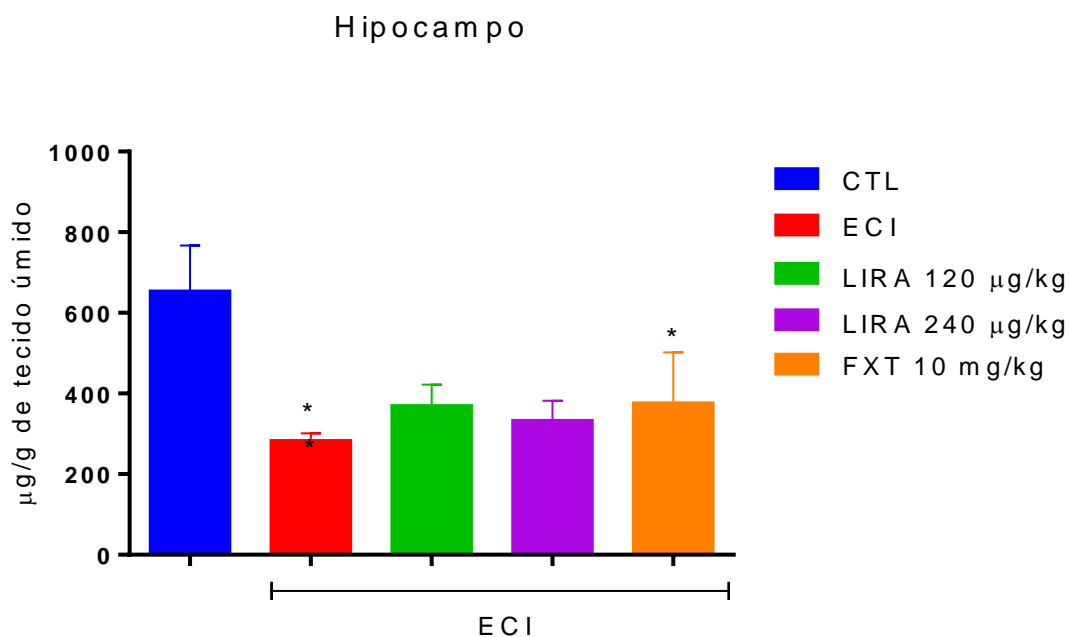
Conforme Fig.26A, os resultados mostraram que não houve diferença significativa dos níveis de expressão entre os grupos CTL e ECI realizados na área do córtex pré-frontal. Também entre os grupos ECI não foi apresentado resultado significativo entre os mesmos. No entanto, houve um aumento significativo do grupo ECI + LIRA 240 quando comparado com o grupo CTL  $p < 0,01$ . Na Fig.26B, na área do hipocampo, os resultados mostram uma redução significativa de GSH no grupo ECI quando comparado ao grupo CTL  $p < 0,05$ . Resultado semelhante também foi observado no grupo ECI + FXT quando comparado ao grupo CTL,  $p < 0,05$ .

**Fig.26 Expressão de glutatona reduzida (GSH) no córtex pré-frontal 26A e hipocampo 2B dos animais submetidos ao modelo de depressão induzida por estresse crônico imprevisível e tratados com LIRA ou FXT.**



CTL-controle; ECI-estresse crônico imprevisível; LIRA-liraglutida; FXT-fluoxetina

B)



CTL-controle; ECI-estresse crônico imprevisível; LIRA-liraglutida; FXT-fluoxetina

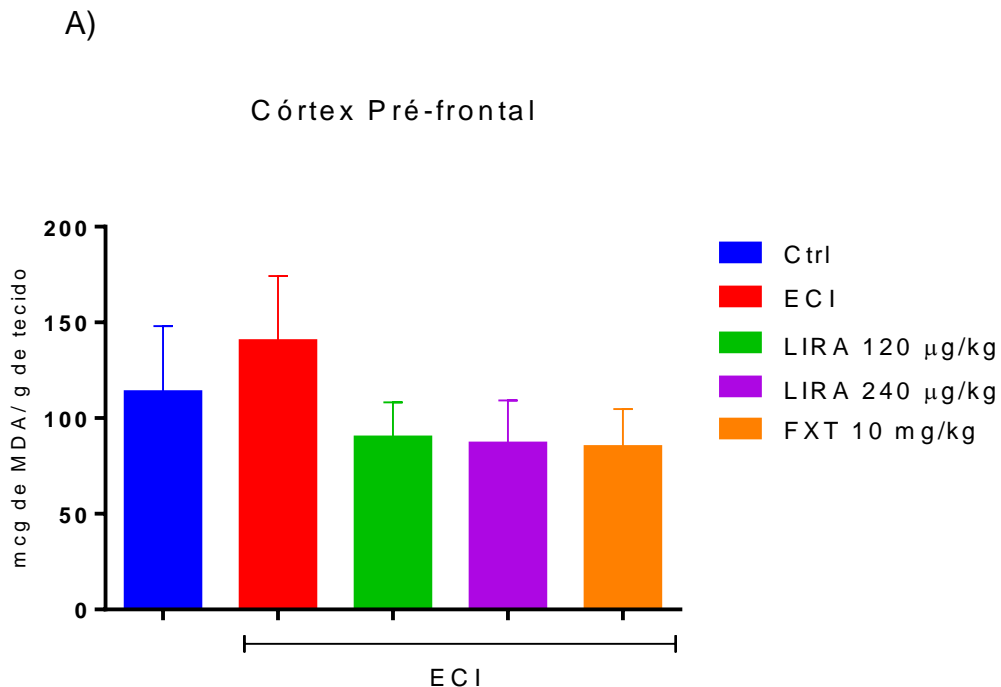
Os animais foram submetidos ao ECI por 21 dias. Entre o 15<sup>o</sup> e 21<sup>o</sup> dias de tratamento, os animais receberam LIRA (120μg/kg; s.c) ou LIRA (240 μg/kg; s.c.) ou FXT (10 mg/kg; v.o.). No 22<sup>o</sup> dia foram eutanasiados e retirados hipocampo e córtex pré frontal. Cada barra representa a média ± erro padrão da média (SEM) (n = 05-14 animais por grupo) de acordo com one-way ANOVA seguido pelo teste de *post hoc* Tukey's. \*p<0,05; \*\*p<0,01.



### 5.3.2 Efeitos do ECI, LIRA e FXT sobre os níveis de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) em áreas cerebrais de camundongos.

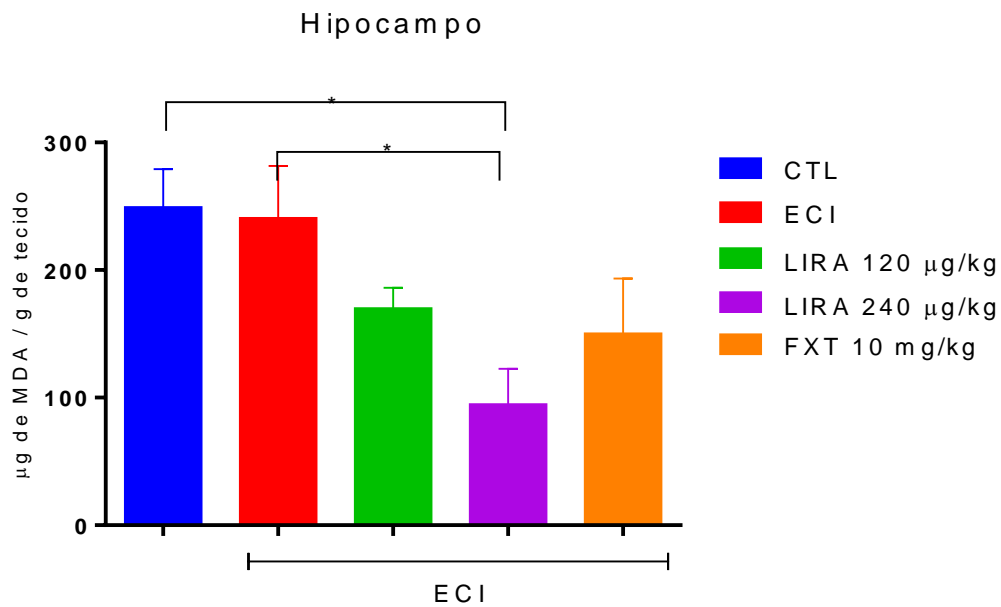
Nossos resultados não mostraram que não houve diferença significativa entre os grupos CTL e ECI. Nem tampouco entre o grupo ECI e os grupos tratados com LIRA 120 ou LIRA 240 ou FXT como apresentado na Fig.27A que representa a área do córtex pré-frontal. Podemos observar na Fig.27B, representando a área do hipocampo que não apresentou resultado significativo entre o grupo CTL e o grupo ECI, porém observamos uma redução significativa do grupo LIRA 240 em relação ao CTL  $p < 0,05$ , assim como observamos também uma diminuição dos níveis de TBARS do grupo LIRA 240 quando comparado com o grupo ECI  $p < 0,05$ . Quanto ao grupo ECI + FXT, também não apresentou resultado significativo em relação ao grupo CTL.

**Fig.27 Expressão de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico no córtex pré-frontal 27A e hipocampo 27B dos animais submetidos ao modelo de depressão induzida por estresse crônico imprevisível e tratados com LIRA ou FXT.**



CTL-controle; ECI-estresse crônico imprevisível; LIRA-liraglutida; FXT-fluoxetina

B)



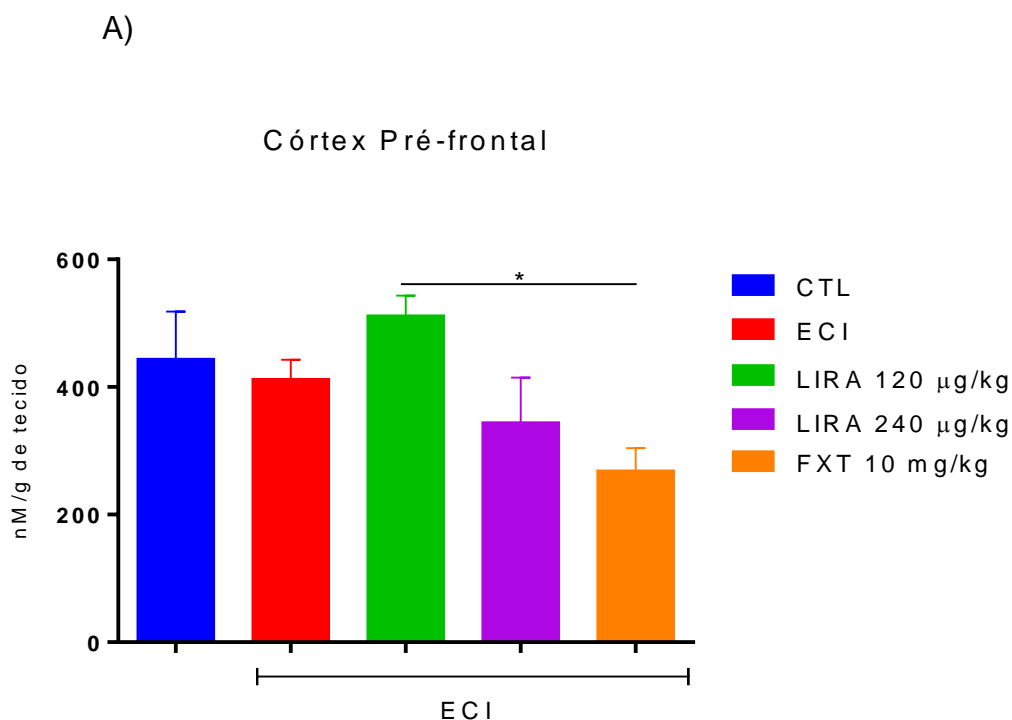
CTL-controle; ECI-estresse crônico imprevisível; LIRA-liraglutida; FXT-fluoxetina

Os animais foram submetidos ao ECI por 21 dias. Entre o 15<sup>o</sup> e 21<sup>o</sup> dias de tratamento, os animais receberam LIRA (120µg/kg; s.c) ou LIRA (240 µg/kg; s.c.) ou FXT (10 mg/kg; v.o.). No 22<sup>o</sup> dia foram eutanasiados e retirados hipocampo e córtex pré frontal. Cada barra representa a média ± erro padrão da média (SEM) (n = 05-06 animais por grupo) de acordo com one-way ANOVA seguido pelo teste de *post hoc* Tukey's. \*p<0,05.

### 5.3.3 Efeitos do ECI, LIRA e FXT sobre as concentrações de nitrito em áreas cerebrais de camundongos.

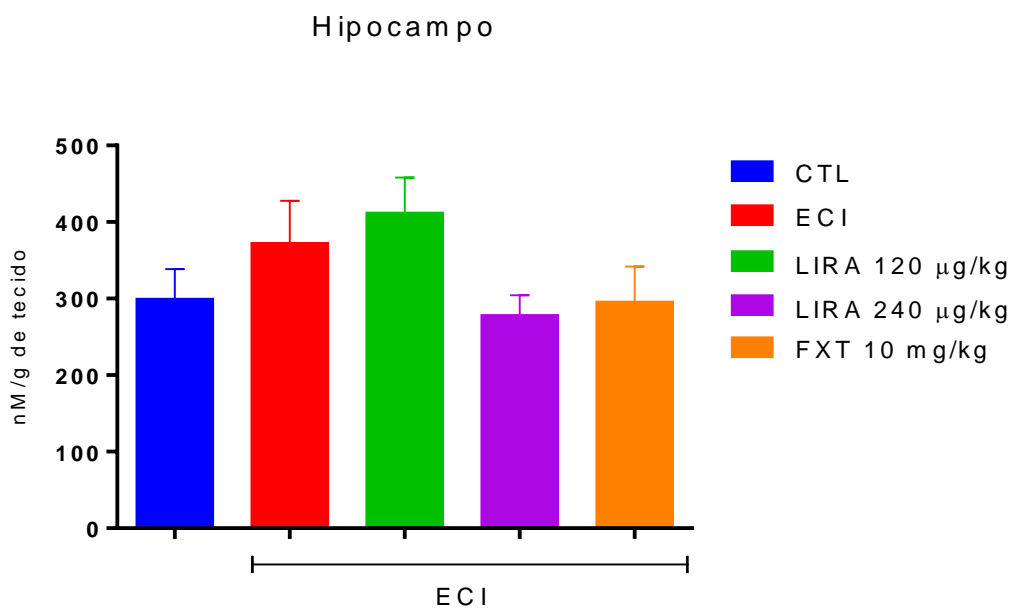
Na Fig.28A que representa os níveis de nitrito na área pré-frontal, podemos observar que não apresentou resultado significativo entre os grupos CTL e ECI. Os grupos tratados com LIRA 120 ou LIRA 240 ou FXT não demonstraram diferença significativa com relação ao grupo somente ECI. Houve um aumento dos níveis de nitrito do grupo LIRA 120 quando comparado com o grupo ECI + FXT,  $p < 0,05$ . Na Fig.28B, os resultados dos níveis de nitrito no hipocampo não se mostraram significativos entre nenhum dos grupos apresentados.

**Fig.28** Expressão dos níveis de nitrito no córtex pré-frontal (28A) e hipocampo (28B) dos animais submetidos ao modelo de depressão induzida por estresse crônico imprevisível e tratados com LIRA ou FXT.



CTL-controle; ECI-estresse crônico imprevisível; LIRA-liraglutida; FXT-fluoxetina

B)



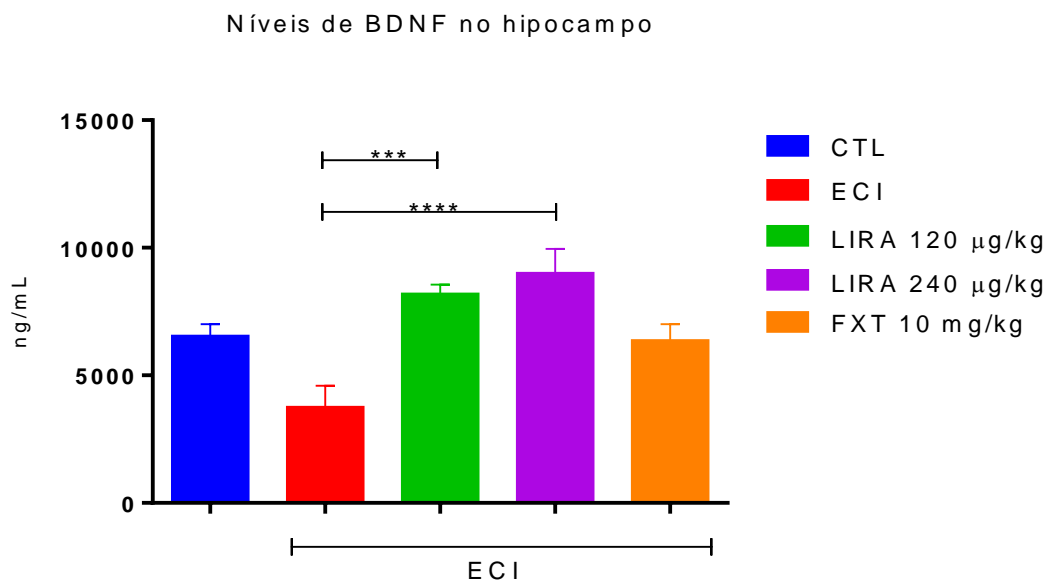
CTL-controle; ECI-estresse crônico imprevisível; LIRA-liraglutida; FXT-fluoxetina

Os animais foram submetidos ao ECI por 21 dias. Entre o 15<sup>o</sup> e 21<sup>o</sup> dias de tratamento, os animais receberam LIRA (120µg/kg; s.c) ou LIRA (240 µg/kg; s.c.) ou FXT (10 mg/kg; v.o.). No 22<sup>o</sup> dia foram eutanasiados e retirados hipocampo e córtex pré frontal. Cada barra representa a média ± erro padrão da média (SEM) (n = 04-06 animais por grupo) de acordo com one-way ANOVA seguido pelo teste de *post hoc* Tukey's.

### 5.3.4 Efeitos do ECI, LIRA e FXT sobre as concentrações de BDNF em área cerebral de camundongos.

Na Fig.29, podemos observar que os resultados não demonstraram diferença significativa entre os grupos CTL e ECI, apesar da tendência do grupo ECI ser menor. Todavia, houve um aumento significativo da concentração de BDNF do grupo ECI + LIRA 120 quando comparado com o grupo ECI [ $F(4,31)=8.952$   $P < 0,0001$ ]. Semelhantemente, podemos observar um aumento das concentrações de BDNF no grupo ECI + LIRA 240 em relação ao grupo ECI  $p < 0,0001$ . Ainda podemos dizer que o grupo ECI tratado com FXT não demonstrou aumento significativo quando comparado ao grupo ECI apenas.

**Fig.29** Concentrações dos níveis de BDNF em área cerebral do hipocampo dos animais submetidos ao modelo de depressão induzida por estresse crônico imprevisível e tratados com LIRA ou FXT.



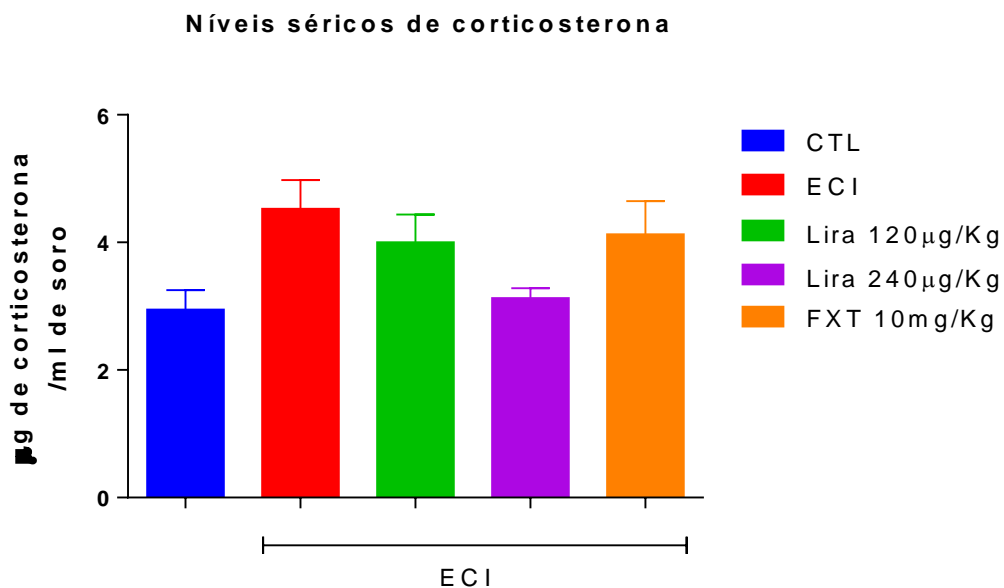
CTL-controle; ECI-estresse crônico imprevisível; LIRA-liraglutida; FXT-fluoxetina

Os animais foram submetidos ao ECI por 21 dias. Entre o 15º e 21º dias de tratamento, os animais receberam LIRA (120µg/kg; s.c.) ou LIRA (240 µg/kg; s.c.) ou FXT (10 mg/kg; v.o.). No 22º dia foram eutanasiados e retirados hipocampo. Cada barra representa a média ± erro padrão da média (SEM) (n = 05-09 animais por grupo) de acordo com one-way ANOVA seguido pelo teste de *post hoc* Tukey's. \*\*\* $p < 0,001$ ; \*\*\*\* $p < 0,0001$ .

### 5.3.5 Efeitos do ECI, LIRA e FXT sobre as concentrações de corticosterona sérica de camundongos.

Quanto a Fig.30, podemos observar uma tendência ao aumento do grupo ECI quando comparado com o grupo CTL, porém não foi significativo em relação dos níveis séricos de corticosterona [ $F(4,23)=2,744$   $P=0.0530$ ]. Nenhum dos grupos ECI tratados com LIRA 120 ou LIRA 240 ou FXT apresentou diferença significativa em relação ao grupo ECI apenas. Porém, quando comparamos matematicamente a concentração de corticosterona do grupo LIRA 240, significa que houve uma diminuição desse hormônio em 31% quando comparado com o grupo ECI apenas.

**Fig.30** Concentrações dos níveis séricos de Corticosterona em área cerebral do hipocampo dos animais submetidos ao modelo de depressão induzida por estresse crônico imprevisível e tratados com LIRA ou FXT.



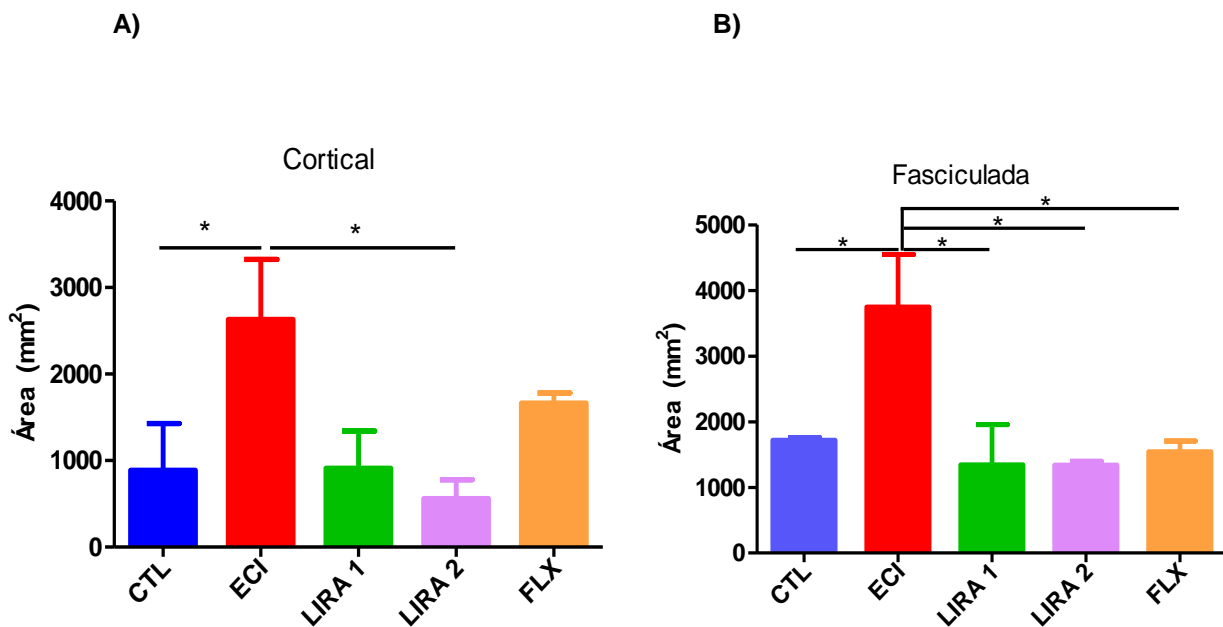
CTL-controle; ECI-estresse crônico imprevisível; LIRA-liraglutida; FXT-fluoxetina

Os animais foram submetidos ao ECI por 21 dias. Entre o 15º e 21º dias de tratamento, os animais receberam LIRA (120µg/kg; s.c) ou LIRA (240 µg/kg; s.c.) ou FXT (10 mg/kg; v.o.). No 22º dia foram eutanasiados e retirados hipocampo e córtex pré frontal. Cada barra representa a média ± erro padrão da média (SEM) (n = 05-09 animais por grupo) de acordo com one-way ANOVA seguido pelo teste de *post hoc* Tukey's.

### 5.3.6 Histologia das Adrenais por eosina hematoxilina

Para avaliar o estresse crônico imprevisível e com o tratamento de LIRA e FXT foi realizado histologia das adrenais coradas com eosina/hematoxilina, fotografadas (Nikon *ECLIPSE N<sub>i</sub>*; 10x) e mensuradas no *image J* em mm<sup>2</sup>. A Fig. 31A demonstrou que houve aumento com diferença significativa da zona cortical da adrenal de animais submetidos ao ECI quando comparado ao grupo controle [ $F(4,20)=3.409$   $P=0.0279$ ]. No tratamento com LIRA 240 houve redução significativa da zona cortical quando comparado com o grupo ECI. Na Fig. 31B observamos um aumento significativo da zona fasciculada no grupo ECI quando comparado com o grupo controle e que os tratamentos com LIRA 120, 240 e FXT conseguiram reduzir significativamente a área da zona fasciculada [ $F(4,19)=4,710$   $P=0.0082$ ]. Fig. 31C Fotomicrografias das adrenais.

**Fig 31. Medida da área cortical (Fig.31A) e fasciculada (Fig.31B) em mm<sup>2</sup> do córtex da adrenal de animais submetidos ao modelo de depressão induzida por estresse crônico imprevisível e tratados com LIRA ou FXT.**

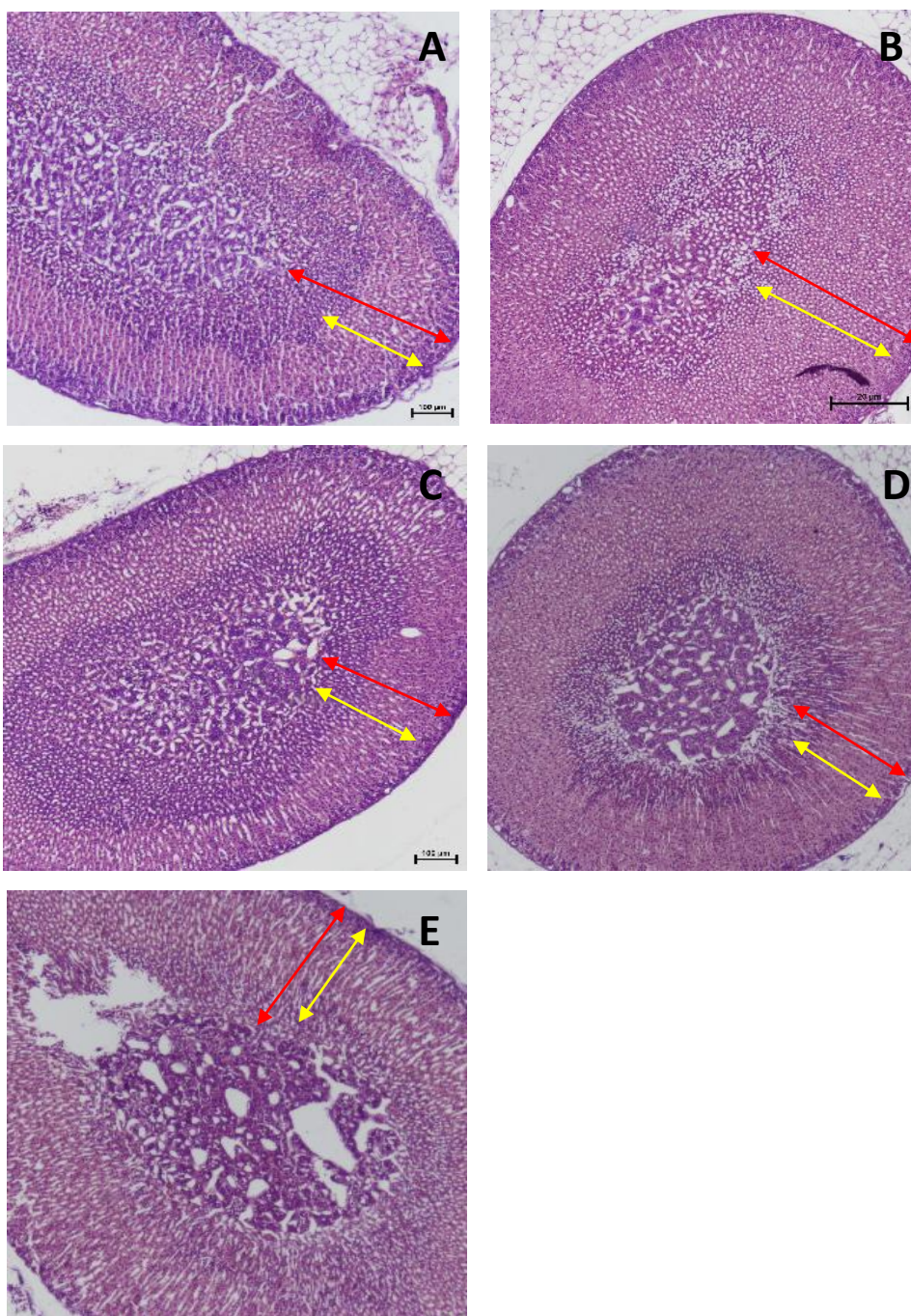


(CTL-controle; ECI-estresse crônico imprevisível; LIRA-liraglutida; FXT-fluoxetina)

Os animais foram submetidos ao ECI por 21 dias. Entre o 15<sup>o</sup> e 21<sup>o</sup> dias de tratamento, os animais receberam LIRA (120µg/kg; s.c) ou LIRA (240 µg/kg; s.c.) ou FXT (10 mg/kg; v.o.). No 22<sup>o</sup> dia foram eutanasiados, adrenais dissecadas e coradas com eosina/hematoxilina. Cada barra representa a média ± erro padrão da média (SEM) (n = 04-06 animais por grupo) de acordo com one-way ANOVA seguido pelo teste de *post hoc* *Dunnets* \* $p<0,05$ .



**Fig.31C** – Fotomicrografias das adrenais esquerdas.



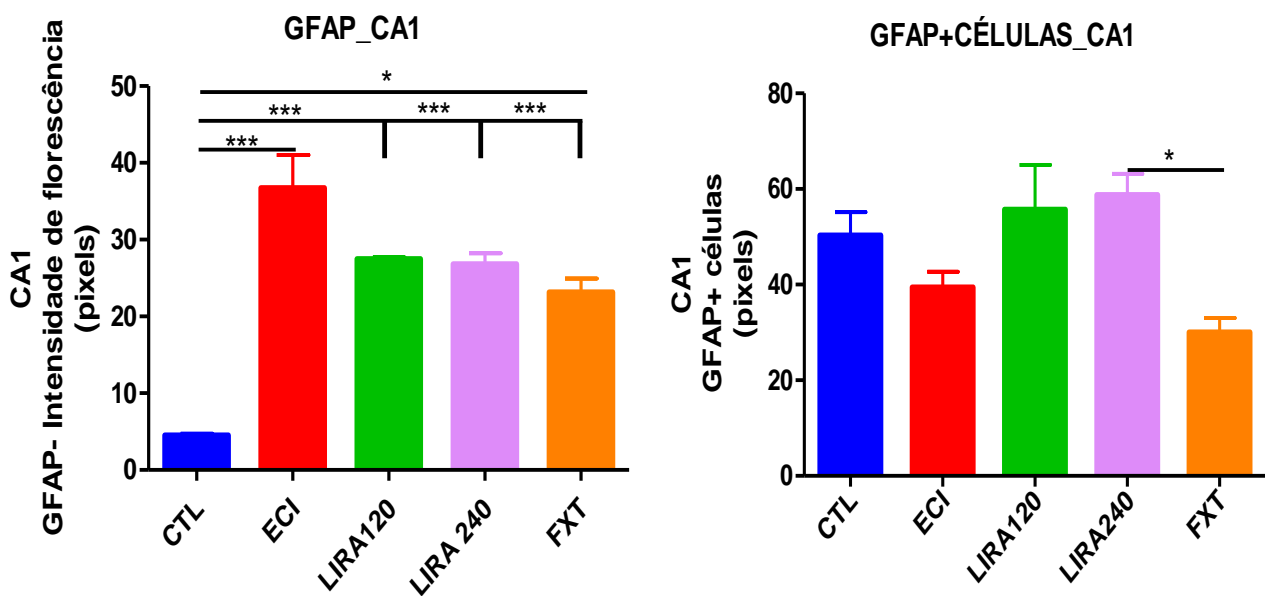
Representação das imagens: **A**-controle; **B**-estresse crônico imprevisível; **C**-ECI+LIRA 120; **D**-ECI+LIRA 240; **E**-ECI+FXT. A seta vermelha indica o córtex da adrenal e a seta amarela a zona fasciculada.

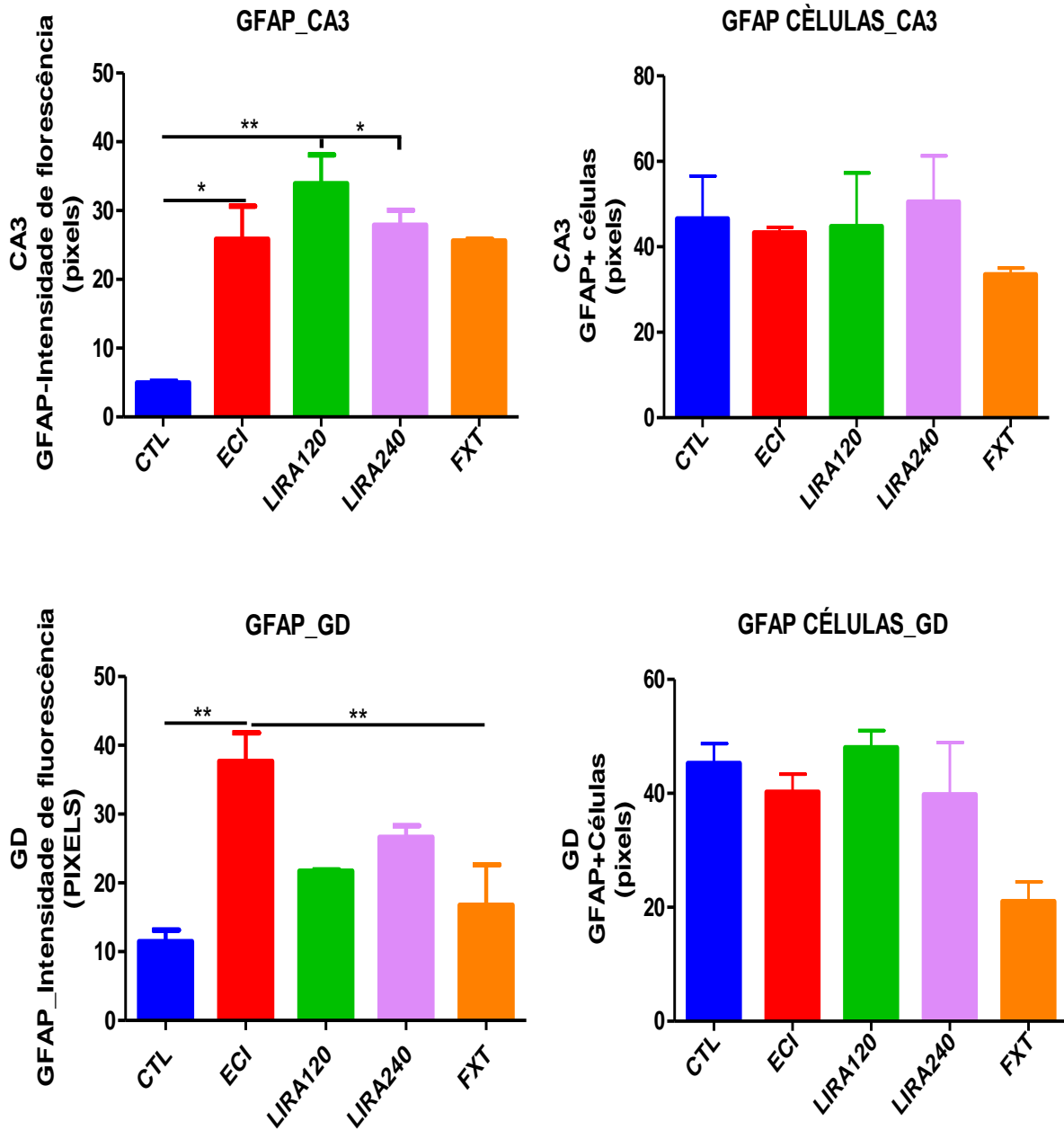


### 5.3.7 Proteína Ácida Fibrilar Glial – GFAP

A expressão do marcador de astrócitos GFAP (representada pela contagem total de pixels) no hipocampo (CA1, CA3 e GD) podem ser vistas na Fig. 32A. Observamos que em CA1, CA3 e GD houve aumento da intensidade de GFAP nos grupos de animais ECI com significância estatística representada respectivamente por CA1 [F(4,17)=35.16 P=0.0001]; CA3 [F(4,19)=5.571 P=0.0039] e GD [F(4,14)=7.654 P=0.0017]. A LIRA não produziu diferença estatisticamente importante nessas sub-regiões (CA1, CA3 e GD) com relação aos grupos somente ECI. De forma semelhante, com relação ao número de células nessas sub-regiões, não houve diferença significativa entre os grupos. Fig.32B Fotomicrografias.

Fig 32A. Imunofluorescência de GFAP e número de células (contagem em pixels) em astrócitos do hipocampo (regiões de CA1, CA3 e GD).

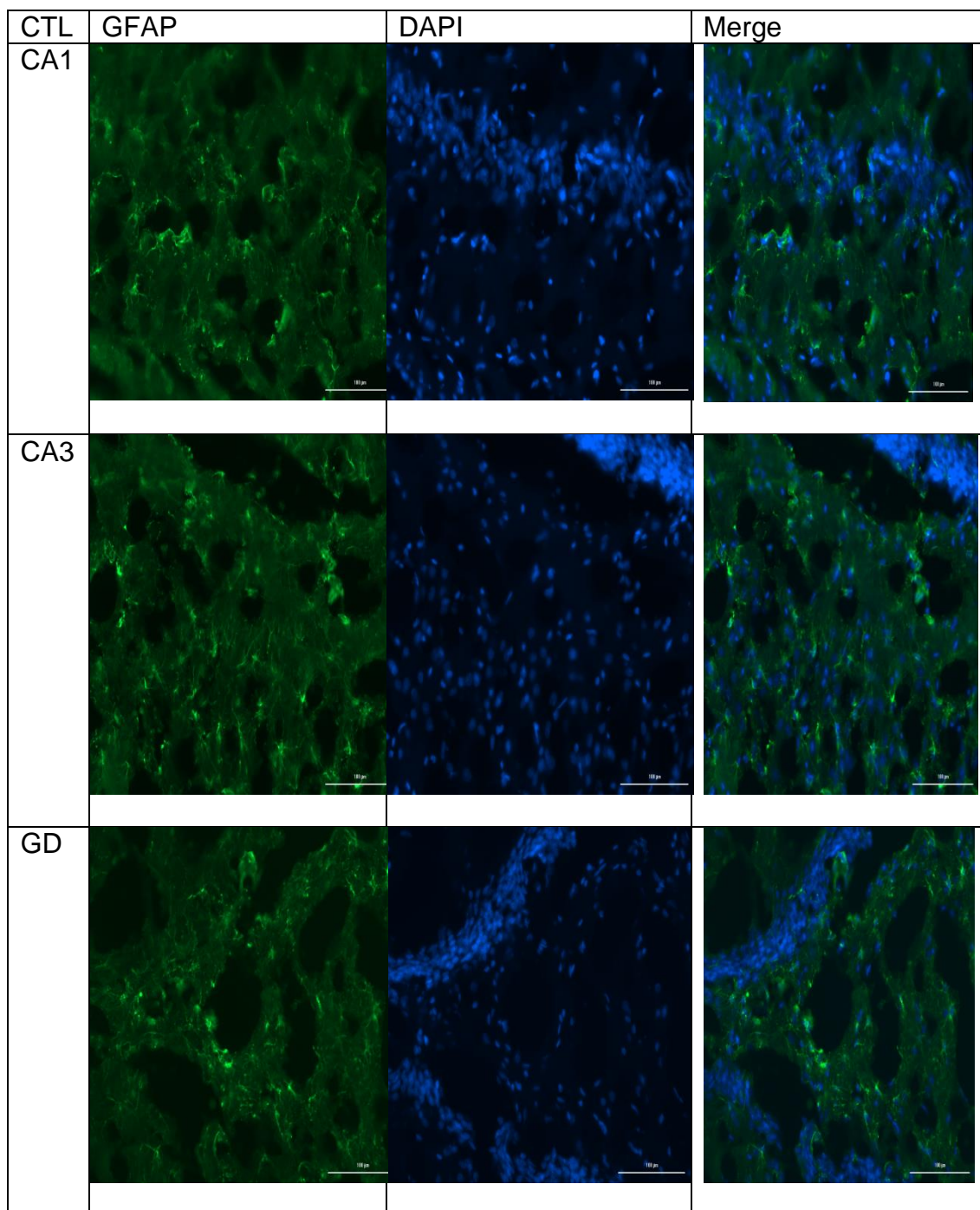




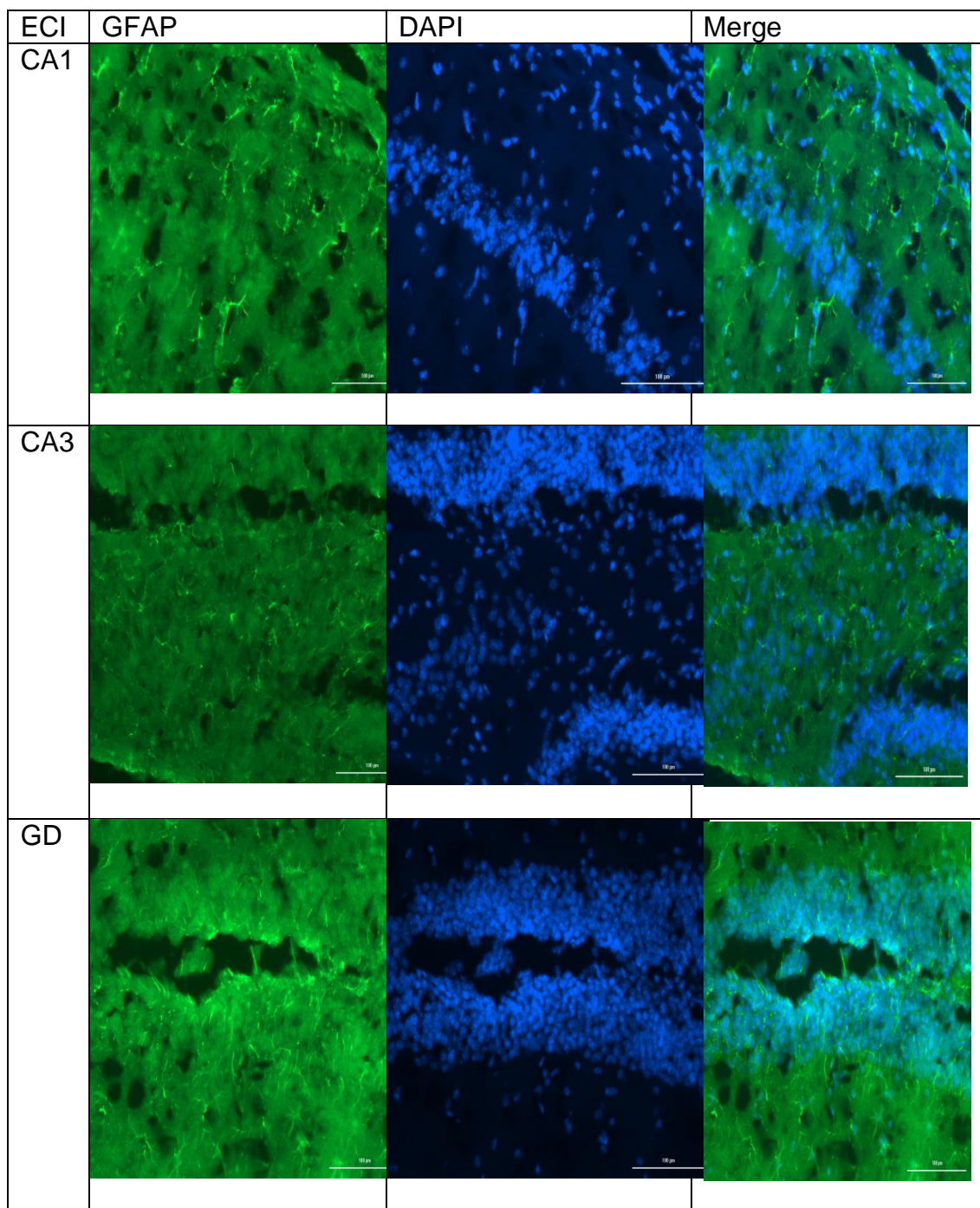
CTL-controle; ECI-estresse crônico imprevisível; LIRA-liraglutida; FXT-fluoxetina; GD-giro denteado.

Os animais foram submetidos ao ECI por 21 dias. Entre o 15º e 21º dias de tratamento, os animais receberam LIRA (120µg/kg; s.c) ou LIRA (240 µg/kg; s.c.) ou FXT (10 mg/kg; v.o.). No 22º dia foram anestesiados, perfundidos, seções cerebrais imunomarcadas para GFAP. Cada barra representa a média ± erro padrão da média (SEM) (n = 04-06 animais por grupo) de acordo com one-way ANOVA seguido pelo teste de *post hoc* Tukey's \*p<0,05; \*\*p<0,005; \*\*\*p<0,0005.

Fig.32B Imunofluorescência de GFAP (verde) e DAPI (azul) 40x

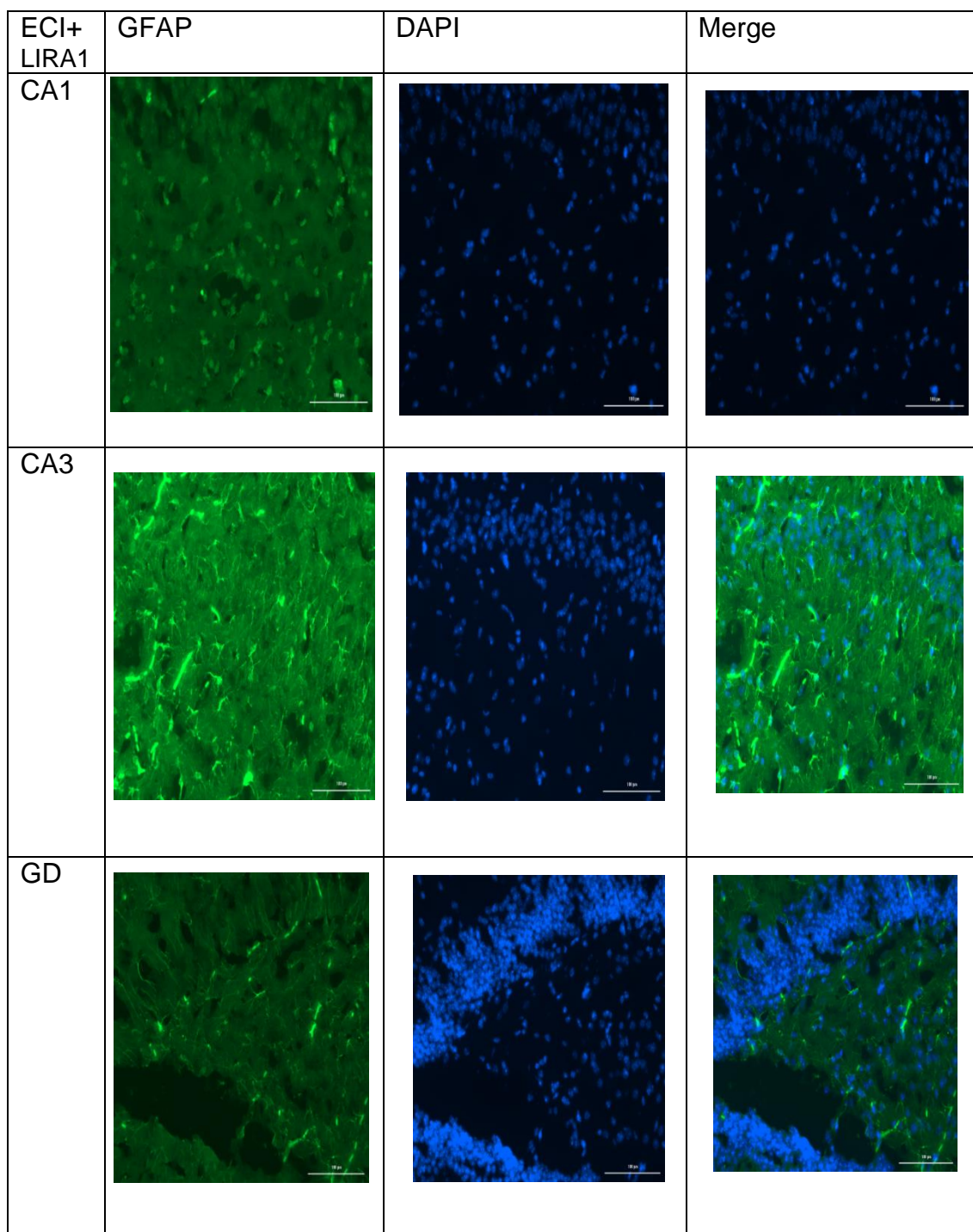


## Imunofluorescência de GFAP (verde) e DAPI (azul) 40x

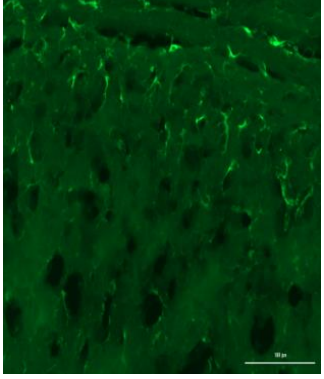
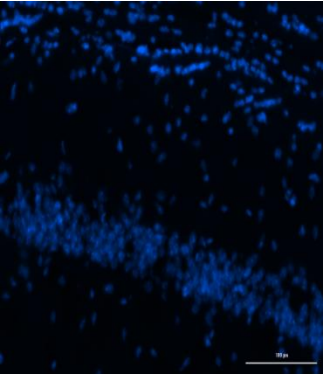
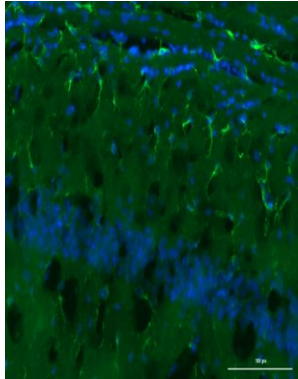
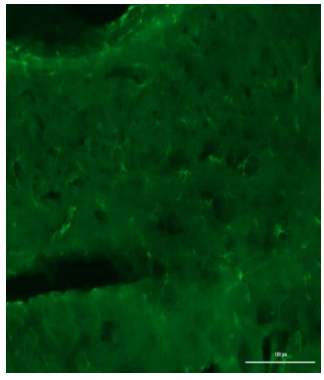
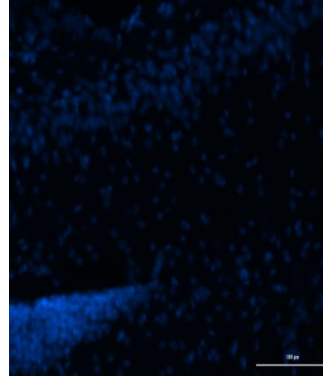
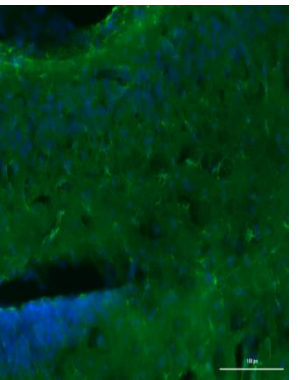
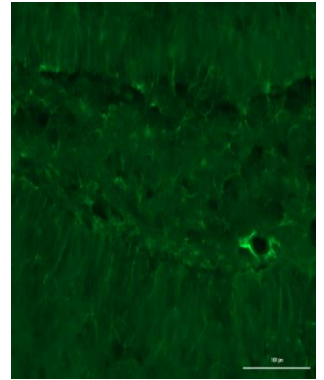
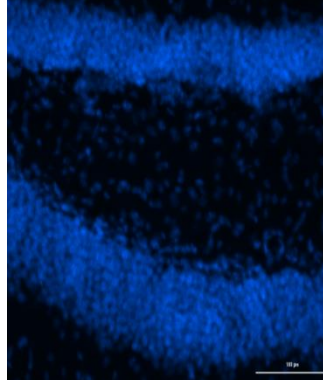
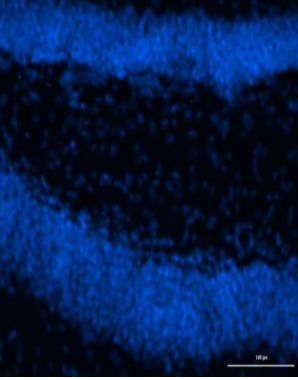




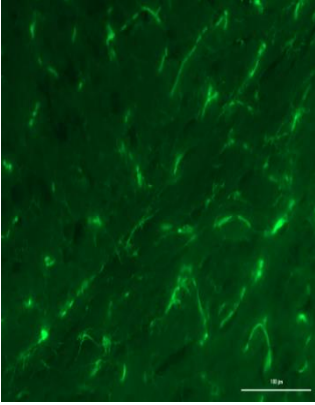
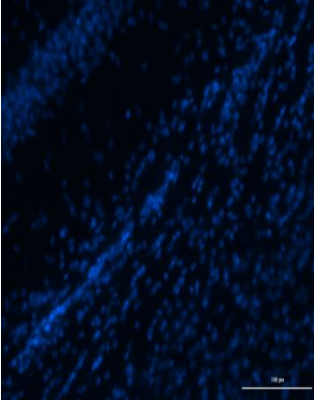
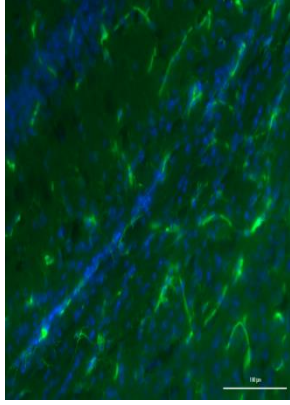
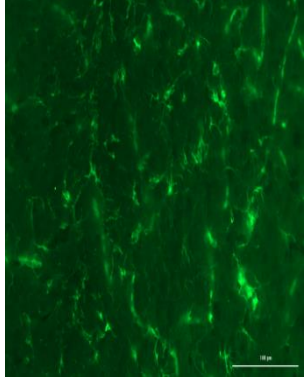
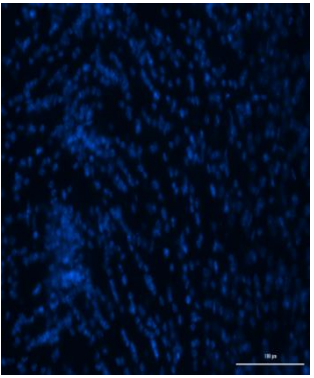
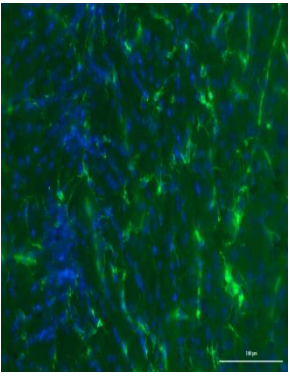
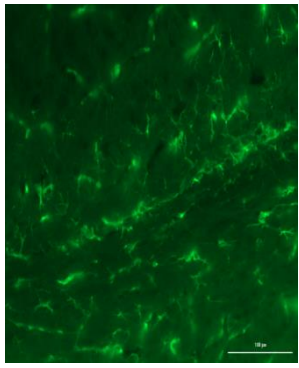
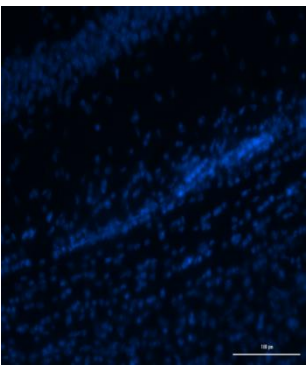
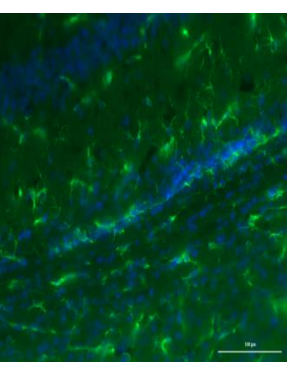
## Imunofluorescência de GFAP (verde) e DAPI (azul) 40x



## Imunofluorescência de GFAP (verde) e DAPI (azul) 40x

ECI+ LIRA2	GFAP	DAPI	Merge
CA1			
CA3			
GD			

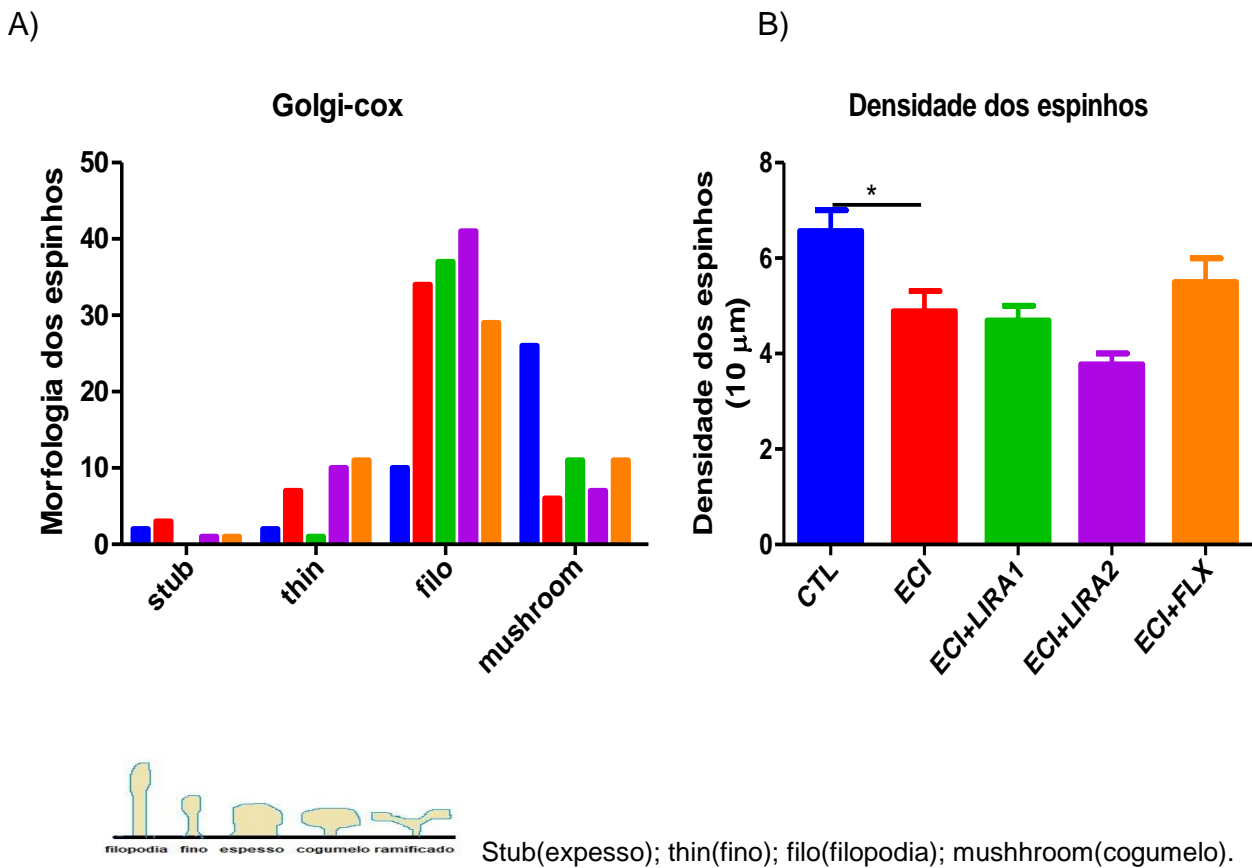
## Imunofluorescência de GFAP (verde) e DAPI (azul) 40x

ECI+ FXT	GFAP	DAPI	Merge
CA1			
CA3			
GD			

### 5.3.8 Golgi-Cox

Foi realizado a técnica de coloração histoquímica de Golgi-cox para visualizar a arborização dendrítica e densidade sináptica em neurônios do hipocampo para avaliar o efeito do estresse crônico imprevisível em animais tratados com LIRA e FXT. Quanto a morfologia dos espinhos dendríticos fig.33A percebemos que os animais ECI reduziram o aspecto mushroom e aumentaram o aspecto filo revelando perda de qualidade. A densidade dos espinhos fig.33B foi reduzida significativamente no grupo ECI quando comparado ao grupo controle  $F(4,38)=6.929$ ,  $P=0,0003$ . Porém, o tratamento com LIRA não conseguiu reverter a redução do número de espinhos dendríticos.

**Figura 33. Morfologia e densidade dos espinhas dendríticos.**



Os animais foram submetidos ao ECI por 21 dias. Entre o 15<sup>o</sup> e 21<sup>o</sup> dias de tratamento, os animais receberam LIRA (120μg/kg; s.c) ou LIRA (240 μg/kg; s.c.) ou FXT (10 mg/kg; v.o.). No 22<sup>o</sup> dia foram eutanasiados, cerebros dissecados e passaram por coloração histoquímica pelo método de Golgi-Cox. Cada barra representa a média ± erro padrão da média (SEM) (n = 04-06 animais por grupo) de acordo com one-way ANOVA seguido pelo teste de *post hoc Tukey's* \* $p < 0,05$ .

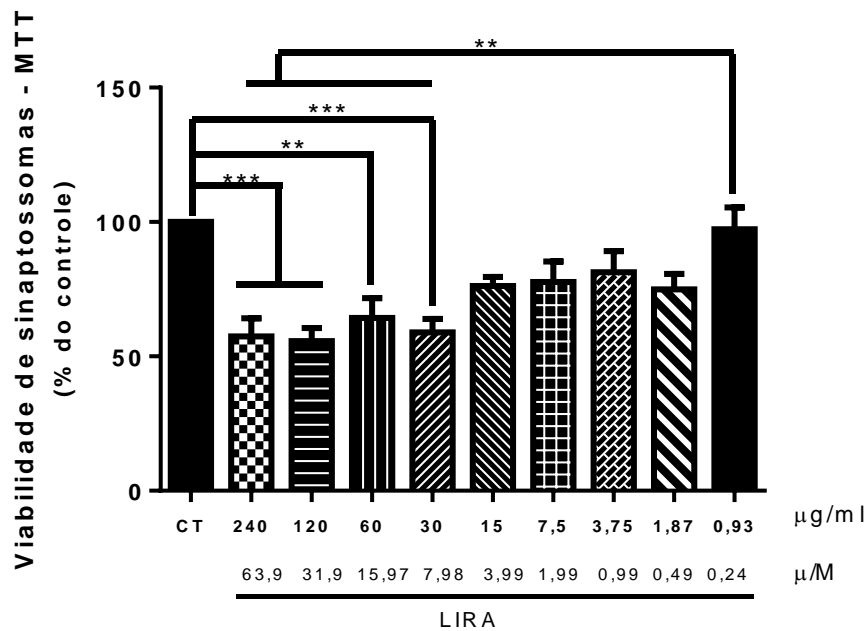


### 5.3.9 Efeitos da LIRA sobre Viabilidade dos Sinaptossomas MTT de camundongos submetidos ao ECI

Para avaliar os efeitos da liraglutida sobre viabilidade dos sinaptossomas MTT foi realizado a quantificação em placa por ensaio colorimétrico com espectrofotometria em áreas do hipocampo adicionando concentrações de Liraglutida obtidas em curva.

A análise da viabilidade (Fig.34) demonstrou efeito estatístico significativo ao compararmos as quatro maiores doses da concentração de LIRA com o grupo controle (CTL), demonstrando que a viabilidade dos sinaptossomas no hipocampo foi diminuindo com concentrações maiores de LIRA [ $F(9,58)=5,472$ ;  $P<0.0001$ ], e a viabilidade foi aumentando com concentrações menores.

Fig. 34. Viabilidade dos Sinaptossomas – MTT



CTL-controle; LIRA-liraglutida

Animais controle foram eutanasiados e hipocampo removido. Viabilidade dos sinaptossomas-MTT foi quantificada em placa com várias concentrações de Liraglutida. Cada barra representa a média  $\pm$  erro padrão da média (SEM) ( $n = 06$ ) de acordo com one-way ANOVA seguido pelo teste de *post hoc* Tukey's  $**p<0,005$ ;  $***p<0,0005$ .

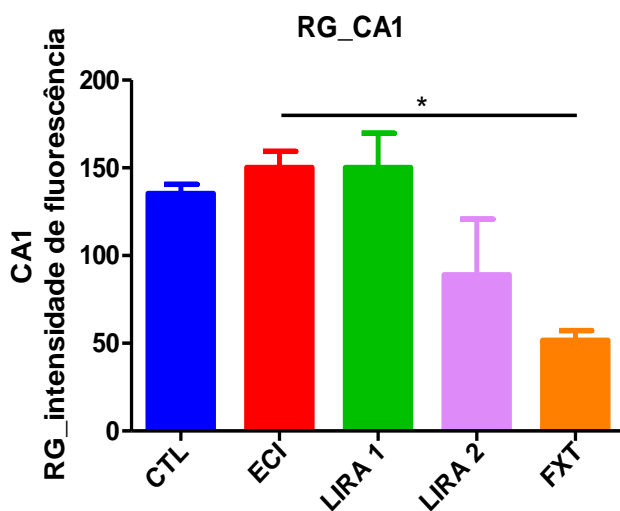
### 5.3.10 Receptor de Glicocorticóide (RG)– CA1, CA3 e GD

Para realização de receptores de glicocorticoides foi realizado imunofluorescência de cortes cerebrais coronais marcados RG e DAPI, e análise das imagens com Software Fiji ImageJ®.

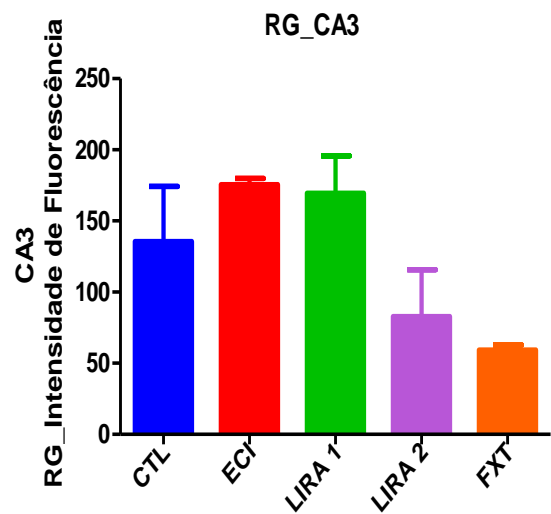
Quanto a imunofluorescência, observamos em CA1 na fig.35A que não houve diferença significativa entre os grupos CTL e ECI, somente entre grupo ECI e FXT. Na região de CA3, conforme fig.35B, que não houve diferença significativa entre os grupos. Na fig.35C encontramos um aumento significativo da intensidade dos RG no grupo ECI na região do giro denteado (GD) quando comparado ao grupo CTL, e redução dos grupos tratados com LIRA e FXT, principalmente na maior dose [F(4,11)=18,11 p<0.0001]. Fig.35D Fotomicrografias.

Fig.35 Receptores de glicocorticoides

A)

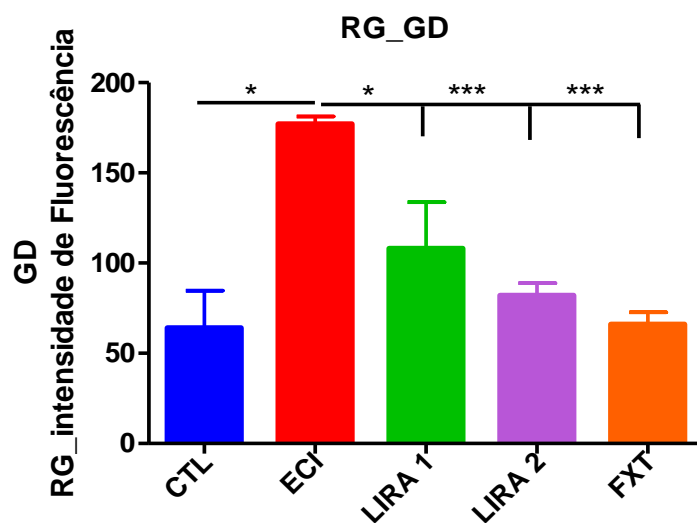


B)



CTL-controle; ECI-estresse crônico imprevisível; LIRA-liraglutida; FXT-fluoxetina; GD-giro denteado.

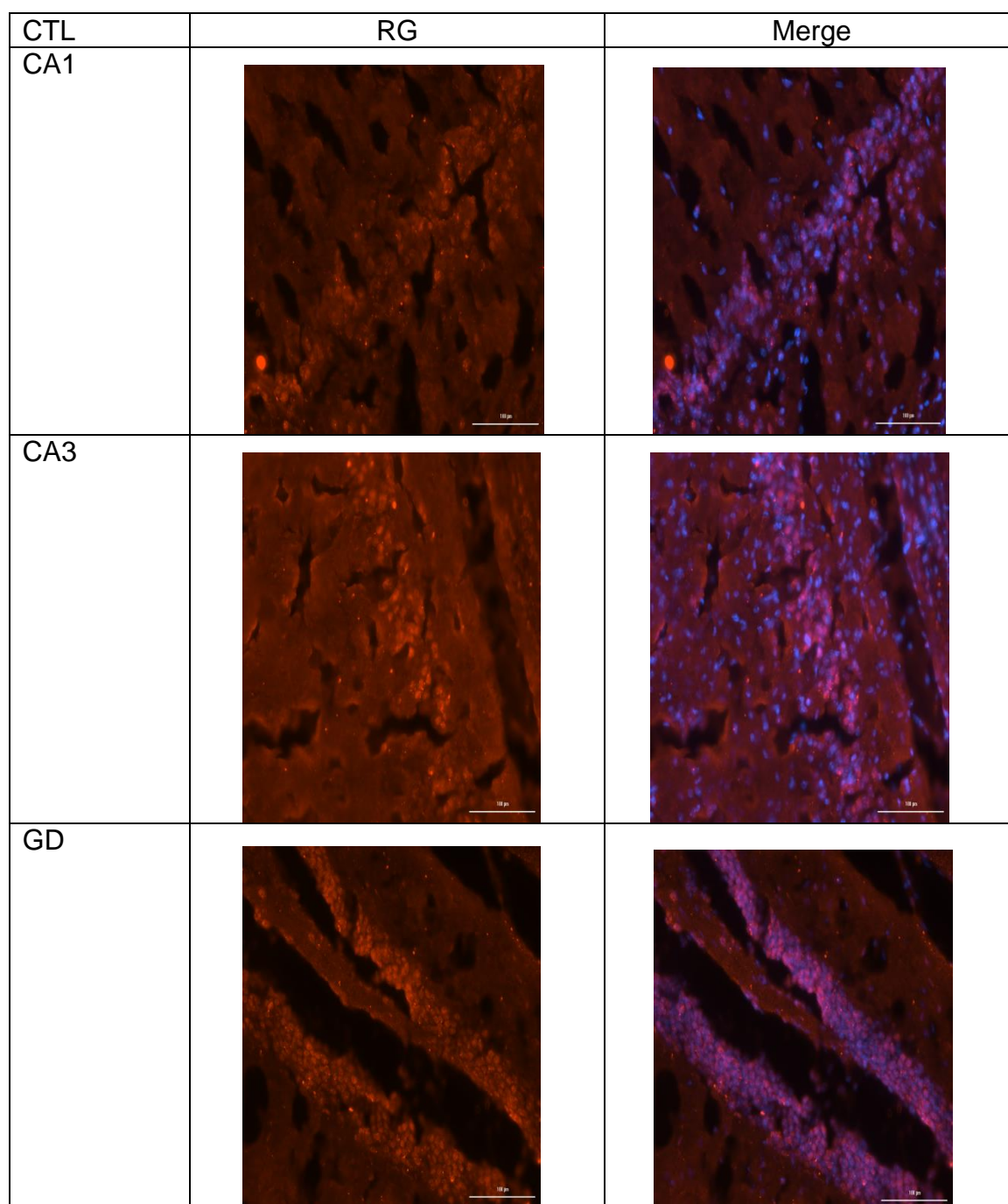
C)



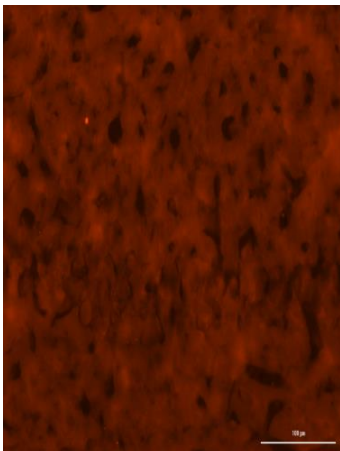
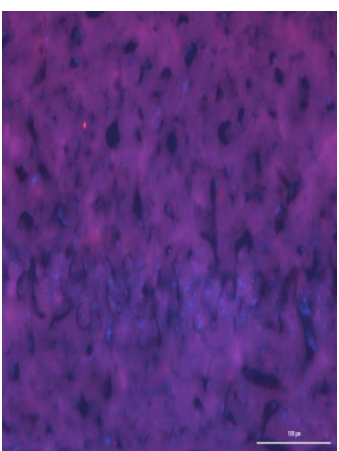
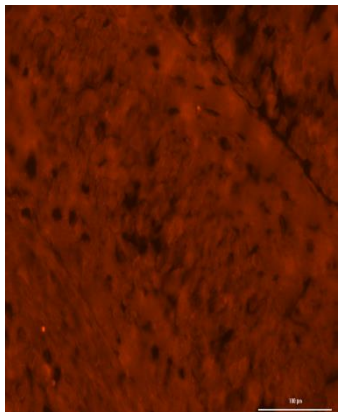
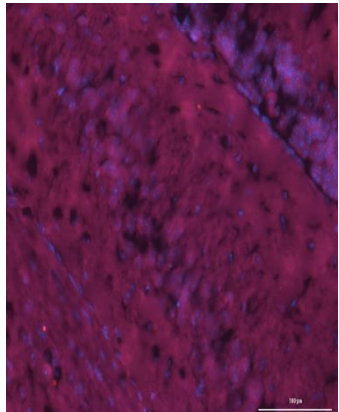
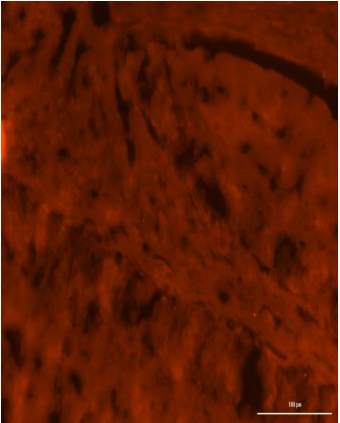
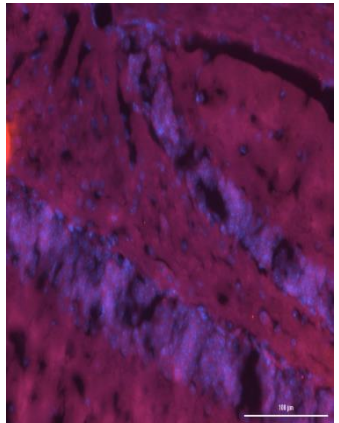
CTL-controle; ECI-estresse crônico imprevisível; LIRA-liraglutida; FXT-fluoxetina; GD-giro dentado.

Animais foram anestesiados, perfundidos, cérebros removidos e cortes marcados com anticorpo para RG e DAPI, lâminas fotografadas e analisadas no ImageJ®. Cada barra representa a média  $\pm$  erro padrão da média (SEM) ( $n = 06$ ) de acordo com one-way ANOVA seguido pelo teste de *post hoc Tukey's* \* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,005$ ; \*\*\* $p < 0,0005$ .

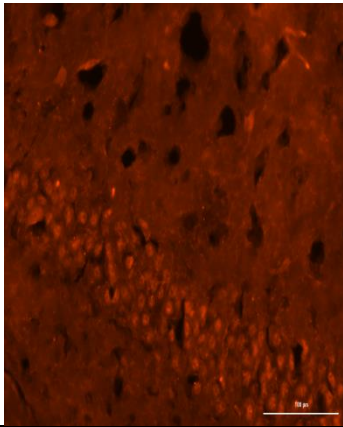
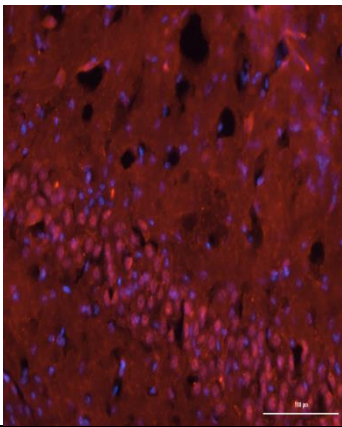
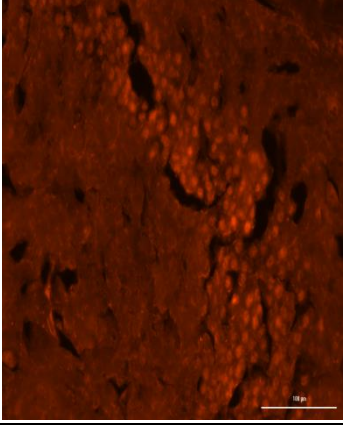
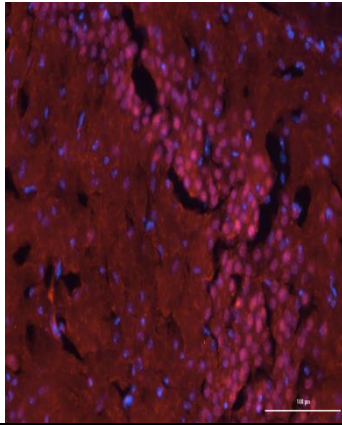
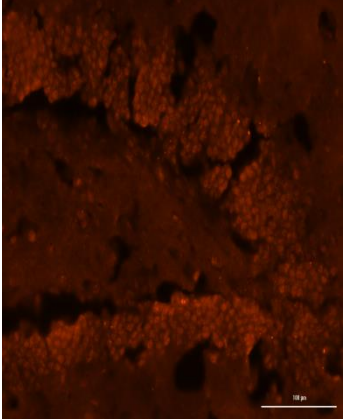
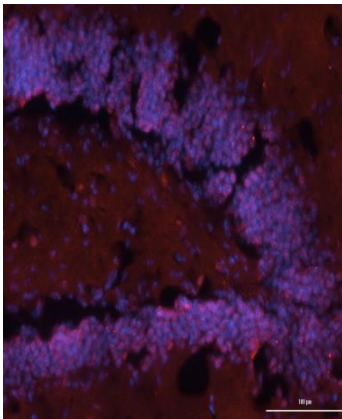
Fig.35D Imunofluorescência de Receptor de Glicocorticoide CTL – (40x)



## Imunofluorescência Receptor de Glicocorticoide ECI (40x)

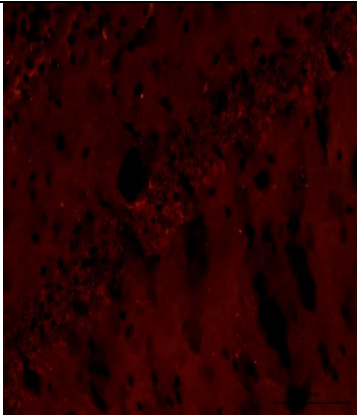
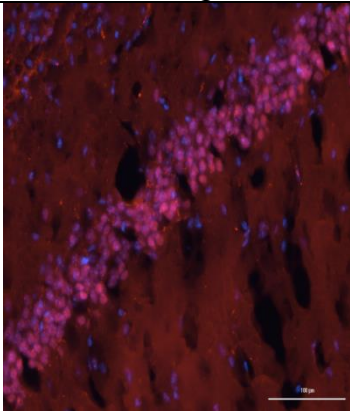
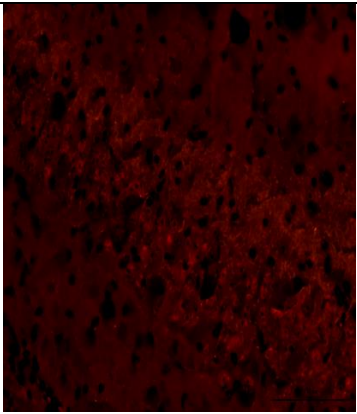
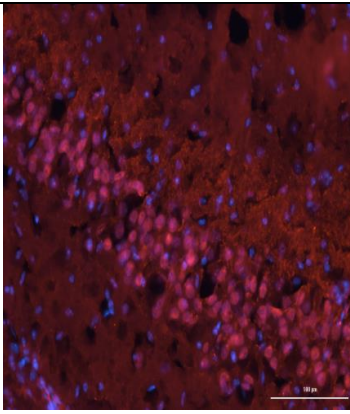
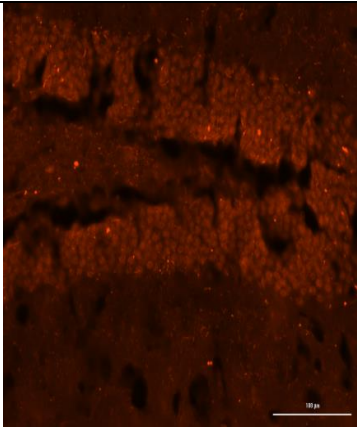
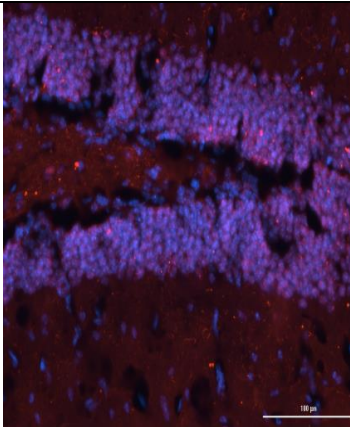
ECI	RG	Merge
CA1		
CA3		
GD		

Imunofluorescência do Receptor de Glicocorticoide ECI+LIRA 1 (40x)

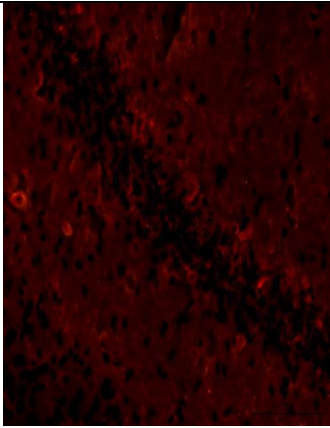
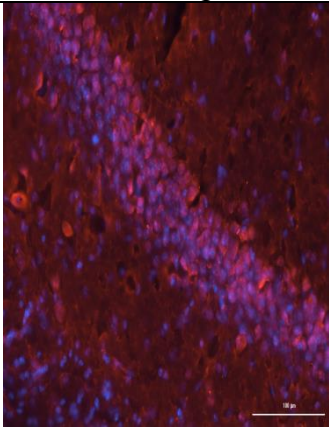
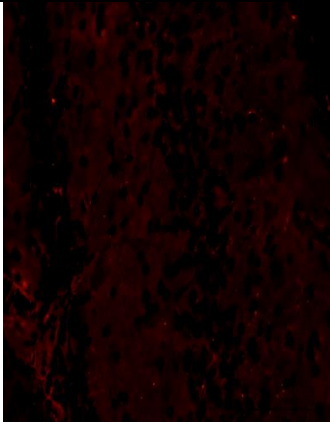
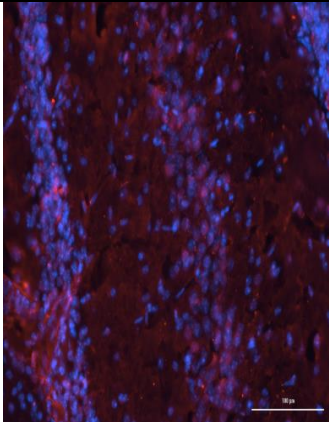
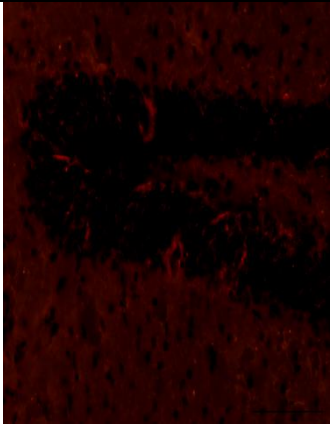
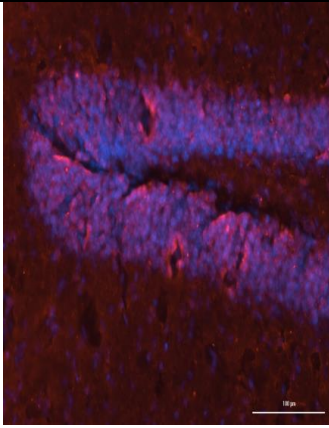
ECI+LIRA1	RG	Merge
CA1		
CA3		
GD		



Imunofluorescência do Receptor de Glicocorticoide ECI+LIRA 2 (40x)

ECI+LIRA2	RG	Merge
CA1		
CA3		
GD		

Imunofluorescência do Receptor de Glicocorticoide ECI+FXT (40x)

ECI+FXT	RG	Merge
CA1		
CA3		
GD		



## 6. DISCUSSÃO

Apesar de todo avanço das pesquisas nas áreas da neurofisiologia e neuropsiquiatria, o entendimento da fisiopatologia da depressão com mecanismos pelos quais ela se desenvolve não é completamente conhecido devido a sua heterogeneidade e múltiplas etiologias (BRIGITTA, 2002; NEMEROFF, 2008). Modelos animais para compreendermos a depressão nos fornecem abordagens esclarecedoras sobre comportamentos, alterações neuroquímicas e moleculares, além disso, o método de estresse crônico imprevisível tenta desenvolver cronicamente o estado depressivo em resposta a estímulos de estresse imprevisíveis (WILNER, 1997).

O presente estudo apresenta os efeitos comportamentais, metabólicos e neuroquímicos da administração de Liraglutida (LIRA), um medicamento utilizado no tratamento da Diabetes Mellitus tipo 2, em camundongos fêmeas submetidas ao modelo animal de depressão induzido por estresse crônico imprevisível, buscando evidenciar, através de pesquisas experimentais, um melhor entendimento que tenha suporte científico para estratégias no tratamento da depressão e ansiedade no manejo dos efeitos indesejáveis da terapia atual.

Com o intuito de estudar o efeito da LIRA e a FXT (utilizada como controle positivo) sobre a atividade locomotora e ansiedade foram realizados os testes de Campo Aberto e Labirinto em Cruz Elevado. O teste de Campo Aberto avalia a atividade locomotora e estado de ansiedade em roedores, os quais, normalmente preferem estar junto às paredes do aparato do que ficar no centro da arena. A observação da diminuição do comportamento de *rearing*, também é considerado como um índice de ansiedade (PRUT; BELZUNG, 2003). Nos nossos achados, pudemos observar que após o estresse crônico o grupo ECI não alterou significativamente a atividade locomotora, quando comparado ao grupo controle. Contudo, os grupos estressados, induzidos a depressão por estresse, tratados com LIRA 120 e 240 foi capaz de reverter a atividade locomotora, aumentando o número de cruzamentos quando comparados ao grupo estressado. Esses resultados sugerem que a LIRA na presença de um fator estressante é capaz de reverter essa ação. Contudo, uma limitação do nosso estudo foi a ausência de um grupo com LIRA sozinha que poderia ajudar melhor na interpretação dos resultados.

KATZ, 1981, em seu experimento de estresse crônico em ratos por 21 dias, constatou que o estresse crônico gerou diminuição da atividade locomotora no teste do

campo aberto. Ao contrário de estudos anteriores, incluindo aqueles que utilizaram o procedimento ECI semelhante aos nossos em camundongos, foi mencionado aumento da atividade locomotora após exposição crônica em camundongos fêmeas no teste de campo aberto (PARDON, 2015).

Ainda no Campo Aberto, que representa comportamento e atividade motora, observamos que o grupo estressado tratado com FXT não mostrou alteração da atividade locomotora, provavelmente porque embora a FXT seja um fármaco utilizado na clínica como ansiolítico, no teste de atividade locomotora nós estudamos a movimentação total do animal e não o tempo de permanência no centro do aparato. Não houve alterações no número de comportamento de *grooming* e de *rearing* em nossos resultados; resultado semelhante de não alterar o número de *rearing* foi observado no trabalho realizado por HUANG, et al., 2017 e no trabalho realizado por HU, et al., 2017 de não alterar o comportamento de *grooming*.

A ansiedade pode ser caracterizada como a antecipação emocional de uma situação de repulsa, de difícil controle, enquanto o medo, pode ser definido como uma reação a uma situação perigosa real. Entretanto, por vezes pode ser difícil separá-las. Um outro modelo experimental validado e utilizado para avaliação da ansiedade foi o labirinto em cruz elevado (Plus-maze). Neste teste nossos resultados mostraram que o percentual do tempo nos braços abertos não apresentou diferença entre os grupos. Mas, a LIRA 240 foi capaz de aumentar o percentual de entrada nos braços abertos significativamente no labirinto em cruz elevado, consistente com uma atividade ansiolítica (PELLOW; FILE, 1986). Com relação ao número total de entradas nos braços em conjunto, pode-se observar que o grupo tratado com LIRA 120 e o grupo FXT apresentaram um aumento na atividade locomotora comparado ao grupo estressado apenas, e que é denominado por diversos autores como sendo medidas da atividade motora global. O labirinto elevado baseia-se na tendência que os roedores possuem para os espaços escuros e fechados e evitam altura e espaços abertos (BARNETT, 1975). Um aumento na atividade do braço aberto (duração e/ou entradas) reflete o comportamento anti-ansiedade (WALF; FRYE, 2007).

No teste de nado forçado, assim como no teste de suspensão de cauda, é avaliado o comportamento relacionado ao desespero através do tempo de imobilidade e tem sido amplamente utilizado em roedores após exposição ao estresse (CAN, et al.,

2012). Os resultados do nado forçado mostraram que o estresse crônico imprevisível por 21 dias promoveu um aumento do tempo de imobilidade dos animais quando comparado ao grupo controle, caracterizando um comportamento do tipo-depressivo, resultado corroborado por ALI, *et al.*, (2015). Em contraste, existem trabalhos que interpretam que o tempo de imobilidade no nado forçado não difere entre o grupo ECI versus camundongos não estressados (BOULLE, *et al.*, 2014).

Em nossos achados, o tempo de imobilidade do nado forçado foi revertido pelo tratamento com LIRA 120 e com maior efeito com LIRA 240. Podemos inferir que camundongos sujeitos ao estresse crônico exibiram prolongamento da imobilidade e que a LIRA causou efeito tipo antidepressivo. O grupo ECI quando tratado com FXT não resultou em uma redução significativa o tempo de imobilidade, conforme podemos observar em trabalho publicado por RUBALCAVA, (2000), que afirma que o tempo de imobilidade só é alterado com doses mais elevadas de fluoxetina. Em outro trabalho publicado, mostraram que o teste de nado forçado não é tão sensível aos ISRS (DETKE, *et al.*, 1995). Porém, nossos resultados apresentam um aumento de *climbing* no grupo ECI tratado com FXT. O aumento do climbing também foi observado no grupo ECI quando tratado com LIRA 120. Podemos inferir que a LIRA causou um efeito antidepressivo no teste de nado forçado. Além disso, o teste de nado forçado aumenta a liberação de serotonina no hipocampo - um efeito que é provavelmente mediado pela ativação da atividade do hormônio liberador de corticotrofina (LINHORST, *et al.*, 2002). O papel da serotonina na mediação da depressão, ansiedade e estresse tem sido reconhecido há muito tempo (GRAEFF, *et al.*, 1996).

O desamparo aprendido é um indicador para avaliar o comportamento depressivo tanto nos testes de suspensão de cauda como no nado forçado, pois possuem quase o mesmo princípio que é escapar de um ambiente hostil, adotando uma postura imóvel. É importante salientar que a resiliência apresentada por alguns animais torna este modelo interessante (CRYAN, *et al.*, 2005).

O comportamento de grooming é uma característica inerente de autocuidado dos camundongos e normalmente é uma das atividades comportamentais mais observada em roedores. Ele está relacionado na prática da higiene e outros processos fisiologicamente importantes, incluindo a termorregulação, a comunicação social e o despertar. Este comportamento relaciona-se com a estimulação do receptor dopaminérgico D1 (KALUEFF, *et al.*, 2016). O teste de borrifagem de sacarose ou *Splash test* é um teste, farmacologicamente validado, que avalia o comportamento de autolimpeza, como uma forma de comportamento motivacional considerado paralelo a alguns sintomas de

depressão, revelando indiferença como uma característica crucial da depressão (ISINGRINI, *et al.*, 2010). O estresse crônico imprevisível por 21 dias foi capaz de promover um comportamento semelhante ao apático pois apresentou um aumento da latência para o *grooming*, e esse efeito foi revertido tanto com a administração da LIRA 120 como da FXT. Nossos resultados apresentaram ainda uma duração maior do *grooming* nos grupos tratados com LIRA 120, 240 e FXT, sendo mais significativo com a LIRA nas duas doses, revertendo o estado de apatia. Estudos realizados anteriormente corroboram com os resultados desse estudo (DAVID *et al.*, 2009; FILHO *et al.*, 2019).

O teste de esquiva passiva é um teste de aprendizado rápido que envolve uma sessão de treino e uma de teste e as latências de descida são comparadas. Envolve também a aquisição de um comportamento que adia a ocorrência de um evento aversivo futuro, onde o animal necessita suprimir uma resposta para evitar um evento aversivo que estava programado para ocorrer. Animais com os processos de aprendizagem afetiva conservados apresentam maior latência durante o teste em relação ao treino, premissa corroborada por resultados farmacológicos (ANGLADE, *et al.*, 1994; MISANE, *et al.*, 1998).

Os resultados de esquiva passiva demonstraram que durante o treino, apenas o grupo controle apresentou maior latência, gastando mais tempo para descer, provavelmente a memória associativa estava preservada e os animais associaram que ao descer poderia levar ao choque. Os demais grupos ECI, ECI tratados com LIRA 120 e FXT, apresentaram em relação ao treino, um aumento da latência para descida, mostrando algum comportamento de aprendizado afetivo. Porém, desceram mais rápido que o grupo controle durante o treino. Quando o nível de ansiedade é elevado, a aprendizagem se torna prejudicada, como afirma ISQUIERDO; MEDINA, (1997). O estresse crônico é capaz de promover alterações morfológicas na amígdala e promove efeitos significativos no armazenamento da memória e aprendizados aversivos (LEDOUX & MULLER, 1997). Em outro estudo realizado (GILAD & SCHILLER, 1989) foi observado que em duas linhagens de ratos, aqueles que eram mais reativos ao estresse, apresentavam mais dificuldade de aprendizado de esquiva. O tratamento com LIRA não foi capaz de produzir alterações no treino no teste de esquiva passiva, mas os animais estressados tiveram sua memória prejudicada.

Com o intuito de estabelecer um paradigma no estudo de memória declarativa em roedores, foi proposto o teste de memória operacional. Esse teste comportamental avaliado foi o teste de reconhecimento de objetos novos que analisa as alterações de

memória de curto e longo prazo, e que os animais naturalmente despendem mais tempo explorando o novo, como se tivessem uma memória do objeto com maior preferência, conhecido como reconhecimento de objetos (ENNACEUR; DELACOUR, 1988). O córtex entorrinal e o hipocampo estão diretamente relacionados com o reconhecimento de objetos, e quando não estão íntegros, ocorre prejuízo no reconhecimento e formação da memória (ALBASSER, et al., 2009). No presente estudo, não houve diferenças significativas entre os grupos, apesar do grupo ECI mostrar uma tendência menor no índice de reconhecimento do objeto novo – memória de curto prazo (MCP) e o grupo ECI + LIRA 120 e ECI + FXT apresentarem um aumento, porém não significativo, aumentando o índice de reconhecimento de objeto. Não realizamos o teste de reconhecimento de objeto novo de longo prazo. Alguns autores relacionam a serotonina em receptores no hipocampo na contribuição do processo de memória, e que animais Knockout para esses receptores, exibem prejuízo na presença do objeto, mas que esse dano poderia ser abolido pelo enriquecimento de experiências (RAMPON, et al., 2000).

Nosso estudo mostra que o teste de Y-maze apresentou resultado significativo na memória de trabalho espacial com relação ao grupo ECI quando comparado ao grupo ECI + LIRA 120. O grupo tratado com LIRA 120 conseguiu aumentar o percentual de alternâncias corretas. Na literatura foi descrito que a estimulação da via do GLP-1R no cérebro é neuroprotetora (PERRY, et al., 2002) e pode melhorar a aprendizagem associativa e espacial, bem como a memória (DURING, et al., 2003). Até o presente momento, vários estudos têm replicado neuroproteção e melhoria de memória em vários modelos animais de DM tipo 2 e distúrbios neurodegenerativos induzidos tanto por agonistas de GLP-1R (SALCEDO, et al., 2012).

Com relação a outros parâmetros avaliados, também foi mensurado a cada quatro dias o peso dos animais durante todo o experimento, sendo observado o ganho de peso dos animais da diferença do peso do último dia e do primeiro dia. Foi observado em nossos resultados uma diminuição significativa do ganho de peso no grupo ECI quando comparado com o grupo CTL. Os grupos tratados com LIRA 120 e 240 conseguiram reverter a perda de peso devido ao estresse. A LIRA funcionou, portanto, como um regulador endócrino do peso. Os animais ECI, em alguns testes apresentaram depressão. O estresse provoca um distúrbio do equilíbrio homeostático e a perda de peso pode ter sido resultado de alteração do apetite, como pode ter sido resultado dos estressores diários, como privação de água e comida, assim como pela alteração do eixo HHA.

Conforme o próprio DSM-5 a depressão pode reduzir ou aumentar o peso ou apetite. Sabemos que LIRA é prescrita como um medicamento para perder peso. Porém, nossos resultados mostraram que os animais mesmo estressados, conseguiram com o uso da LIRA 120 e LIRA 240 regular o peso, e apresentaram um valor próximo do grupo controle. Nossos resultados são corroborados com os resultados que mostram que durante o experimento de estresse crônico os animais controles ganharam peso corpóreo considerável, enquanto os estressados apresentaram menor ganho de peso (ALFAREZ, *et al.*, 2003).

As glândulas adrenais ou supra-renais, são estruturas bilaterais situadas acima dos rins. A zona cortical da glândula possui a camada fasciculada que é intermediária e secreta glicocorticoides, tendo o cortisol como principal corticoide. O estresse ativa centos hipotalâmicos que estimula o eixo HHA e que ativa a zona cortical fasciculada liberando o cortisol. O estresse crônico manterá o eixo HHA ativado. Dentro desse contexto, outro parâmetro avaliado foi o peso das adrenais direita e esquerda. Pudemos observar em nossos resultados que não houve alteração do peso da adrenal direita. Porém, na adrenal esquerda, apesar do grupo CTL não ter diferença significativa com o grupo ECI, o tratamento com LIRA 120 e LIRA 240 conseguiu reduzir o peso da adrenal esquerda significativamente. Nossos resultados são corroborados com a literatura que mostra que a exposição a vários estressores imprevisíveis por 21 dias atenuou o ganho de peso corporal, aumentou o peso adrenal e reduziu o peso do timo (ALFAREZ, *et al.*, 2003).

No teste de glicemia, foi identificado que não houve diferença significativa entre o grupo controle e o grupo estressado. A diferença de média do aumento do grupo estressado foi de 18,98 (10,38%). Talvez, esse seja um fator limitante do modelo, pois esperávamos que os animais estressados apresentassem um valor significativo de glicemia mais elevado por passarem pelo estresse crônico. Também a glicemia foi realizada sem que os animais estivessem em jejum. Porém vimos ver que os grupos tratados tiveram diferença significativa quando comparados ao grupo apenas estressado. O grupo estressado tratado com LIRA 120 ( $p < 0,0001$ ) apresentou melhor resultado na redução da glicemia. Em seguida foi a FXT ( $p < 0,001$ ) e depois LIRA 240 ( $p < 0,01$ ).

É sabido que a LIRA tem sido prescrita como medicamento para perder peso. Na bula tem descrito dentre as reações adversas dos distúrbios metabólicos, em estudo de fase 3 (ensaio clínico), que a hipoglicemia de pacientes é comum quando associada à

dieta e exercícios e costuma acontecer entre pacientes não diabéticos tipo 2. E que em pacientes com DM tipo 2 que fazem uso de outros anti-diabéticos, esse risco de hipoglicemia pode aumentar. Não tendo sido confirmado por exames, e sim relatado por pacientes. A bula também informa que os efeitos adversos mais comuns são os gastrintestinais. No nosso trabalho foi possível perceber que a LIRA 120 foi capaz de reduzir significativamente a glicemia em camundongos sob estresse crônico.

O fator neurotrófico derivado do cérebro (BDNF) é distribuído amplamente no cérebro e tem sido implicado no desenvolvimento, regeneração neural, transmissão sináptica, plasticidade sináptica e neurogênese, podendo estar reduzido em determinadas regiões cerebrais na depressão. Tem sido sugerido que a depressão está associada à atrofia e à perda de células neuronais, especialmente no hipocampo e no córtex cerebral (DUMAN, et al., 2000). Nossos resultados não mostraram valores significativos entre o grupo controle e grupo estressado, porém houve uma discreta redução de BDNF do grupo estressado quando comparado ao controle com diferença de média (MD) de 2794 (42,59%). Porém, com a administração da LIRA 120 e principalmente da LIRA 240, houve um aumento significativo dos níveis de BDNF na área do hipocampo. Foi verificado em estudos prévios que valores de níveis séricos de BDNF estão reduzidos em pacientes deprimidos e que estariam relacionados com a severidade do problema e que esses níveis poderiam ser restaurados com o uso de antidepressivos (YU; CHEN, 2010). Podemos inferir que neste trabalho a determinação dos níveis de BDNF da região do hipocampo foram aumentados com a administração da LIRA, agindo como antidepressivo.

Um grande contingente de pessoas deprimidas exhibe secreção aumentada de glicocorticoide quando submetidas ao estresse (PARKER, et al., 2003; HOLSBOER, 2000). O estresse crônico causa mudanças fisiológicas como a ativação do eixo HHA, o qual está associado a liberação do hormônio do estresse no sangue. O estresse crônico imprevisível causa na depressão a hiperativação no eixo HHA o qual conseqüentemente promove o aumento do nível de corticosterona (LIU, et al., 2019). Nossos resultados de corticosterona sérica não mostraram diferenças significativas estatisticamente. Porém, o grupo ECI apresentou um aumento com diferença de média de 35%, portanto mostrou ser um valor considerável, e que clinicamente poderia ter relevância. Talvez, se tivéssemos realizado um modelo mais prolongado de estresse, teríamos resultados mais estatisticamente significativos.

O estresse oxidativo é gerado quando há um desequilíbrio entre espécies reativas de oxigênio e os antioxidantes, e tem um papel significativo na patogênese da depressão (CHENG, *et al.*, 2018). Nossos resultados não evidenciaram diferença significativa de MDA no córtex pré-frontal, mas mostrou um decréscimo significativo de MDA no grupo tratado com LIRA 240 no hipocampo, sendo que entre os grupos CTL e ECI não houve resultado significativo. Os valores de nitrito não apresentaram resultado significativo entre os grupos no córtex pré-frontal e hipocampo. O GSH apresentou uma elevação significativa do grupo tratado com LIRA 240 com relação ao controle no córtex pré-frontal, mas não mostrou diferença entre CTL e ECI; no hipocampo houve redução significativa do GSH do grupo ECI quando comparado ao CTL. Alguns estudos declaram que o estresse crônico imprevisível aumenta as espécies reativas de oxigênio-ROS (VERMA, *et al.*; 2009). Entretanto, existem resultados que tanto revelam um aumento de GSH como uma diminuição em camundongos sujeitos ao estresse crônico. No presente estudo, 21 dias de estresse crônico imprevisível resultou em diminuição endógena antioxidante do GSH no hipocampo. Provavelmente, eventos estressores em maior número de dias ou mais intensos, mostrassem resultados mais significantes.

Diante dos resultados comportamentais, metabólicos e neuroquímicos, resolvemos também investigar o modelo de ECI e os efeitos do tratamento de LIRA e FXT sob possíveis alterações na histologia da adrenal e na circuitaria neuronal realizando o estudo histológico do córtex da adrenal, proteína ácida fibrilar glial – GFAP, método de Golgi-Cox, viabilidade dos sinaptossomas e receptores de glicocorticóides, a fim de encontrarmos possíveis alterações moleculares no sistema nervoso central.

O córtex da adrenal, quando exposta ao estresse crônico imprevisível, poderá sofrer uma adaptação como consequência a um desafio prolongado. Foi demonstrado na literatura que o estresse crônico imprevisível foi capaz de provocar hiperplasia e hipertrofia na zona fasciculada, além de causar hipertrofia na zona medular em ratos expostos a outros protocolos de estresse crônico por 14 dias (ULRICH-LAI, Y.M., *et al.*, 2006). Para alguns autores, além do alargamento da adrenal e do aumento da corticosterona sérica, o nível do ACTH pode estar normal (GAMALLO, A., *et al.*, 1986; MOSARKA, A., *et al.*, 2000; KUIPERS, S.D., *et al.*, 2003). Muitos pacientes com depressão apresentam aumento de cortisol no plasma e alargamento das adrenais (NEMEROFF, 2008; JURUENA, 2003).



Corroborando com nossos achados, houve um aumento da zona cortical, especificamente da zona fasciculada, produtora de corticosterona. Apesar de termos apresentado que o nível sérico de corticosterona não elevou significativamente, resta-nos investigar se a alteração morfológica pode está relacionada a uma alteração de função em desordens psiquiátricas relacionadas ao estresse e se outros tipos de estressores mais prolongados poderiam elevar significativamente a corticosterona. Pesquisas indicam que níveis elevados de corticosterona estão relacionados com a severidade da depressão (DE KLOET, et al., 1998; JURUENA, 2003).

Nossos resultados demonstraram que o tratamento com LIRA na menor e maior dose se comportaram como o antidepressivo fluoxetina, pois conseguiram reduzir o aumento da zona fasciculada produzida pelo ECI. Existe a hipótese de que o tratamento crônico com antidepressivo possa normalizar a função do eixo HHA e normalizar os níveis de cortisol (BARDEN, 2004).

Quanto ao GFAP, nosso estudo procurou demonstrar os efeitos do tratamento crônico com LIRA sobre a expressão de GFAP no hipocampo (sub-regiões de CA1, CA3 e GD) em modelo de depressão induzida por ECI. Observando a relação existente entre estresse, depressão e hipocampo, foi realizada análise da atividade astrocitária nas sub-regiões, cuja presença de filamentos intermediários como a proteína ácida fibrilar glial – GFAP é um dos principais constituintes do citoesqueleto celular (MONTEGOMERY, 1994). A função clara da GFAP parece desconhecida, mas, parece que o GFAP auxilia os astrócitos a manterem uma força mecânica e sua forma (MIDDELDORP; HOLL, 2011).

Através de nossos resultados pudemos observar que houve aumento da intensidade de fluorescência nas sub-regiões dos grupos ECI. Provavelmente essa alteração esteja relacionada com o estresse crônico imprevisível. Com relação ao número de células nas sub-regiões, não observamos nenhuma diferença. A astrogliose reativa ou astrogliose (astrócitos hiperreativos) aparece com alterações morfológicas, fisiológicas e moleculares mediante lesões ou patologias no sistema nervoso podendo ser benéfico ou não (DE KEYSER, 2008). Além disso, o GFAP pode ser alterado em condições de estresse e depressão (HUGHES et al., 2004; LIU et al., 2011; POPOLI et al., 2012).

Contrariando nossos resultados, o estresse em ratos por contenção crônico por três semanas (6h/dia) reduziu níveis de GFAP na matéria cinzenta periaquedutal (IMBE et al., 2012). Também GFAP foi reduzido no hipocampo de ratos submetidos ao ECI por 5

semanas (LIU et al., 2009; 2011). Em outro estudo realizado, o ECI por 14 dias em camundongos fêmeas não alterou o nível de GFAP no hipocampo, nem mesmo os tratamentos (MANOSSO, et al., 2016). Podemos dizer que os diferentes tipos de estressores, a idade, o sexo dos animais podem influenciar os níveis de GFAP em diferentes regiões cerebrais.

Pesquisas têm demonstrado que o estresse crônico provoca alterações químicas e estruturais em várias regiões do cérebro humano e de animais, em áreas do hipocampo (ADMON, et al., 2009; ANDERSEN, et al., 2008; RADLEY, 2005), amígdala (ANDERSEN et al. 2008), núcleo acumbens (MORALES-MEDINA, et al., 2009) e córtex pré-frontal (ARNSTEN, 2009). Redução de células ocorre principalmente no sistema límbico, retraindo processos dendríticos, inibindo a neurogênese, assim como a morte de neurônios, diminuindo o volume do hipocampo (ADMON, et al., 2009; MORRISON, 2005; ULRICH-LAI; HERMAN 2009).

Baseado nesse pressuposto, o método de Golgi-Cox foi realizado para avaliar a morfologia e número de espinhos dendríticos da arborização do hipocampo, especificamente da área CA3. Os espinhos dendríticos presentes no eixo dos dendritos de vários neurônios são importantes na plasticidade das sinapses, aprendizado e memória (GROVES, et al., 2017). Suas formas de cogumelo (mushroom), fino (thin), filo e grossos (stubby) estão associados a funções e excitabilidade diferentes. Os espinhos dendríticos finos predominam no desenvolvimento da coluna dendrítica e são imaturos e plásticos.

Nossos resultados pela técnica de Golgi-Cox no hipocampo, região CA3, revelaram a maior presença de espinhos filo em todos os grupos, principalmente quando tratados com maior dose de liraglutida. A presença de espinhos mais maduros (cogumelos), foi maior quando tratados com a liraglutida na menor dose.

As alterações na região CA3 em neurônios do hipocampo de redução dendrítica e retração do eixo dendrítico causadas pelo estresse crônico dependem do sexo, duração e tipos de estresse e espécies animais, estando também relacionado com prejuízos de memória e perda de LTP (potenciação de longo prazo) em camundongos (CHEN, et al., 2013). Segundo QIAO, et al., 2014, ECI 21 e 30 dias diminuem a densidade do eixo nos neurônios CA3 de ratos machos, mas ECI de 14 dias (Sousa, et al., 2000) melhorava a indução de LTP nas sinapses CA3-CA1 no hipocampo também de ratos machos (QIAO, et al., 2014). Os mecanismos moleculares através dos quais os espinhos dendríticos ou

números de sinapses se alteram devido ao ECI permanecem desconhecidos, mas, nos mostra uma importante direção em busca de desenvolver estratégias terapêuticas para a depressão (QIAO, et al., 2016).

Para analisarmos a viabilidade sináptica, realizamos experimento dos sinaptossomas. Sinaptossoma é um terminal sináptico isolado de um neurônio que contém vesículas sinápticas. A determinação da viabilidade celular ou citotoxicidade foi determinada em nossos resultados utilizando um ensaio colorimétrico de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólico) MTT.

Nossos resultados mostraram a viabilidade celular do hipocampo de maneira inversamente dependente da dose, demonstrando que a estimulação com agonista de GLP-1, liraglutida, com doses crescentes, diminui a viabilidade celular. Os resultados encontrados vão de encontro com o trabalho de BAO, Y., et al., (2015), pois, ao contrário dos nossos resultados, eles demonstraram que cultura de astrócitos corticais de ratos pré-tratados com diferentes concentrações de liraglutida pelo mesmo ensaio colorimétrico por MTT, promoveu a viabilidade celular de astrócitos de maneira dose dependente, demonstrando efeitos neuroprotetores da estimulação com agonista de GLP-1. Semelhantemente, foi visto que o GLP-1, por suprimir o apetite em animais e humanos, promovia a liberação de serotonina de sinaptossomas (aumentando a viabilidade) hipotalâmicos, sugerindo o efeito anorexígeno (TRICKLEBANK, DALY, 2019).

Conforme nossos achados ainda, o fato da viabilidade dos sinaptossomas ter apresentado diminuição da viabilidade com o aumento da concentração da LIRA, não podemos inferir que este resultado tenha tido um efeito citotóxico, pois a viabilidade pode diferenciar quanto a forma da administração do fármaco. Nossos resultados basearam-se pela administração da LIRA por via subcutânea, enquanto a viabilidade dos sinaptossomas realizada foi pela concentração da LIRA diretamente numa solução macerada do hipocampo.

Finalmente, procuramos investigar a intensidade de fluorescência sobre os receptores de glicocorticoides nos grupos estudados a fim de demonstrar se a presença destes estavam mais ou menos expressa nas regiões do hipocampo.

Nossos achados resultaram num aumento estatisticamente significativo de receptores no grupo ECI na região do giro denteado e que foram revertidos com o tratamento de LIRA, principalmente na maior dose, assim como também a FXT reduziu.

Corroborando com nossos resultados JOCA, et al., (2003) citaram que fatores estressantes persistentes em 60% dos casos precedem a depressão, podendo comprometer o controle inibitório do eixo HHA e também alterar a estrutura e funções hipocampais. Sendo estes ativados pelo estresse por existirem grande densidade de receptores de glicocorticoides (HERMAN, 1997). Em outro estudo, MALTA, (2012), realizaram ECI em ratos machos por 14 dias e encontraram aumento de RG em regiões límbicas, por vezes relacionado com alterações comportamentais, hipertrofia da glândula adrenal, aumento de corticosterona.

O estresse ativa o eixo HHA e após minutos a secreção de glicocorticoides é estimulada e em pacientes depressivos a concentração de glicocorticoides parece estar elevada (JURUENA, 2013). No entanto, sabemos que nem todo paciente que apresenta depressão tem hipercortisolemia e nem todo aquele que tem hipercortisolemia tem depressão, tornando difícil a sua interpretação.

Nos nossos achados, podemos inferir que a expressão de RG no grupo ECI, na região de giro denteado, foi aumentada devido ao estresse e provavelmente se o estresse crônico imprevisível tivesse perdurado em dias ou talvez em intensidade os receptores de glicocorticoides apresentariam resistência e a expressão poderia estar reduzida.

## 7. CONCLUSÃO

Nossos resultados demonstraram que animais submetidos ao modelo de estresse apresentaram comportamentos tipo ansiogênico e depressivos, sendo revertidos pela LIRA. Os níveis de BDNF diminuíram nos animais ECI e aumentaram naqueles tratados com LIRA. A zona cortical revelou hipertrofia e a LIRA em menor dose conseguiu reduzir. Encontramos elevada a expressão de GFAP e a densidade dos espinhos dendríticos com aumento da intensidade de receptores de glicocorticoides no modelo estudado.

Embora o modelo seja amplamente realizado, ele pode ser complicado e demanda tempo, pois os estressores variam extensamente e nem sempre os resultados são totalmente reprodutíveis. Entretanto, estudos investigativos sobre os mecanismos subjacentes envolvidos no efeito tipo-antidepressivo da LIRA são necessários.

## REFERÊNCIAS

- ABBOTT, C.R.; MONTEIRO, M.; PEQUENO, C.J.; SAJEDI, A.; SMITH, K.L.; PARKINSON, P.; GHATEI, M.A.; BLOOM, S.R. Os efeitos inibitórios da administração periférica do peptídeo YY (3-36) e peptídeo-1 semelhante ao glucagon na ingestão alimentar são atenuados pela ablação da via vagal-tronco cerebral-hipotalâmica. **Cérebro Res.** 2005; 1044 : 127–131.
- ADMON, R.; LUBIN, G.; STERN, O.; ROSENBERG, K.; SEL, L.; BEN-AMI, H.; HENDLER, T. Human vulnerability to stress depends on amygdala's predisposition and hippocampal plasticity. **Neuroscience**, v. 106, n. 33, p. 14120–14125, 2009.
- ALBASSER, M.M.; DAVIES, M.; FUTTER, J.E.; AGGLETON, J.P. Magnitude of the object recognition deficit associated with perirhinal cortex damage in rats: Effects of varying the lesion extent and the duration of the sample period. **Behav Neurosci.** v.123 (1), p.115-24, 2009.
- ALFAREZ, D.N.; MARIANAS, J.; KRUGERS, H.J. Chronic unpredictable stress impairs long-term potentiation in rat hippocampal CA1 area and dentate gyrus in vitro. **European Journal of Neuroscience**, v.17, p.1928±1934, 2003.
- ALI, S. H. et al. Resveratrol ameliorates depressive-like behavior in repeated corticosterone-induced depression in mice. **Steroids**, v. 101, p. 37–42, 1 set. 2015.
- AMERICAN PSYCHIATRIC ASSOCIATION. **Depression.** Disponível em: <<http://psychiatric.org/depression>>. Acesso em 05 de abril de 2019.
- AMERICAN PSYCHIATRIC ASSOCIATION (APA). Diagnostic and Statistical Manual of Mental disorders – **DSM-5.** 5th ed. Washington: APA; 2013.
- ANDERSEN, S. L.; TOMODA, A.; VINCOW, E. S.; VALENTE, E.; POLCARI, A.; TEICHER, M. H. Preliminary evidence for sensitive periods in the effect of childhood sexual abuse on regional brain development. **J neuropsychiatry Clin Neurosci.**, v. 20, n.3, p. 292-301, 2008.
- ANGLADE, F.; BIZOT, J.C.; DODD, R.H.; BAUDOIN, C.; CHAPOUTHIER, G. Opposite effects of cholinergic agents and benzodiazepine receptor ligands in a passive avoidance task in rats. **Neurosci Lett**, v.182, p.247-50, 1994.
- ANTUNES, M.; BIALA, G. The novel object recognition memory: neurobiology, test procedure, and its modifications. **Cognitive processing**, v. 13, n. 2, p. 93–110, maio 2012.
- ALVAREZ, E.; RONCERO, I.; CHOWEN, J.A.; GARCIA, C.B.; GISPERT, J.D.; SANZ, C.; VAZQUEZ, P.; MALDONADO, A.C.J.; DESCO, M.; POZO, M.A.; BLAZQUEZ E. The expression of GLP-1 receptor mRNA and protein allows the effect of GLP-1 on glucose metabolism in the human hypothalamus and brainstem. **J Neurochem** 92: 798–806, 2005.
- ARCHER, J. Tests for emotionality in rats and mice: a review. **Anim Behav**, v.21, n.2, p.205-235, 1973.
- ARNSTEN, A. F. Stress signalling pathways that impair prefrontal cortex structure and function. **Nat rev neurosci.** v. 10. p. 410-422, 2009.

BAGGIO, L.L.; HUANG, Q.; MARRON, T.J.; DRUCKER, D.J. A oxintomodulina e o peptídeo-1 tipo glucagon regulam diferencialmente a ingestão de alimentos e o gasto energético de ratos. **Gastroenterologia**. 127 : 546-558, 2004.

BARDEN, N. Implication of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis in the physiopathology of depression. **Journal of psychiatry & neuroscience**: JPN, v.29, n.3, p. 185-93, 2004.

BARNETT, S.A. O rato - um estudo no comportamento. Univ. Chicago Press; Chicago: 1975.

BAO, Y.; JIANG, L.; CHEN, H.; ZOU, G.; LIU, Z.; SHI, Y. O efeito neuroprotetor do liraglutide é mediado pela ativação do peptídeo semelhante ao glucagon 1 da via cAMP/PKA/CREB. **Physiol Biochem**, 36 (6), 2015.

BELMARKER, R.H.; GALILA, A. Major Depressive Disorder. **N Engl J Med**, 2008; 358: 55-68.

BLEAKLEY, S. Review of the choice and use of antidepressant drugs. **Progress in Neurology and Psychiatry** November/December, p.18-26, 2013.

BOING, A.F.; MELO, G.R.; BOING, A.C. Associação entre depressão e doenças crônicas: um estudo populacional. **Rev. Saúde Pública**. 2012.

BORTOLATO, B.; MISKOWIAK, K.W.; KÖHLER, C.A.; et al. Remissão cognitiva: um novo objetivo para o tratamento da depressão maior? **BMC Med.**; 14: 9.2016.

BOULLE, F.; MASSART, R.; STRAGIER, E. Disfunções hipocámpais e comportamentais em um modelo murino de estresse ambiental: normalização por agomelatina. **Psiquiatria Translacional** v.4, p.485, 2014.

BRIGITTA, B. Pathophysiology of depression and mechanisms of treatment, **Dialogues Clin. Neurosci.** v.4, p.7–20, 2002.

BRUNTON, L.L.; CHABNER, B.A.; KNOLLMANN, B.C. As bases farmacológicas da terapêutica de **Godman e Gilman**. 12. Ed. Porto Alegre: AMGH, 2012, 2019.

BURKE, H.M.; DAVIS, M.C.; OTTE, C.; MOHR, D.C. Depression and cortisol responses to psychological stress: a meta-analysis. **Psychoneuroendocrinology**. 30(9):846-56. 39, 2005.

CAN, A. et al. The tail suspension test. **Journal of visualized experiments : JoVE**, n. 59, p. e3769–e3769, 28 jan. 2012.

CARVALHO, D.; SILVA, N.J.; RAPOSO, J. F.; MEDINA, J.L.; JÁCOME J.C.; CARRILHO, F. Agonistas dos Receptores do GLP-1 no Tratamento da Diabetes Tipo 2. **Revista Portuguesa de Diabetes**. 11 (4): 154-166, 2016.

CHEN, Y.; KRAMAR, E.A.; CHEN, L.Y. et al. O comprometimento da plasticidade sináptica pelo mediador do estresse CRH envolve a destruição seletiva de espinhas dendríticas finas por meio de sinalização RhoA. **Psiquiatria Molecular**, 2013.

CHENG, J.; DONG, S.; YI, L.; GENG, D.; LIU, Q. Magnolol abrogates chronic mild stress-induced depressivelike behaviors by inhibiting neuroinflammation and oxidative stress in the prefrontal cortex of mice. **International Immunopharmacology**. v.8; p.59:61-7, 2018.

CORDÁS, T.A. **Depressão: da bile negra aos neurotransmissores, uma introdução histórica**. São Paulo: Lemos; 2002.

COX, W.H. Impregnation descentralen nerven systems mit quecksilbersalzen. **Arch. Mikr. Anat.** 37, 16–21, 1891.

CUIJPERS, P.; BEEKMAN, A.T.; REYNOLDS, C.F. Preventing depression: a global priority, **JAMA**, v.307 (10) p.1033–1034, 2012.

CRYAN, J.F.; MOMBÉREAU, C.; VASSOUT, A. O teste da suspensão da cauda como um modelo para avaliar a atividade antidepressiva: revisão de estudos farmacológicos e genéticos em camundongos. **Neurosci Biobehav Rev.** 29 (4–5): 571–625, 2005.

CUNNINGHAM, M.G.; GOLDSTEIN, M.; KATZ, D.; O'NEIL, S.Q.; JOSEPH, A.; PRICE, B.; Coalescence of psychiatry, neurology, and neuropsychology: from theory to practice. **Harv Rev Psychiatry**.14(3):127-40, 2006.

DALEKE, D. L. Regulation of phospholipid asymmetry in the erythrocyte membrane. — **Curr Opin Hematol** 15, 191-5, 2008.

DALL'IGNA, O.P. et al. Caffeine and adenosine A (2a) receptor antagonists prevent beta-amyloid (25-35)-induced cognitive deficits in mice. **Experimental neurology**, v.203, n.1, p.241-5, jan.2007.

DAVID, D. J. et al. Behavioral effects of Fluoxetine in an animal model of anxiety/depression are mediated by both neurogenesis-dependent and independent mechanism. **Neuron**, v. 62, n. 4, p. 479–493, 2009.

DE KEYSER, J. et al. Dysfunctional astrocytes as key players in the pathogenesis of central nervous system disorders. **J Neurol. Sci.**, v.267, n.1-2, p.3-16, 2008.

DE KLOET, E.R.; VREUGDENHIL, E.; OITZL, M.S.; JOELS, M. Brain corticosteroid receptor balance in health and disease. **Endocr Rev** 19: 269 –301, 1998.

DeNOBLE, V. J.; REPETTI, S. J.; GELPKE, L.W.; WOOD, L. M.; KEIM, K. L. Vinpocetine: nootropic effects on scopolamine-induced and hypoxia-induced retrieval deficits of a step-through passive avoidance response in rats. **Pharmacol. Biochem. Behav.**, v. 24, n. 4, p.1123-1128, 1986.

DETKE, M.J.; RICKELS, M.; LUCKI, I. Active behaviors in the rat forced swimming test differentially produced by serotonergic and noradrenergic antidepressants. **Psychopharmacology** v.121, p.66-72, 1995.

DHIR, A.; KULKARNI, S. K. Nitric oxide and major depression. **Nitric Oxide**. 24; p. 125–131, 2011.  
DRAPIER, D.; BENTUÉ-FERRER, D.; LAVIOLLE, B.; MILLET, B.; ALLAIN, H.; BOURIN, M.; REYMANN, J. M. Effects of acute fluoxetine, paroxetine and desipramine on rats tested on the elevated plus-maze. **Behavioural Brain Research**, v. 176, p.202-209, 2007.



DUMAN, R.S.; MALBERG, J.; NAKAGAWA, S.; D'AS, C. Plasticidade neuronal e sobrevivência em transtornos de humor. **Psiquiatria Biol.** v.48 (8), p.732-9, 2000.

DUMAN, R.S.; AGHAJANIAN, G.K.; SANACORA, G.; KRYSTAL, J.H. Plasticidade sináptica e depressão: novos insights do estresse e antidepressivos de ação rápida. **Nat Med** . 2016.

DURING, M.J.; CAO, L.; ZUZGA, D.S.; FRANCIS, J.S.; FITZSIMONS, H.L.; JIAO, X.; BLAND, R.J.; KLUGMANN, M.; BANKS, W.A.; DRUCKER, D.J.; HAILE, C.N. O receptor peptídico-1 semelhante ao glucagon está envolvido no aprendizado e neuroproteção. **Nat Med.**; v.9 (9), p.1173, 2003.

ENNACEUR, A.; DELACOUR, J. A one-trial test for neurobiological studies of memory in rats. Behavioral data. **Behav. Brain Res.**, v.31, p.47-59, 1988.

FAVA, M.; GRAVES, L.M.; BENAZZI, F.; SCALIA, L.J.; IOSIFESCU, D.V.; ALPERT, J.E.; PAPAPOSTOLAS, G.I. A cross-sectional study of the prevalence of cognitive and physical symptoms during long-term antidepressant treatment. **Journal of Clinical Psychiatry**, v.67, p.1754-1759, 2006.

FEDER, A.; NESTLER, E.J.; CHARNEY, D.S. Psicobiologia e genética molecular da resiliência. Revisões da natureza. **Neurociência**. 10: 446-457, 2009.

FILHO, P. W. L. L. et al. Peritoneal endometriosis induces time-related depressive- and anxiety-like alterations in female rats: involvement of hippocampal pro-oxidative and BDNF alterations. **Metabolic Brain Disease**, 2019.

FURUIACHIKI, T.; DEGUCHI, Y. Roles of Altered Striatal Function in Major Depression. **Brain e Nerve**, v. 64, p. 919-926, 2012.

GAFOOR, R.; BOOTH, H.P.; GULLIFORD, M.C. Utilização de antidepressivos e incidência de ganho de peso durante 10 anos de seguimento, **BJM** 361: k1951, 2018.

GAMALLO, A., VILLANUA, A., TRANCHO, G., FRAILE, A. Stress adaptation and adrenal activity in isolated and crowded rats. **Physiol Behav** 36: 217–221, 1986.

GILAD, G.M.; SCHILLER, I. Differences in open-field behavior and in learning tasks between two rat strains differing in their reactivity to stressors. **Behav Brain Res.**, v.32, p.89-93, 1989.

GODLEWSKA, B.R.; BROWNING, M.; NORBURY, R.; IGOUMENOU, A.; COWEN, P.J.; HARMER, C.J. Prevendo a resposta ao tratamento na depressão: o papel do córtex cingulado anterior. **Int J Neuropsychopharmacol.** v.21 (11): p.988-996, 2018.

GOMES, F.C.A.; PAULIN, D.; MOURA NETO, V.. Glial fibrillary acidic protein (GFAP): modulation by growth factors and its implication in astrocyte differentiation. **Braz J Med Biol Res**, v. 32, n. 5, p. 619-631, 1999.

GONÇALVES, F.A.; COELHO, R. Depressão e Tratamento: Apoptose, Neuroplasticidade e Antidepressivos. **Acta Med Port**, 19: 9-20, 2006.

GONÇALVES, C.A.V.; MACHADO, A.L. Depressão, o mal do século: de que século? **R Enferm UERJ**, v. 15(2), p. 298-304, 2007.

GOULART, B. K. et al. Ketamine impairs recognition memory consolidation and prevents learning-induced increase in hippocampal brain-derived neurotrophic factor levels. **Neuroscience**, v. 167, n. 4, p. 969–973, 2010.

GRAEFF, F.G.; GUIMARÃES, F.S.; DE ANDRADE, T.G.C.S.; DEAKIN, J.F.W. Papel da 5-HT no estresse, ansiedade e depressão. **Pharmacology, Biochemistry and Behavior**, v.54, p.129-141, 1996.

HANSON, J. L.; CHUNG, M. K.; AVANTS, B. B.; RUDOLPH, K. D.; SHIRTCLIFF, E. A.; GEE, J. C.; DAVIDSON, R. J.; POLLAK, S. D. Structural variations in prefrontal cortex mediate the relationship between early childhood stress and spatial working memory. **The journal of neuroscience**, v. 32, n. 23, p. 7917–7925, 2012.

HARISH, G., MAHADEVAN, A., SRINIVAS BHARATH, M. M. & SHANKAR, S. K. Alteration in glutathione content and associated enzyme activities in the synaptic terminals but not in the non-synaptic mitochondria from the frontal cortex of Parkinson's disease brains. — **Neurochem Res** 38, 186-200, 2013.

HASLER, G. Pathophysiology of depression: do we have any solid evidence of interest to clinicians? **World Psychiatry**, 9: 155-161, 2010.

HERMAN, J.P.; CULLINAN, W.E. Neurocircuitry of stress: central control of the hypothalamus-pituitary-adrenal axis. **Trends Neurosci**; 20:78-84, 1997.

HILLHOUSE, T.M.; POTER, J.H. "A brief history of the development of antidepressant drugs: from monoamines to glutamate." **Experimental and clinical psychopharmacology** vol. 23,1, 2015.

HIMMELHOCH, J.M. Monoamine oxidase inhibitors. In: Kaplan HI, Sadock BJ, editors. **Comprehensive textbook of psychiatry**. 6th ed. Baltimore: Williams & Wilkins; p. 2038-56, 1995.

HISADOME, K.; REIMANN, F.; GRIBBLE, F.M.; TRAPP, S. Leptin directly depolarizes preproglucagon neurons in the nucleus tractus solitarius: electrical properties of glucagon-like Peptide 1 neurons. **Diabetes**. 59(8):1890–1898, 2010.

HOLSBOER, F. A hipótese do receptor de corticosteróide de depressão. **Neuropsicofarmacologia**. v.23: 477-501, 2000.

HUANG, Q.L.; LING, W.U.; HUA-LI, C.; MIN-XUAN, X.; ZHEN-JIANG, S. J. Comparison between two animal models of depression induced by corticosterone repeated injection and chronic unpredictable mild stress. **AAS**. v.48, (3) p. 273-281, 2017.

HU, C.; LUO, Y.; WANG, H.; et al. Re-evaluation of the interrelationships among the behavioral tests in rats exposed to chronic unpredictable mild stress. **PLoS One**. 12(9), 2017.

HUGHES, E. G.; MAGUIRE, J. L.; MCMINN, M. T. et al. Loss of glial fibrillary acidic protein results in decreased glutamate transport and inhibition of PKA-induced EAAT2 cell surface trafficking. **Mol Brain Res**, v. 124, n. 2, p. 114-23, 2004.

HYMAN, S.E. Como os ratos lidam com situações sociais estressantes. **Célula**. 2007; 131 (2): 232-234. 2007.

ISINGRINI, E., et al. "Association between repeated unpredictable chronic mild stress (UCMS) procedures with a high fat diet: a model of fluoxetine resistance in mice." **PloS one** vol. 5,4 e10404. 28, 2010.

ISQUIERDO, I.; MEDINA, J.H. Memory formation: the sequence of biochemical events in the hippocampus and its connection to activity in order brain structures. **Neurobiol Learn Mem**. v.68, p.285-316, 1997.

JOCA, S.R.L.; PADOVAN, C.M.; GUIMARÃES, F.S. Estresse, Depressão e Hipocampo. **Rev. Bras. Psiquiatr**. v.25, 2, São Paulo, 2003.

JURUENA, M.F. Early-life stress and HPA axis trigger recurrent adulthood depression. **Epilepsy Behav**. pii: S1525-5050(13)00553-2, 2013.

JURUENA, M.F.; CLEARE, A.J.; BAUER, M.E.; PARIANTE, C.M. "Molecular mechanism of GR sensitivity and relevance for affective disorders". **Acta Neuropsychiatr**. 15:354-67, 2003.

KALUEFF, A. V et al. Neurobiology of rodent self-grooming and its value for translational neuroscience. **Nature reviews. Neuroscience**, v. 17, n. 1, p. 45–59, 2016.

KATZ, R.; HERSCH, S. Amitriptilina e escopolamina em um modelo animal de depressão **Neurosci Biobehav**, Rev., 5, p. 265 – 271, 1981.

KEMALI, M. A modification of the rapid Golgi method. **Stain Technol**. 51, 169–172, 1976.

KENDLER, K.S.; KARKOWSKI, L.M.; PRESCOTT, C.A. A avaliação da dependência no estudo de eventos de vida estressantes: validação usando um desenho duplo. **Medicina psicológica**. 29 : 1455-1460, 1999.

KENDLER, K.S.; HETTEMA, J.M.; BUTERA, F.; GARDNER, C.O.; PRESCOTT, C.A. Life event dimensions of loss, humiliation, entrapment, and danger in the prediction of onsets of major depression and generalized anxiety. **Arch Gen Psychiatry**. 60(8):789-96, 2003.

KENNEDY, S.H.; EMSLEY, R. Placebo-controlled trial of agomelatine in the treatment of major depressive disorder. **Eur Neuropsychopharmacol**.16(2):93-100, 2006.

KIM, W., EGAN, J.M. O papel das incretinas na homeostase da glicose e no tratamento do diabetes. **Pharmacol Rev** . 60 (4): 470-512, 2008.

KNUDSEN, L.B.; LAU, J.E. The Discovery and Development of Liraglutide and Semaglutide. *Frente*. **Endocrinol** . 10: 155, 2019.

KRISHNAN, V.; BERTON, O.; NESTLER, E. The use of animal models in psychiatric research and tratamento. **Am J Psychiatry**. 165(9): 1109, 2008.

KRISHNAN, V.; NESTLER, E.J. The molecular neurobiology of depression. **Nature**, n 16, p.894-902, 2008.

KOSHAL, P.; KUMAR, P.; CHOPRA, K. Modulação neuroquímica envolvida no efeito benéfico do liraglutídeo, agonista do GLP-1 nas comorbidades induzidas por epilepsia da inflamação de PTZ em camundongos. **Mol Cell Biochem**. v.415:77-87, 2016.

KUMAR, B.; KUHAD, A.; CHOPRA, K. Neuropsychopharmacological effect of sesamol in unpredictable chronic mild stress model of depression: behavioral and biochemical evidences. **Psychopharmacology**, v.214, n.4, p.819, 2011.

KUIPERS SD, TRENTANI A, DEN BOER JA, AND TER HORST GJ. Molecular correlates of impaired prefrontal plasticity in response to chronic stress. **J Neurochem** 85: 1312–1323, 2003.

LAM, R.W.; KENNEDY, S.H.; MCLNTYRE, R.S.; KHULLAR, A. Disfunção cognitiva no transtorno depressivo maior: efeitos sobre o funcionamento psicossocial e implicações para o tratamento. **Pode J Psiquiatria** . v.59 (12), p.649-654, 2014.

LAWLOR C. From melancholia to prozac: a history of depression. New York: **Oxford University**; 2012.

LENOUX, J.E.; MULLER, J. Emotional memory and psychopathology. **Philos. Trans. R. Soc. London B**. v.352, p.1719-1726, 1997.

LEONARD, B.E.; O conceito de depressão como uma disfunção do sistema imunológico. **Curr Immunol Rev** . 6 (3): 205-212, 2010.

LICINIO, J.W. Cytokines pathways in the brain. In: Kronfol Z, editor. **Cytokines and mental health**. Boston: Kluwer:v.1, p.426, 2003.

LINTHORST, A.C.E.; PEÑALVA, R.G.; FLACHSKAMM, C.; HOLSBOER, F.; REUL, E. O estresse de nado forçado ativa a neurotransmissão serotoninérgica do hipocampo de rato, envolvendo um mecanismo dependente do receptor do hormônio liberador de corticotropina. **European Journal of Neuroscience**, 16 , 2441-2452, 2002.

LISTER, R.G. The use of a plus-maze to measure anxiety in the mouse. **Psychopharmacology**. 92:180–185, 1987.

LIU, L.; DONG, Y.; SHAN, X.; LI, L.; XIA, B.; WANG, H. Anti-Depressive Effectiveness of Baicalin In Vitro and In Vivo. **Molecules**, v.24, p.326, 2019;

LIU, W.; GE, T.; LENG, Y. et al. O papel da plasticidade neural na depressão: do hipocampo ao córtex pré-frontal. **Plast Neural**, 2017.

LIU, Q.; LI, B.; ZHU, H.Y.; WANG, Y.Q.; YU, J.; WU, GC. Glia atrophy in the hippocampus of chronic unpredictable stress-induced depression model rats is reversed by electroacupuncture treatment. **J Affect Disord**, v. 128, n. 3, p. 309-13, 2011.

LOPES, C.S.; HELLWIG, N.; SILVA, G.A.; MENEZES, P.R. Inequities in access to depression treatment: results of the Brazilian National Health Survey – PNS. **Int J Equity Health**.15:154, 2016.

LORENZETTI, V.; ALLENB, N.B.; FORNITOA, A.; YÜCEL, M. Structural brain abnormalities in major depressive disorder: a selective review of recent MRI studies. **Journal of Affective Disorders**. Sep; 117( 1-2):1-17, 2009.

MADSBAD, S.; SCHMITZ, O.; RANSTAM, J.; JAKOBSEN, G.; MATTHEWS, D.R. Improved glycemic control with no weight increase in patients with type 2 diabetes after once-daily treatment with the long-acting glucagon-like peptide 1 analog liraglutide (NN2211): A 12-week, double-blind, randomized, controlled trial. **Diabetes Care**. 27: 1335–42. 32, 2004.

MAES, M.; GALECKI, P.; CHANG, Y.S.; BERK, M. A review on the oxidative and nitrosative stress (O&NS) pathways in major depression and their possible contribution to the (neuro) degenerative process in that illness. **Progress in Neuro-Psychopharmacology & Biological Psychiatry**, n.35, p.676-692, 2011.

MAHLI, G.S.; MOORE, J.; MCGRIFFIN, P. The genetics of major depression disorder. **Curr Psychiatry Rep**. 2:165-9, 2000.

MALETIC V, RAISON CL. Neurobiology of depression, fibromyalgia and neuropathic pain. **Front Biosci**. Jun; 14: 5291-338, 2009.

MANOSSO, L.M.; MORETTI, M.; COLLA, A.R.; RIBEIRO, C.M.; DAL-CIM, T.; TASCA, C.I.; RODRIGUES, A.L.S. Involvement of glutamatergic neurotransmission in the antidepressant-like effect of zinc in the chronic unpredictable stress model of depression. **Journal of Neural Transmission**, v. 123, n. 3, p.339-352, 2016.

MCFARLANE, A.; CLARK, C.R.; BRYANT, R.A.; WILLIAMS, L.M.; NIAURA, R.; PAUL, R.H.; HITSMAN, B.L.; STROUD, L.; ALEXANDER, D.M.; GORDON, E. The impact of early life stress on psychophysiological, personality and behavioral measures in 740 non-clinical subjects. **J Int Neurosci**. 4(1):27-40, 2005.

MCINTYRE, R.S.; CHA, D.S.; SOCZYNSKA, J.K.; WOLDEYOHANNES, H.O.; GALLAUGHER, L.A.; KUDLOW, P.; ALSUWAIDAN, M.; BASKARAN, A. Cognitive deficits and functional outcomes in major depressive disorder: determinants, substrates, and treatment interventions. **Depress Anxiety**, 30: 515-527, 2013.

MCINTYRE, R.S.; O'DONOVAN, C. The human cost of not achieving full remission in depression. **Can J Psychiatry**. 49(3 Suppl 1): 10S-16S. 66, 2004.

MEERAN, K.; O'SHEA, D.; EDWARDS, C.M.; TURTON, M.D.; HEATH, M.M.; GUNN, I.; ABUSNANA, S.; ROSSI, M.; SMALL, C.J.; GOLDSTONE, A.P.; et al. A administração intracerebroventricular repetida de peptídeo-1- (7-36) amida ou exendina- (9–39), semelhante ao glucagon, altera o peso corporal no rato. **Endocrinologia**. 140 : 244-250, 1999.

MIDDELDORP, J.; HOL, E.M. GFAP in health and disease. **Progress in Neurobiology**, v.93, p.421-443, 2011.

MISANE, I.; JOHANSSON, C.; ÖGREN, S.O. Analysis of the 5-HT<sub>1A</sub> receptor involvement in passive avoidance in the rat. **Br J Pharmacol**. v.125, p.499-509, 1998.

MONTEGOMERY, D.L. Astrocytes: form, function and roles in disease. **Veterinary Pathology**, v.31, p.145-167, 1994.

MORALES-MEDINA, J. C.; SANCHEZ, F.; FLORES, G.; DUMONT, Y.; QUIRION, R. Morphological reorganization after repeated corticosterone administration in the hippocampus, nucleus accumbens and amygdala in the rat. **J. Chemical of neuroanatomy**, v. 38, n. 4, p. 266–272, 2009.

MORASKA, A., DEAK, T., SPENCER, R.L., ROTH D, FLESHNER, M. Treadmill running produces both positive and negative physiological adaptations in Sprague-Dawley rats. **Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol** 279: R1321–R1329, 2000.

MOREIRA, R.O.; PAPELBAUM, M.; APPOLINARIO, J. C.; MATOS, A. G.; COUTINHO, W. F.; MEIRELLES, R. M. R.; ELLINGER, V. C. M.; ZAGURY, L. Diabetes mellitus e depressão: uma revisão sistemática. **Arq Bras Endocrinol Metab**, v.47(1), p. 19-29, 2003.

MORENO, R.A.; HUPFELD, D.; SOARES, M.B.M. A escolha do antidepressivo nos transtornos de humor: papel da nortriptilina. **J Bras Psiquiatria**. n.1, p.33-35, 1999.

MORENO, R.A.; MORENO, D.H.; SOARES, M.B.M. Psicofarmacologia de antidepressivos. **Rev. Bras. Psiquiatr.**, São Paulo , v. 21, supl. 1, p. 24-40, 1999.

NAUCK, M.A.; HOMPESCH, M.; FILIPICAZAK, R.; LE, T.D.; ZDRAVKOVIC, M.; GLUMPRECHT, J. Five weeks of treatment with the GLP-1 analogue liraglutide improves glycaemic control and lowers body weight in subjects with type 2 diabetes. **Exp Clin Endocrinol Diabetes**. 114: 417–23. 33, 2006.

NEMEROFF, C.B.; Recent findings in the pathophysiology of depression, **Focus** v.6 (1), p.3–14, 2008.

NICOL, W.D. Robert Burton's anatomy of melancholy. **Postgrad Med J**. 24(270):199-206, 1948.

NYBORG; N.C.; MØLCK, A.M.; MADSEN, L.W.; KNUDSEN, L.B. The human GLP-1 analog liraglutide and the pancreas: evidence for the absence of structural pancreatic changes in three species. **Diabetes**. 61(5):1243–1249, 2012.

NUTT, D. J.; Relationship of neurotransmitters to the symptoms of major depressive disorder. **J Clin Psychiatry**, n.69, p. 4-7, 2008.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE. Classificação de transtornos mentais e de comportamento da CID-10: critérios diagnósticos para pesquisa. São Paulo: **Artes Médicas**; 1993.

PARDON, M.C. et al. Age-dependent effects of a chronic ultramild stress procedure on open-field behaviour in B6D2F1 female mice. **Physiology & Behavior**. v.70; 7-13, 2000.

PARKER, K.J.; SCHATZBERG, A.F.; LYONS, D.M. Neuroendocrine aspects of hyper-cortisolism in major depression. **Hormones and Behavior**. v.43:60–66, 2003.

PELLOW, S.; FILE, S.E. Anxiolytic and anxiogenic drug effects on exploratory activity in elevated plus-maze: A novel test of anxiety in the rat. **Pharmacology, Biochemistry and Behavior**, 24, 525-529, 1986.

PERRY, T.; HAUGHEY, N.J.; MATTSON, M.P.; EGAN, J.M.; GREIG, N.H. Proteção e reversão do dano neuronal excitotóxico pelo peptídeo-1 semelhante ao glucagon e pela exendina-4. **J Pharmacol**. v. 302 (3), p.881-8, 2002.

PITTENGER, C.; DUMAN, R.S. Stress, depression and neuroplasticity: a convergence of mechanisms. **Neuropsychopharmacol.** 15(2): 153-8, 2005.

POPOLI, M.; YAN, Z.; MCEWEN, B. S. et al. The stressed synapse: the impact of stress and glucocorticoids on glutamate transmission. **Nat Rev Neurosci**, v. 13, n. 1, p. 22-37, 2012.

PORSOLT, R.D.; BERTIN, A.; JALFRE, M. Behavioral despair in mice: a primary screening test for antidepressants. *Arch. Int. Pharmacodyn. Ther.* v.229, p. 327-36, 1977.

PRUT, L.; BELZUNG, C. The open field as a paradigm to measure the effects of drugs on anxiety-like behaviours: a review. **European Journal of Pharmacology**. v. 463, n.1-3, p.3- 33, 2003.

QIAO, H.; REN, S.C.; W., Ma XM Alterações progressivas do hipocampo CA3-CA1 sinapses em um modelo animal de depressão. **Pesquisa Comportamental do Cérebro**. 275 : 191–200, 2014.

QIAO, H; LI, M.X.; XU, C.; CHEN H.B.; AN, S.C.; MA, X.M. Espinhos dendríticos na depressão: o que aprendemos com modelos animais. **Plast Neural** . 2016.

QUEVEDO, J.; SILVA, A.G. Depressão: teoria e clínica. Porto Alegre: **Artmed**, 248p, 2013.

RADDEN, J. The nature of melancholy: from Aristotle to Kristeva. New York: Oxford University; 2000.

RADLEY, J. J.; MORRISON, J. H. Repeated stress and structural plasticity in the brain. **Ageing res rev.**,v. 4, n. 2, p. 271-287, 2005.

RAMPON, C., TANG, Y.P.; GOODHOUSE, J.; SHIMIZU, E.; KYIN, M.; TSIEN, J.Z. Enrichment induces structural changes and recovery from nonspatial memory deficits in CA1 NMDAR1-knockout mice. **Nat Neurosci**. v.3(3), p.238-44, 2000.

ROUSSEAU, G. Depression's forgotten genealogy: notes towards a history of depression. **Hist Psychiatry**. 11 (41 Pt 1):71-106, 2000.

RUBALCAVA, C.L.; LUCK, I. Strain Differences in the Behavioral Effects of Antidepressant Drugs in the Rat Forced Swimming Test. **Neuropsychopharmacology**. v.22, n.2, 2000.

SALCEDO, E.U.; TWEEDIE, D.; LI, Y.; GREIG, N.H. ações neuroprotetoras e neurotróficas do peptídeo semelhante ao glucagon-1: uma oportunidade emergente para tratar distúrbios neurodegenerativos e cerebrovasculares. **Br J Pharmacol**. 166 (5), p.1586-99, 2012.

SCHATZBERG, A.F.; COLE, J.O.; DEBATTISTA, C. Manual of clinical psychopharmacology. 5th ed. Arlington: **American Psychiatry Publishing**; p. 239-61, 2005.

SCHIRRA, J.; NICOLAUS, M.; ROGGEL, R.; KATSCHINSK, I.M.; STORR, M.; WOERLE, H.J. et al. Endogenous glucagon-like peptide 1 controls endocrine pancreatic secretion and antro-pyloro-duodenal motility in humans. **Gut**. 55(2):243-51, 2006.

SILVERMAN, M.N.; PEARCE, B.D.; BIRON, C.A.; MILLER, A.H. Immune modulation of the hypothalamic-pituitary-adrenal (HPA) axis during viral infection. **Viral Immunol**. 18(1):41-78, 2005.

SOKOLOW, S., HENKINS, K. M., BILOUSOVA, T., GONZALEZ, B., VINTERS, H. V., MILLER, C. A., CORNWELL, L., POON, W. W. & GYLYS, K. H. Pre-synaptic C-terminal truncated tau is released from cortical synapses in Alzheimer's disease. — **J Neurochem** 133, 368-79, 2015.

SOUSA, C. N. S. DE et al. Reversal of corticosterone-induced BDNF alterations by the natural antioxidant alpha-lipoic acid alone and combined with desvenlafaxine: Emphasis on the neurotrophic hypothesis of depression. **Psychiatry research**, 1 set. 2015.

SOUSA, N.; LUKOYANOV, N.V.; MADEIRA, M.D.; ALMEIDA, O.F.X.; PAULA-BARBOSA, M.M. Reorganização da morfologia das neurites do hipocampo e sinapses após dano induzido pelo estresse correlaciona-se com a melhoria comportamental. **Neurociência** . 97 (2): 253–266, 2000.

STAHL, S. M. **Psicofarmacologia: Bases Neurocientíficas e Aplicações Práticas**. 4. Ed. São Paulo: **Guanabara Koogan**. 713 p, 2014.

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

TANG-CHRISTENSEN, M.; LARSEN, P.J.; GÖKE, R.; FINK-JENSEN, A.; JESSOP, D.S.; MOLLER, M.; SHEIKH, S.P. A administração central de GLP-1- (7-36) amida inibe a ingestão de alimentos e água em ratos. **Sou J Physiol**. 271 : R848-R856, 1996.

TRICKLEBANK, M.D.; DALY, E. O Sistema serotoninérgico: história, neurofarmacologia e patologia, 2019.

TOFOLI, S.M.C.; BAES CRISTIANE, V.W.; MARTINS, C.M.S.; JURUENA, M. Early life stress, HPA axis, and depression. **Psychol Neurosci**. 2011;4(2):229-34.

TOMODA, A; NAVALTA, C. P.; POLCARI, A.; SADATO, N.; TEICHER, M. H. Childhood sexual abuse is associated with reduced gray matter volume in visual cortex of young women. **Biol psychiatry**. V. 66, n. 7, p. 642-648, 2009.

TOMODA, A.; POLCARI, A.; ANDERSON, C. M.; TEICHER, M. H. Reduced visual cortex gray matter volume and thickness in young adults who witnessed domestic violence during childhood. **Plos one**, v.7, n. 12, p. 1-11, 2012.

TURTON, M.D.; O'SHEA, D.; GUNN, I.; BEAK, S.A.; EDWARDS, C.M.; MEERAN, K.; CHOI, S.J.; TAYLOR, G.M.; HEATH, M.M.; LAMBERT, P.D. et al. Papel do peptídeo semelhante ao glucagon-1 na regulação central da alimentação. **Natureza**. 379 : 69-72, 1996.

ULRICH-LAI, Y.M.; H.R.; FIGUEIREDO, H.F.; OSTRANDER, M.M.; CHOI, D.C.; ENGELAND, W.C.; HERMAN, J.P. Chronic stress induces adrenal hyperplasia and hypertrophy in a subregion-specific manner. **Am J Physiol Endocrinol Metab**. 291: E965–E973, 2006.

VALENCIA, A., SAPP, E., KIMM, J. S., MCCLORY, H., ANSONG, K. A., YOHRLING, G., KWAK, S., KEGEL, K. B., GREEN, K. M., SHAFFER, S. A., ARONIN, N. & DIFIGLIA, M. (2013). Striatal synaptosomes from Hdh140Q/140Q knock-in mice have altered protein levels, novel sites of



methionine oxidation, and excess glutamate release after stimulation. — **J Huntingtons Dis** 2, 459-75, 2013.

VAN DER KOOY, K.; VAN HOUT, H.; MARWIJK, H.; MARTEN, H.; STEHOUWER, C.; BEEKMAN, A. Depression and the risk for cardiovascular diseases: systematic review and meta analysis. **International Journal of Geriatric Psychiatry**. v.22 (7), p.613-626, 2007.

VASCONCELOS, A.S. et al. Subchronic administration of riparin III induces antidepressivelike effects and increases BDNF levels in the mouse hippocampus. **Fundamental & Clinical Pharmacology**, v. 29, n. 4, p. 394-403, 2015.

VERMA, R.; NEHRU, B. Effect of centrophenoxine against rotenone-induced oxidative stress in an animal model of Parkinson's disease. **Neurochemistry International** v.55 (6), p.369-75, 2009.

VILSBOLL, T.; ZDRAVKOVIC, M.; LE-THI, T.; et al. Liraglutide significantly improves glycemic control, and lowers body weight without risk of either major or minor hypoglycemic episodes in subjects with type 2 diabetes. **Diabetes**. 55 (suppl 1): 27-28 (abstr 115-OR), 2006.

WALF, A.A.; FRYE, C.A. O uso do labirinto em cruz elevado como um ensaio do comportamento relacionado à ansiedade em roedores. **Nat Protoc**. v. 2 (2): p.322-328, 2007.

WANG, D.; CHENG, S.; ZHANG, X. Prevention of chronic stress-induced depression-like behavior by inducible nitric oxide inhibitor. **Neuroscience Letters**. v. 433: p. 59-64, 2008.

WANG, G.; CHENG, Y.; GONG, M.; LIANG, B.; ZHANG, M.; CHEN, Y.; ZHANG, C.; YUAN, X.; XU, J. Systematic correlation between spine plasticity and the anxiety/depression-like phenotype induced by corticosterone in mice. **NeuroReport**. 24(12):682-687, 2013.

WANG, H.M.; BEYER, M.; GENSICHEN, J.; GERLACH, F.M. Healthrelated quality of life among general practice patients with differing chronic diseases in Germany: cross sectional survey. **BMC Public Health**. 8:246, 2008.

WARAICH, P.; GOLDNER, E.M.; SOMERS, J.M., et al. Prevalence and incidence studies of mood disorders: a systematic review of the literature, **Can. J. Psychiatry** v.49 (2), p.124-138, 2004.

WEINA, H.; YUHU, N.; CHRISTIAN, H.; BIRONG, L.; FEIYU, S.; LE, W. Liraglutide attenuates the depressive- and anxiety-like behaviour in the corticosterone induced depression model via improving hippocampal neural plasticity. **J Brainres**. Sep 1;1694:55-62; 2018.

WILLNER, P.; R. MUSCAT, R.; PAPP, M. Anedonia induzida por estresse leve crônica: um modelo animal realista de depressão. **Neurosci Biobehav**. Rev., 16, p. 525 – 534, 1992.

WILLNER, P. Validade, confiabilidade e utilidade do modelo de estresse leve crônico (CMS) de depressão: uma revisão e avaliação de dez anos. **Psychopharmacology** ,134, p. 319 – 329, 1997.

WILLNER, P. Confiabilidade do modelo de estresse leve crônico da depressão: uma pesquisa com usuários. **Neurobiol Stress**, 6, p. 68 – 77, 2017.

YAMADA, K., et al. The role of nitric oxidizedizocilpine-induced impairment of spontaneous alternation behavior in mice. **The Journal pharmacology and experimental therapeutics**, v.276, n.2, p. 460-6, 1996.

YEHUDA, R. Neuroendocrine aspects of PTSD. **Handb Exp Pharmacol.** (169):371-403, 2005.

YOUNG, A. Inhibition of gastric emptying. **Adv Pharmacol.** 52:99-121, 2005.

YU, H.; CHEN, Z.Y. O papel do BDNF na depressão com base em sua localização no circuito neural. **Acta Pharmacol Sin.** v.32 (1), p.3–11, 2010.

YUSTE, R. The discovery of dendritic spines by Cajal. *Front. Neuroanat.* 9:18, 2015.

ZANDIO, M.; FERRÍN, M.; CUESTA, M.J. Neurobiology of depression. **An Sist Sanit Navar.** 25 Suppl 3:43-62, 2002.

WANG, G.; CHENG, Y.; GONG, M.; LIANG, B.; ZHANG, M.; CHEN, Y.; ZHANG, C.; YUAN, X.; XU, J. Systematic correlation between spine plasticity and the anxiety/depression-like phenotype induced by corticosterone in mice. *NeuroReport.* 24(12):682–687, 2013.