



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE MARINGÁ
Departamento de Farmacologia e Terapêutica
Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas



**EFEITO TIPO ANTIDEPRESSIVO DA MIRICITRINA E SUA RELAÇÃO
COM A NEUROGÊNESE ADULTA EM CAMUNDONGOS**

ERIKA MEYER

Maringá

2016

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE MARINGÁ

Departamento de Farmacologia e Terapêutica

Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas

**EFEITO TIPO-ANTIDEPRESSIVO DA MIRICITRINA E SUA RELAÇÃO
COM A NEUROGÊNESE ADULTA EM CAMUNDONGOS**

ERIKA MEYER

Orientadora

Prof^a. Dr^a. Rúbia Maria Monteiro Weffort de Oliveira (UEM/DFT)

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas (Área de concentração - Produtos Naturais e Sintéticos Biologicamente Ativos), da Universidade Estadual de Maringá, como requisito para obtenção do Título de Mestre em Ciências Farmacêuticas.

Maringá

2016

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
(Biblioteca Central - UEM, Maringá, PR, Brasil)

M613e Meyer, Erika
Efeito tipo antidepressivo da miricitrina e sua
relação com a neurogênese adulta em camundongos /
Erika Meyer. - - Maringá, 2016.
84 f. : il. color., figs., grafs., tabs.

Orientadora: Prof^a Dr^a Rúbia Maria Monteiro
Weffort de Oliveira.

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual
de Maringá, Departamento de Farmacologia
Terapêutica, Programa de Pós-Graduação em Ciências
Farmacêuticas, 2016.

1. Depressão. 2. Miricitrina. 3. Neurogênese
Hipocampal. Cidadania ativa. I. Oliveira, Rúbia
Maria Monteiro Weffort de, orient. II. Universida-
de Estadual de Maringá. Departamento de Farmacolo-
gia Terapêutica. Programa de Pós-Graduação em
Ciências Farmacêuticas, 2015. III. Título.

CDD 21.ed 616.8527

MGC-001712

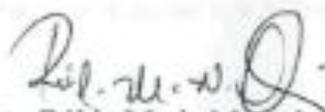
ERIKA MEYER

**EFEITO TIPO ANTIDEPRESSIVO DA MIRICITRINA E SUA RELAÇÃO
COM A NEUROGENESE ADULTA EM CAMUNDONGOS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade Estadual de Maringá como requisito para obtenção do título de Mestre em Ciências Farmacêuticas.

Aprovada em 29 de janeiro de 2016.

BANCA EXAMINADORA



Dra. Rúbia Maria Monteiro Weffort de Oliveira



Dra. Daniela Cristina Ceccatto Gerardin



Dra. Silvana Martins Caparroz Assef

DEDICATÓRIA

À minha família.

AGRADECIMENTOS

À minha família amada. Aos meus pais, Maria de Lourdes e Uwe Bruno, por todo o carinho, compreensão, ajuda e apoio ao longo de toda a minha vida. Aos meus irmãos, Klaus e Bruno, que me aguentaram todo esse tempo e com os quais posso voltar a ser criança. A minha vovó Cida, mulher forte e batalhadora, obrigada pelo colinho nos momentos em que precisei. O amor de vocês é meu porto seguro e força necessária para encarar qualquer obstáculo. Muito obrigada pelo amor incondicional.

À minha orientadora, Prof^ª. Dr^ª. Rubia M. M. W de Oliveira, primeiramente, por me aceitar em seu laboratório, sem ao menos me conhecer. Pela paciência e confiança em meu trabalho ao longo desses dois anos. Muito obrigada pelos ensinamentos e incentivos.

Às professoras, Dr^ª. Daniela Cristina Ceccatto Gerardin e Dr^ª. Silvana Martins Caparroz-Assef, membros da banca julgadora, por aceitarem avaliar este trabalho. Muito obrigada pela disponibilidade.

Aos professores, Dr^ª. Alline Cristina Campos e Prof. Dr. Francisco Silveira Guimarães, da Universidade de Medicina de Ribeirão Preto, por me permitirem trabalhar em seu laboratório, onde aprendi tanto e fui tão bem acolhida. Muito obrigada pela oportunidade.

Às minhas grandes amigas Vanessa, Luciana e Marina, que estão sempre torcendo por mim e prontas a me ouvir e ajudar nos momentos difíceis. Muito obrigada por estarem ao meu lado.

Ao amigo Marco Aurélio Mori, meu parceiro de trabalho, aulas, apresentações e especialização. Pelo ombro amigo, pelas discussões e pelas risadas. Muito obrigada pelo companheirismo.

Agradeço também as minhas amigas Emilene Fiuzza Dias e Lígia Mendes Soares, pelo afeto, conselhos e conversas. Muito obrigada pela amizade.

Aos meus amigos de laboratório Amanda, Cristiano, Jacqueline, Jéssica e Letícia que nunca me negaram ajuda e contribuíram para o meu crescimento pessoal e profissional. Muito obrigada pela ótima convivência.

Agradeço ainda ao trabalho e ao carinho da secretária do Programa de Ciências Farmacêuticas, Francisca Helena Mesquita de Carvalho, pela atenção e ajuda sempre. O seu trabalho é essencial para nós pós-graduandos. Muito obrigada pela dedicação.

Ao professor Dr. Humberto Milani, pela disposição e paciência em tirar minhas dúvidas. Muito obrigada por ser um exemplo.

A todos os familiares, amigos e colegas não citados que fizeram parte desta etapa da minha vida profissional. Muito obrigada pela contribuição.

Camundongos Swiss, camundongos Balb/C, a vocês todo o meu respeito e dignidade. A cooperação de vocês foi fundamental para a execução deste trabalho. Muito obrigada por existirem.

E por fim, porém não menos importante, a Deus, infinita luz que ilumina meu caminho e minhas escolhas. Muito obrigada por guiar os meus passos.

***“Seja qual for o teu sonho, comece...
Ousadia tem genialidade, poder e magia.”***

Julian Wolfgang Goethe

EFEITO TIPO-ANTIDEPRESSIVO DA MIRICITRINA E SUA RELAÇÃO COM A NEUROGÊNESE ADULTA EM CAMUNDONGOS.

Erika Meyer

Resumo: A depressão consiste em uma doença multifatorial, complexa e de sintomatologia diferenciada. Em casos de depressão refratária resistente ao tratamento, antipsicóticos atípicos vêm sendo associados, aos antidepressivos, na clínica, no intuito de melhorar a resposta dos pacientes ao tratamento. Um mecanismo de ação neurogênica vem sendo proposto para fármacos com atividade antidepressiva. A miricitrina (MIRI) é um flavonóide extraído de várias plantas do gênero Eugênia, com perfil de antipsicótico atípico. Os mecanismos de ação propostos para a MIRI incluem inibição da síntese de óxido nítrico (NO) e da proteína quinase C (PKC). Considerando que a inibição do NO pode também gerar efeito antidepressivo, e que antipsicóticos atípicos podem ser utilizados por sua ação antidepressiva, o presente estudo teve como objetivo avaliar o efeito do tratamento repetido com a MIRI em um modelo animal preditivo de atividade antidepressiva e analisar a influência deste sobre a neurogênese adulta. Camundongos Balb/C machos foram tratados, intraperitonealmente, com MIRI durante 21 dias. Após o término do tratamento repetido os animais foram submetidos ao teste do campo aberto e, em seguida, ao teste de suspensão pela cauda (TSC). Um segundo grupo de animais foi tratado com MIRI durante 28 dias e submetidos aos mesmos testes comportamentais. A seguir os cérebros dos animais foram removidos para análise imuno-histoquímica de detecção de imunoreatividade para os marcadores celulares de proliferação (Ki67), neurogênese (DCX), sobrevivência (BrdU) e diferenciação celular (NeuN e GFAP). A administração repetida de 21 dias de MIRI foi capaz de diminuir a imobilidade dos animais no TSC, sem, entretanto, alterar a atividade locomotora. Além disso, a MIRI aumentou a proliferação celular e o número de células DCX-positivas na zona subgranular do giro denteado hipocampal, o que indica um aumento de neurogênese hipocampal. Foi observada, ainda, uma maior diferenciação das células sobreviventes em neurônios. Nossos dados demonstraram que o tratamento repetido com a MIRI resultou em ação tipo-antidepressiva, mediada, pelo menos em parte, pela geração de novos neurônios no hipocampo de camundongos.

Palavras-chave: miricitrina, depressão, neurogênese hipocampal, teste de suspensão pela cauda.

ANTIDEPRESSANT-LIKE EFFECTS OF MYRICITRIN AND ITS RELATION TO ADULT NEUROGENESIS IN MICE.

Erika Meyer

Abstract: Depression consists of a multifactorial and complex disease, with differentiated symptoms. In cases of refractory depression resistant to treatment, atypical antipsychotics have been associated with antidepressants, in order to improve the response of patients to treatment. A neurogenic mechanism has been proposed for drugs with antidepressant activity. Myricitrin (MIRI) is a flavonoid extracted from various plants of *Eugenia* genus and presents an atypical antipsychotic profile. The mechanisms proposed for this therapeutic effects include inhibition of nitric oxide (NO) and protein kinase C (PKC) synthesis. Since the inhibition of NO can also produce antidepressant effect, and the atypical antipsychotics may be used as an antidepressant drug, this study aimed to evaluate the effect of repeated treatment with MIRI in an animal model of predictive antidepressant activity and the influence of this on adult neurogenesis. For this, Balb/C male were treated, intraperitoneally, with MIRI during 21 and/or 28 days respectively. After the repeated treatment the animals were subjected to the open field test and the tail suspension test (TST). At the end of the behavioral tests the animals were sacrificed and their brains were removed for immunohistochemical analysis to detect immunoreactivity of cell markers of proliferation (Ki67), neurogenesis (DCX), survival (BrdU) and differentiation (NeuN and GFAP). The repeated treatment of 21 days was able to decrease the immobility time of the animals in the TST without alteration of locomotor activity. MIRI treatment increased the cell proliferation and the number of doublecortin-positive cells in the subgranular zone of the dentate gyrus in the hippocampus, which indicates an increase in hippocampal neurogenesis. Furthermore, the most of the survival cells were differentiated in neurons. Our data demonstrated that repeated treatment with MIRI resulted in antidepressant-like effect, mediated at least in part, by the generation of new neurons in the hippocampus of mice.

Keywords: myricitrin, depression, hippocampal neurogenesis, tail suspension test.

LISTA DE FIGURAS, ESQUEMAS E TABELAS

Figura 1 - Ilustração dos nichos neurogênicos em secções sagital e coronal do cérebro adulto de roedores	21
Figura 2 - Neurogênese na Zona Subventricular.....	23
Figura 3 - Neurogênese na Zona Subgranular	25
Figura 4 - Estrutura química do antioxidante polifenólico Miricitrina.....	33
Figura 5 - Efeitos do Óxido Nítrico na transmissão dopaminérgica	33
Figura 6 - Esquema representativo da imobilidade e mobilidade no teste de suspensão pela cauda	35
Figura 7 - Foto representativa do aparato utilizado para o teste do campo aberto...40	
Figura 8 - Foto representativa do modelo experimental do teste de suspensão pela cauda	41
Figura 9 - Tratamento agudo com IMIP ou MIRI não alterou a atividade locomotora de camundongos submetidos ao campo aberto.....	47
Figura 10 - Tratamento agudo com IMIP aumentou o tempo de latência e diminuiu o tempo de imobilidade de camundongos submetidos ao TSC.....	49
Figura 11 - Tratamento repetido de 21 dias com IMIP ou MIRI 10 não alterou a atividade locomotora de camundongos submetidos ao CA.....	51
Figura 12 - Tratamento repetido de 21 dias com IMIP ou MIRI 10 diminuiu o tempo de imobilidade de camundongos submetidos ao teste de suspensão pela cauda	53
Figura 13 - Tratamento repetido de 28 dias com IMIP ou MIRI 10 não alterou a atividade locomotora de camundongos submetidos ao campo aberto.....	55
Figura 14 - Tratamento repetido de 28 dias com IMIP ou MIRI 10 não alterou os tempos de latência e imobilidade de camundongos submetidos ao teste de suspensão pela cauda	57
Figura 15 - Tratamento repetido de 21 dias com IMIP ou MIRI 10 aumentou a proliferação celular na ZSV de camundongos.....	59
Figura 16 - Fotomicrografias representativas de células Ki67-positivas.....	59

Figura 17 - Tratamento repetido de 21 dias com IMIP ou MIRI 10 aumentou o número de neurônios DCX-positivos na ZSG hipocampal de camundongos.....	61
Figura 18 - Fotomicrografias representativas de células DCX-positivas.	61
Figura 19 - Tratamento repetido de 28 dias com IMIP ou MIRI 10 não aumentou a taxa de sobrevivência celular na ZSG hipocampal de camundongos	63
Figura 20 - Fotomicrografias representativas de células BrdU-positivas no aumento de 20x	63
Figura 21 - Fotomicrografias representativas de células BrdU-positivas no aumento de 40x	63
Figura 22 - Tratamento repetido de 28 dias com IMIP ou MIRI 10 aumentou a geração de novos neurônios na ZSG hipocampal de camundongos	65
Figura 23 - Fotomicrografias representativas de células BrdU, GFAP e NeuN-positivas.	66
Tabela 1 - Marcadores imunohistoquímicos e suas respectivas funções.	28
Esquema 1 - Delineamento experimental de 21 dias de tratamento	38
Esquema 2 - Delineamento experimental de 28 dias de tratamento	39

LISTA DE ABREVIATURAS

ABC - Complexo avidina-biotina
ADs - Antidepressivos
BHE - Barreira hematoencefálica
BO - Bulbo olfatório
BrdU - 5-bromo-2'-deoxiuridina
BSA - Soro albumina bovino
CA - Campo aberto
Ca⁺² - Cálcio
CCG - Camada celular granular
CM - Camada molecular
DAB - 3,3',5'-trihidrocloro de diaminobenzidina
DCX - *Doublecortin*
DSM-V - *Diagnostic and statistical manual of mental disorders-5^a ed.*
EGFR - *Epidermal growth factor receptor*
eNOS - Óxido nítrico sintase endotelial
EPM - Erro padrão da média
FMR - Fluxo migratório rostral
GD - Giro denteado
GFAP - *Glial fibrillary acidic protein*
IMIP - Imipramina
iNOS - Óxido nítrico sintase induzível
i.p. - Intraperitonealmente
ISRS - Inibidores seletivos da recaptação de serotonina
L-Arg - L-Arginina
LDL - Lipoproteína de baixa densidade
MIRI - Miricitrina
MIRI 3 - Miricitrina 3 mg/kg
MIRI 10 - Miricitrina 10 mg/kg
MIRI 30 - Miricitrina 30 mg/kg
NeuN - *Neuronal specific nuclear protein*
NMDA - N - metil - d - aspartato
nNOS - Óxido nítrico sintase neuronal
NO - Óxido nítrico
NOSs - Óxido nítrico sintases
PB - Tampão fosfato
PBS - Tampão fosfato salina
PFA - Paraformaldeído
PKC - Proteína quinase C
SNC - Sistema nervoso central
TBS - Tris (hidroximetil) aminometano
TSC - Teste de suspensão pela cauda
ZSG - Zona subgranular
ZSV - Zona subventricula

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	16
1.1. Depressão	16
1.2. Neurogênese adulta	20
1.2.1. Etapas da neurogênese nos nichos neurogênicos	22
1.2.1.1. Neurogênese na ZSV	22
1.2.1.2. Neurogênese na ZSG	24
1.2.2. Marcadores moleculares de proliferação e neurogênese	26
1.2.2.1. 5-bromo-2'-deoxyuridine	26
1.2.2.2. Ki67	27
1.2.2.3. Doublecortin	27
1.2.2.4. <i>Glial Fibrillary Acidic Protein</i>	27
1.2.2.5. <i>Neuronal Specific Nuclear Protein</i>	28
1.2.3. Fatores que regulam a neurogênese no cérebro adulto	29
1.3. Miricitrina	30
1.4. Modelos animais no estudo da depressão	34
2. OBJETIVOS	36
2.1. Geral	36
2.2. Específicos	36
3. METODOLOGIA	37
3.1. Animais	37
3.2. Procedimento experimental	37
3.2.1. Experimento I - tratamento agudo	37
3.2.2. Experimento II - tratamento repetido de 21 dias: proliferação celular e neurogênese	38
3.2.3. Experimento III - tratamento repetido de 28 dias: sobrevivência e diferenciação celular	39
3.3. Avaliação comportamental	39
3.3.1. Campo aberto	39

3.3.2. Teste de suspensão pela cauda	40
3.4. Preparo do tecido para análise imuno-histoquímica	41
3.4.1. Imuno-histoquímica para Ki-67 e DCX.....	42
3.4.2. Imuno-histoquímica para BrDU.....	43
3.4.3. Imunofluorescência para BrDU, GFAP e NeuN	43
3.5. Análise quantitativa	44
3.5.1. Células Ki-67 e DCX-positivas na ZSG do GD e na ZSV	44
3.5.2. Células BrdU, NeuN e GFAP-positivas na ZSG do GD	44
3.6. Análise estatística	45
4. RESULTADOS.....	46
4.1. Experimento I - tratamento agudo.....	46
4.1.1. Campo aberto	46
4.1.2. Teste de Suspensão pela cauda.....	48
4.2. Experimento II – tratamento repetido de 21 dias.....	50
4.2.1. Campo aberto	50
4.2.2. Teste de Suspensão pela cauda.....	52
4.3. Experimento III – tratamento repetido de 28 dias.....	54
4.3.1. Campo aberto	54
4.3.2. Teste de Suspensão pela cauda.....	56
4.4. Avaliação da proliferação celular na ZSG hipocampal e ZSV	58
4.5. Avaliação da neurogênese na ZSG hipocampal e ZSV	60
4.6. Avaliação da sobrevivência celular na ZSG	62
4.7. Avaliação da diferenciação celular na ZSG	64
5. DISCUSSÃO	67
6. CONCLUSÃO	72
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	73

1. Introdução

1.1. Depressão

A depressão consiste em uma doença psiquiátrica multifatorial e altamente complexa, que possui uma das mais altas prevalências na população entre os transtornos do humor. De acordo com a Pesquisa Nacional sobre Uso de Drogas e Saúde, nos Estados Unidos, de 2009 a 2012, cerca de 7 por cento da população apresentava os critérios para um transtorno depressivo, sendo que as taxas mais elevadas (10,9%) encontravam-se entre as mulheres em idade reprodutiva (7,7% entre as mulheres grávidas e 11,1 % entre as mulheres não grávidas) (O'Connor et al., 2016). Estima-se, ainda, que as formas mais severas da depressão afetam de 2 a 5% da população americana (Nestler et al., 2002). No Brasil, um recente estudo de metanálise, mostrou que um em cada sete indivíduos apresenta sintomas depressivos (Silva et al., 2014). Nesse sentido, a depressão têm se mostrado como um grande problema da saúde pública mundial, pois além da sua alta incidência na população, consiste em uma doença debilitante, que gera grande prejuízo físico e social ao indivíduo, causando alterações afetivas, cognitivas e no metabolismo (Wong et al., 2001; Krishnan et al., 2008).

Os sintomas da depressão são extremamente diversificados, como por exemplo, perda ou aumento de apetite (causando alterações no peso), alterações na psicomotricidade (agitação ou lentidão nos movimentos), insônia ou hipersonia, fadiga ou perda de energia, dificuldade de concentração ou indecisão, sentimentos de inutilidade e pensamentos suicidas (DSM-V, 2014).

De acordo com o DSM-V (*Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders*), existe uma vasta gama de subtipos da depressão e alguns deles consistem em: depressão maior, transtorno de humor induzido por substância, transtorno de humor devido à condição médica geral, depressão sazonal, perturbação ou desregulação de humor, transtorno disfórico pré-menstrual e depressão associada a outras condições. Destaca-se a depressão maior, como um transtorno debilitante e recorrente, que possui um elevado risco de vida e um grande custo social na sociedade (Millan et al., 2006). Existe ainda, um número significativo de pacientes em terapia que apresenta depressão refratária resistente ao tratamento

(O'Reardon et al., 2000), que pode ser definida como uma resposta clínica insuficiente, entre os pacientes que sofrem de depressão maior, apesar de tratamento adequado com antidepressivos (ADs) (em termos de dose, duração e adesão do paciente ao tratamento) (Berman et al., 1997; Fava, 2003; Rush et al., 2003).

O tratamento da depressão com fármacos antidepressivos é geralmente eficaz, mas apesar da grande variedade destes medicamentos disponíveis na clínica, somente cerca de 70% dos pacientes são responsivos ao tratamento e, em diversos casos, a remissão dos sintomas é somente parcial (Nestler et al., 2006). Além disso, muitos pacientes não aderem totalmente ao tratamento, pois os sintomas positivos desses medicamentos (efeitos antidepressivos) muitas vezes demoram a aparecer, podendo levar de quatro a oito semanas até que o efeito terapêutico realmente se instale (Taylor et al., 2006). Infelizmente, os efeitos colaterais dos ADs se manifestam previamente ao efeito terapêutico. Hipersonia, ganho ou perda de peso e náuseas são frequentes e fazem com que muitos pacientes abandonem precocemente o tratamento (Machado et al., 2009).

Devido à complexidade do transtorno depressivo, muitas teorias surgiram na tentativa de melhor compreender a neurobiologia dessa doença. A mais antiga das hipóteses propostas, e que levou ao desenvolvimento da maioria dos medicamentos antidepressivos disponíveis, baseia-se na teoria monoaminérgica. Essa teoria propõe que a base neurobiológica da depressão consiste em uma deficiência das monoaminas no sistema nervoso central (SNC) (Hirschfeld, 2000). A redução de monoaminas no transtorno depressivo, mais especificamente noradrenalina e serotonina, é bem documentada, porém indícios de diminuição de dopamina também são frequentemente relatados em pacientes depressivos (Bonhomme & Esposito, 1998; Anand & Charney, 2000).

Vale ressaltar que as monoaminas possuem correlação com outro neurotransmissor, que atualmente tem sido abordado na patogênese da depressão, o óxido nítrico (NO) (Guix et al., 2005). O NO é um gás solúvel que se difunde livremente pelas membranas plasmáticas e diferentemente de outros neurotransmissores não é armazenado em vesículas (Yun et al., 1997), sendo sintetizado, quando requerido, por enzimas denominadas de óxido nítrico sintases

(NOSs) (Bredt & Snyder, 1990). Até o momento, foram isoladas e clonadas três isoenzimas das NOSs, sendo duas constitutivas e uma induzível. Essas enzimas são classificadas de acordo com o tipo de tecido ou célula na qual foram primeiramente descritas: NOS neuronal (nNOS) e endotelial (eNOS), denominadas também de isoformas constitutivas e dependentes de Cálcio (Ca^{+2}) e, NOS induzível (iNOS), que independe do cálcio (Ca^{+2}) (Moncada et al., 1991; Martela, 1994).

No SNC o NO é sintetizado a partir do aminoácido L - arginina (L- Arg) pela ativação da nNOS em resposta ao influxo de Ca^{+2} através dos receptores glutamatérgicos N - metil - d - aspartato (NMDA) (Garthwaite et al., 1988; Bredt, 2003). Por ser um radical livre, o NO pode reagir com radicais superóxido e formar uma espécie muito reativa, o peroxinitrito, causando estresse oxidativo, caso não seja devidamente eliminado por mecanismos de defesa antioxidantes (Steinert et al., 2010; Ceylan et al., 2011). Quanto à sua importância no SNC, o NO pode agir tanto como neurotransmissor ou como mensageiro secundário, envolvendo-se em numerosas funções fisiológicas, como regulação do sistema cerebrovascular, plasticidade sináptica, aprendizado, percepção da dor, entre outras. Assim sendo, pode-se dizer que o NO possui uma baixa especificidade em suas reações (Esplugues, 2002; Ceylan et al., 2011).

Diversos estudos *in vitro* demonstram que o NO modula os níveis extracelulares de vários neurotransmissores no SNC, como serotonina, dopamina, ácido γ -aminobutírico e glutamato (Lorrain & Hull, 1993; Segovia et al., 1994; Strasser et al., 1994; Kaehler et al., 1999). Foi demonstrado, ainda, que drogas que promovem ação inibitória sobre a síntese do NO geram um efeito tipo antidepressivo em roedores, demonstrando, que um aumento do NO no SNC pode estar relacionado com a neurobiologia da depressão (Harkin et al., 1999; Spiacci et al., 2008).

Caso o desequilíbrio nos níveis de neurotransmissores fosse a única alteração neurobiológica na depressão, a responsividade dos pacientes aos ADs (que em sua grande maioria tem por função o aumento da disponibilidade de monoaminas) seria total, mas isso não ocorre (Ruhé et al., 2007). Nesse sentido, acredita-se que eficácia dos ADs não esteja relacionada somente ao aumento dos níveis de monoaminas nas sinapses, mas sim, à estimulação de cascatas

intracelulares decorrentes deste aumento (Pittenger et al., 2008). Além disso, a latência para a obtenção do efeito terapêutico com o uso de fármacos ADs, sugere que alterações estruturais e neuroquímicas de desenvolvimento mais lento possam ocorrer em áreas límbicas que recebem projeções monoaminérgicas (Santarelli et al., 2003).

Nesse contexto, a teoria neurogênica da depressão, proposta oficialmente no ano de 2000, postula que a neurogênese hipocampal adulta prejudicada pode desencadear o processo da depressão, e que a restauração desse processo, pode levar à recuperação dos indivíduos (Jacobs et al., 2000; Malberg, 2004). Desde então, um mecanismo de ação neurogênico vem sendo estudado e proposto para os fármacos com atividade antidepressiva, principalmente pelo fato de que a latência para o aparecimento dos efeitos clínicos desses medicamentos (2-4 semanas) coincidem com o pico da neurogênese, ou seja, condizem com o período mínimo necessário para a maturação de novos neurônios no giro denteado (GD) do hipocampo (Ngwenya et al., 2006).

Evidências experimentais mostraram que tratamento crônico e subcrônico com ADs de diferentes classes, como a fluoxetina e a imipramina, aumentam a neurogênese hipocampal adulta (Malberg et al., 2000). De acordo com esses achados, usando métodos radiológicos e genéticos, foi demonstrado que a aplicação de radiação X, impede a neurogênese hipocampal e, conseqüentemente, o aparecimento dos efeitos comportamentais relacionados aos ADs em roedores (Santarelli et al., 2003).

Na tentativa de melhorar a resposta dos indivíduos aos ADs, várias estratégias farmacológicas vêm sendo empregadas. Uma delas consiste na potencialização, na qual se associa uma medicação não antidepressiva para intensificar o efeito do medicamento antidepressivo. As crescentes evidências na literatura sobre a eficácia dos antipsicóticos atípicos, como a clozapina ou a olanzapina, fazem com que essa classe seja cada vez mais considerada no tratamento da depressão refratária (Barbee et al., 2004). O uso dos antipsicóticos atípicos, em baixas doses, aumenta de forma significativa a resposta aos ADs nas depressões resistentes, e não somente nos casos de depressões bipolares ou naquelas com características psicóticas (Papakostas et al., 2007).

1.2. Neurogênese adulta

Antigamente acreditava-se que o cérebro humano não seria capaz de gerar novos neurônios após o período embrionário. Após décadas de pesquisa, sabe-se hoje, que as células do cérebro de mamíferos adultos são capazes de se dividir, diferenciar e integrar funcionalmente ao circuito neuronal (Kempermann & Gage, 2000).

As primeiras evidências de que novas células poderiam ser geradas em um cérebro adulto foram fornecidas por Joseph Altman & Gopal em 1965 (Altman & Gopal, 1965 *apud* von Bohlen & Halbach, 2007). Cerca de 30 anos mais tarde, com o avanço no desenvolvimento de marcadores celulares, cientistas conseguiram demonstrar que no hipocampo adulto de roedores, células progenitoras possuíam a capacidade de se proliferar, e que esse processo poderia ser alterado por condições fisiológicas e patofisiológicas (Kuhn et al., 1996; Kempermann et al., 1997). Em 1998 Eriksson e colaboradores (1998) conseguiram demonstrar, em tecido *post mortem*, que a geração de novos neurônios também acontece no cérebro humano adulto, sendo que esse processo também foi evidenciado em macacos (Gould et al., 1999a, 1999b, 2001).

Dessa forma, a neurogênese adulta é definida como o processo pelo qual as células progenitoras neuronais dividem-se, mitoticamente, para dar origem à novos neurônios no cérebro adulto. Esse processo envolve diversas fases que incluem a divisão celular, a diferenciação em um fenótipo neuronal, a migração, a maturação e a integração dessas células no circuito neuronal pré-existente. Em roedores a neurogênese ocorre em áreas conhecidas como nichos neurogênicos, que compreendem a zona subgranular (ZSG) do GD do hipocampo e a zona subventricular (ZSV) das paredes dos ventrículos laterais (Zhao et al., 2008).

A ZSV consiste em uma camada de células em divisão que se estende por todas as paredes da porção dorso-ventral do ventrículo lateral. Células progenitoras da ZSV dão origem a neuroblastos, que migram até o bulbo olfatório (BO), ao longo do fluxo migratório rostral (FMR) (Figura 1a). No BO, essas células maturam em neurônios locais, e são funcionalmente integrados ao circuito neuronal (Alvarez-Buylla & García-Verdugo, 2002).

No hipocampo de mamíferos adultos, a neurogênese ocorre em uma área relativamente limitada, que compreende a ZSG do GD (Figura 1b). Células imaturas

se proliferam e migram para a camada celular granular (CCG), onde se diferenciam em neurônios granulares. Estes neurônios recém-formados expandem seus axônios até a camada de células piramidais da região CA3 do hipocampo, tornando-se, dessa forma, funcionalmente integrados aos circuitos hipocâmpais (Von Bohlen & Halbach, 2007).

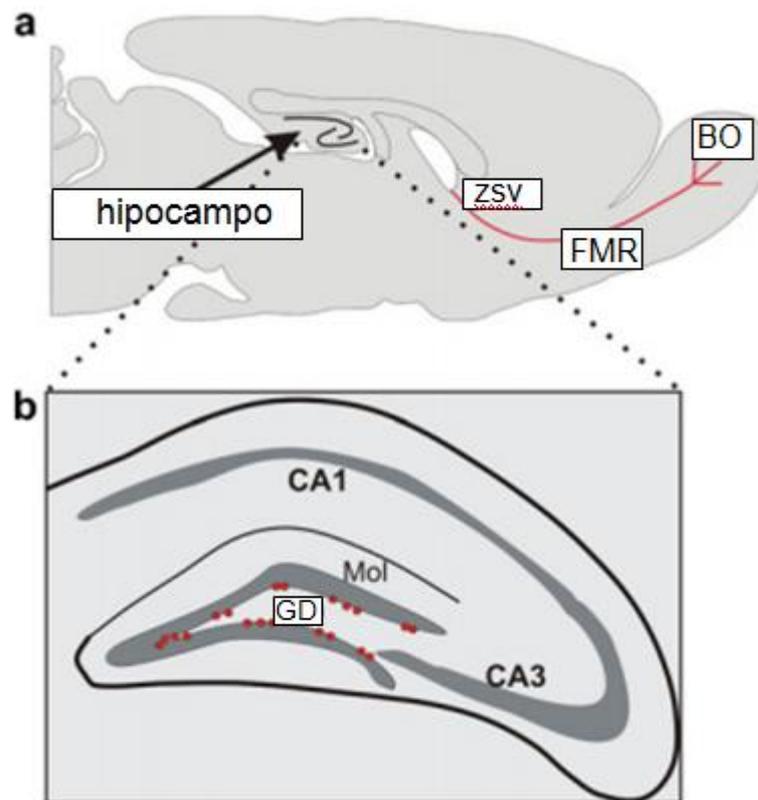


Figura 1: Ilustração dos nichos neurogênicos em seções sagital (a) e coronal (b) do cérebro adulto de roedores. Células progenitoras da zona subventricular (ZSV) tornam-se neuroblastos e migram (em vermelho), através do fluxo migratório rostral (FMR), em direção ao bulbo olfatório (BO). Uma vez no BO os neurônios recém-formados integram-se ao circuito neuronal pré-existente (a). No hipocampo as células progenitoras (em vermelho) localizadas na zona subgranular do giro denteado (GD) proliferam-se e migram para a camada celular granular do GD, onde sofrem diferenciação. Posteriormente, esses neurônios estendem seus dendritos para a camada molecular (Mol) do GD, em direção às regiões CA1 e CA3 do hipocampo (b). (Fonte: von Bohlen & Halbach, 2011 - modificado).

1.2.1. Etapas da neurogênese nos nichos neurogênicos

Ambos nichos neurogênicos no cérebro de mamíferos são caracterizados pela presença de populações de células-tronco que podem se diferenciar em distintas linhagens neuronais (Gage, 2000).

O complexo processo da neurogênese pode ser dividido em 4 fases quando se considera a origem na ZSV ou em 5 fases, quando se considera a origem na ZSG do GD. Essas fases consistem em: proliferação, diferenciação, migração, segmentação de axônios e dendritos (ocorre somente na ZSG) e integração sináptica. Dependendo da fase em que se encontram, as células no processo de neurogênese expressam diferentes marcadores, o que permite seu rastreamento, através da utilização de técnicas laboratoriais específicas (Ming et al., 2005).

1.2.1.1. Neurogênese na ZSV

Na ZSV as células progenitoras delimitam os ventrículos laterais, encontrando-se adjacentes à uma população de células ependimais (Figura 2). Essas células progenitoras em repouso, conhecidas como células do tipo B, se proliferam lentamente e podem ser detectadas através da expressão de *Nestin* (filamento neural específico), *Sox2* (fator de transcrição), *Glial Fibrillary Acidic Protein* (GFAP) ou *Epidermal Growth Factor Receptor* (EGFR) (Reynolds & Weiss, 1992; Doetsch et al., 1999; Boockvar et al., 2003; Garcia et al., 2004; Mirzadeh et al., 2008; Favaro et al., 2009). Após ativação, as células do Tipo B dão origem à células progenitoras proliferantes do Tipo C que continuam expressando *Nestin* e *Sox2*. Essas por sua vez, se dividem rapidamente, dando origem à neuroblastos ou células do Tipo A que expressam o fator de transcrição *Ascl 1* (Vasconcelos & Castro, 2014). Esses neuroblastos, comprometidos com fenótipo neuronal expressam a fosfoproteína *doublecortin* (DCX) e o fator de transcrição *Dlx2*, e migram, através do FMR, até o BO. Neste local, esses neurônios, ainda imaturos, podem se diferenciar em interneurônios gabaérgicos olfatórios, interneurônios dopaminérgicos olfatórios ou neurônios glutamatérgicos olfatórios, os quais se integram ao circuito neuronal local (Gleeson et al., 1999; Carleton et al., 2003; Brill et al., 2009; de Chevigny et al., 2012).

Em roedores, o processo da neurogênese gera milhares de neuroblastos diariamente, entretanto, somente uma pequena parte desses neurônios imaturos sobrevive e consegue se integrar funcionalmente no circuito do BO (Carleton et al., 2003). Já em humanos, esse processo não é bem estabelecido. Estudos recentes mostraram uma queda acentuada na neurogênese na ZSV após a infância (Bergmann et al., 2012), entretanto, outros estudos sugerem que a neurogênese no sistema ZSV-BO ocorra durante toda a vida (Curtis et al., 2007).

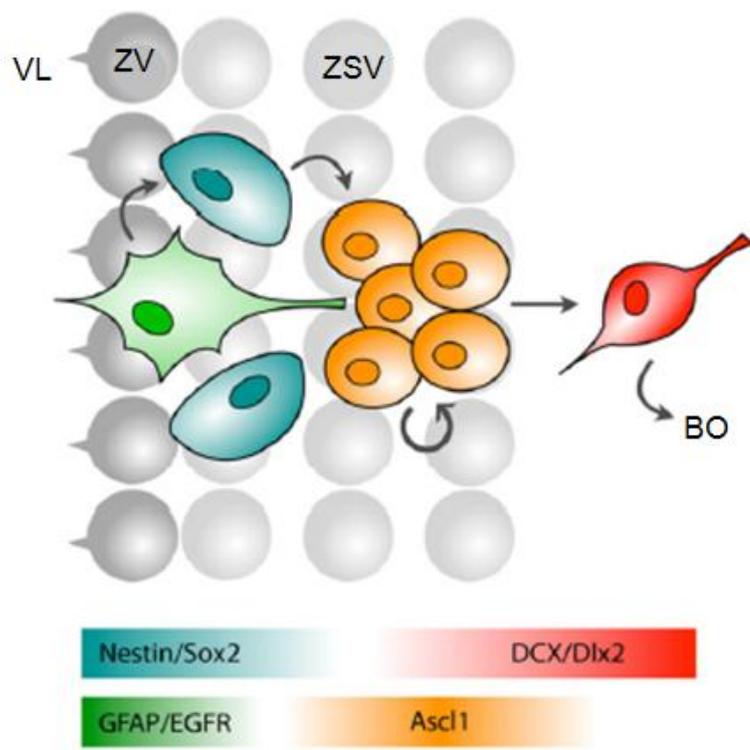


Figura 2: Neurogênese na Zona Subventricular (ZSV). Células progenitoras do tipo B (em verde) limitam os ventrículos laterais (VL) na zona ventricular (ZV). Essas células progenitoras em repouso podem dar origem à células progenitoras do Tipo C (em azul). Estas, por sua vez, podem originar neuroblastos proliferantes ou células do Tipo A (em laranja). Essas células comprometidas neuralmente migram para o Bulbo Olfatório (BO), onde se diferenciam em interneurônios (Fonte: Braun et al., 2014 - modificado).

1.2.1.2. Neurogênese na ZSG

No hipocampo as células progenitoras residem na ZSG e, através de um complexo processo que envolve diversas etapas, dão origem à neurônios granulares (Figura 3).

No início desse processo, células progenitoras em repouso, ou células do Tipo 1, estendem suas ramificações radiais através da CCG em direção à camada molecular (CM) e expressam *Nestin*, *Sox2*, *Spot14* (proteína) e GFAP (Bonaguidi et al., 2011; Encinas et al., 2011; Knobloch et al., 2014). Essa população de células, após ativação, é capaz de gerar células progenitoras não-radiais, ou células do Tipo 2, que continuam expressando *Nestin*, *Sox2* e *Spot14*. Essas, por sua vez, dão origem à neuroblastos, que consistem em neurônios ainda imaturos que expressam *DCX* e migram para dentro da CCG. Após um período médio de 3 semanas, esses neurônios granulares gerados expressam o fator de transcrição *Prox1* e a *Neuronal Specific Nuclear Protein* (*NeuN*), e projetam seus dendritos para a CM e seu axônio em células-alvo no hilus e na região CA3 do hipocampo (Mullen et al., 1992; Zhao et al., 2006; Toni et al., 2007, 2008; Karalay et al., 2011).

Em humanos, esse nicho neurogênico permanece ativo durante toda a vida, produzindo milhares de novos neurônios todos os dias (Knoth et al., 2010; Spalding et al., 2013).

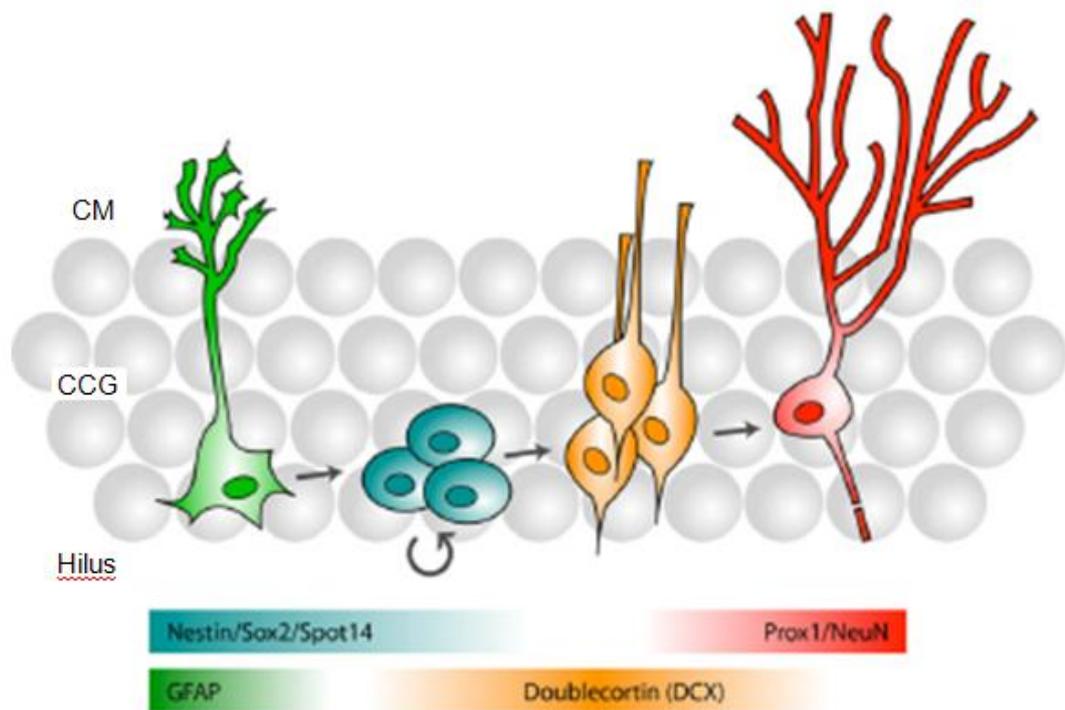


Figura 3: Neurogênese na Zona Subgranular (ZSG). Células progenitoras radiais do Tipo 1 (em verde) residem na camada celular granular (CCG) do giro denteado. Após ativação, essas células originam as células progenitoras proliferativas, que recebem o nome de células progenitoras não-radiais do Tipo 2 (azul). Estas células se diferenciam, por sua vez, em neurônios imaturos (laranja). Esses novos neurônios migram em direção à camada molecular (CM), e após um período de algumas semanas maturam em células neuronais granulares (em vermelho) (Fonte: Braun et al., 2014 - modificado).

No cérebro adulto a neurogênese hipocampal atrai atenção, pois está envolvida nos processos de memória, nas funções cognitivas e em comportamentos afetivos, possuindo um papel importante na plasticidade hipocampal durante toda a vida (Kempermann et al., 2015).

1.2.2. Marcadores moleculares de proliferação e neurogênese

1.2.2.1. 5-bromo-2'-deoxyuridine

O 5-bromo-2'-deoxyuridine (BrdU), corresponde a um dos reagentes mais frequentemente usados em ensaios para detecção de proliferação e sobrevivência celular (Tabela 1).

A descoberta do BrdU constituiu um avanço na identificação de células na fase de síntese (fase S) da divisão celular (Nowakowski et al., 1989).

Essa molécula consiste em um derivado da base uridina que possui uma estrutura análoga à da timidina, o que lhe confere a capacidade de ser incorporada no DNA como um substituto da timidina. Dessa forma, é possível que seja estimado o número de células em divisão, mesmo em secções muito finas, através de técnicas de imunohistoquímica (Scharfman et al., 2005).

O BrdU é, normalmente, injetado intraperitonealmente em animais experimentais, e após cruzar a barreira hematoencefálica (BHE) é incorporado pelo DNA de células em divisão durante a fase S do ciclo celular. Assim, poucas horas após administração sistêmica de BrdU é possível visualizar a proliferação celular. Além disso, se a detecção do BrdU é realizada dias ou semanas mais tarde, é possível visualizar a sobrevivência das células marcadas (Kee et al., 2002).

O número de células marcadas dentro do cérebro varia conforme se altera o modo de administração, duração e concentração do BrdU (Dayer et al., 2003). Por exemplo, altas concentrações de BrdU (aproximadamente 300 mg/Kg) parecem ser necessárias para marcar todas as células em fase S de mitose no GD hipocampal de roedores (Cameron et al., 2001).

Uma célula imunorreativa para BrdU pode ser uma progenitora de novos neurônios, mas pode também dar origem à linhagem glial. A marcação com BrdU, sem o uso de marcadores adicionais, é um indicador geral para gênese de células no cérebro, sendo que o aumento no número de células marcadas com BrdU não indica, por si só, geração de novos neurônios. Para determinar se a marcação para BrdU está relacionada à neurogênese, é necessário combiná-lo a um marcador imunohistoquímico específico, como o DCX, para corar novos neurônios formados nas fases de desenvolvimento da neurogênese (von Bohlen et al., 2007).

1.2.2.2. Ki67

O Ki67, uma proteína nuclear, é expresso em todas as fases do ciclo celular, exceto nas fases de repouso. Além disso, diferentemente do BrdU, esse marcador não é detectável durante as fases de reparo de DNA (Zacchetti et al. 2003).

Uma vantagem da utilização do ki67 como marcador de proliferação celular, consiste no fato de que ele é expresso intrinsecamente, podendo ser evitado, dessa forma, os efeitos colaterais que podem acompanhar a utilização do BrdU, como, por exemplo, o estresse durante a aplicação e a toxicidade (Kee et al., 2002).

1.2.2.3. Doublecortin

A DCX é uma fosfoproteína que promove polimerização dos microtúbulos e está presente em neurônios jovens e neuroblastos migrantes, podendo servir como um marcador de neurogênese nos nichos neurogênicos de animais adultos (Gleeson et al., 1999; Francis et al., 1999).

A expressão de DCX é tida como específica para neurônios recém-gerados, uma vez que, praticamente todas as células DCX-positivas expressam antígenos neuronais recentes, mas não apresentam antígenos específicos para glia, células indiferenciadas ou células em apoptose (Rao et al., 2004).

A DCX representa um bom marcador para neurogênese no cérebro adulto, já que neurônios hipocâmpais, estriatais e olfatórios recém-formados expressam esse marcador (Dayer et al., 2005).

1.2.2.4. Glial Fibrillary Acidic Protein

O GFAP consiste em uma proteína expressa por astrócitos maduros no cérebro adulto. Entretanto, diversas células recém-formadas na ZSG hipocâmpal também podem expressar o GFAP (Eckenhoff & Rakic, 1988; Maslov et al., 2004). Diversos estudos mostraram que as células progenitoras que expressam GFAP constituem a principal fonte de neurogênese no cérebro adulto (Garcia et al., 2004; Namba et al., 2005).

Esse marcador, em conjunto com o BrdU, é comumente utilizado em análise de diferenciação celular, já que a gênese celular no cérebro adulto pode dar origem às linhagens neuronal ou glial (Eckenhoff & Rakic, 1988; Maslov et al., 2004).

1.2.2.5. Neuronal Specific Nuclear Protein

O NeuN consiste em uma proteína nuclear solúvel (Mullen et al., 1992), que está localizada no núcleo da célula e no citoplasma de neurônios pós-mitóticos. No cérebro adulto o NeuN pode ser utilizado como marcador de neurônios pós-mitóticos, ou seja, pode ser utilizado na análise de diferenciação celular para identificação de neurônios maduros (Lind et al., 2005).

O NeuN é expresso na maior parte das células neuronais no SNC, com exceção de algumas células, como por exemplo, células de Purkinje no cerebelo e células localizadas na camada glomerular do BO (Mullen et al., 1992; Winner et al., 2002). Células não-neuronais não se coram com esse marcador, o que caracteriza o NeuN como um marcador específico de neurônios maduros (Wolf et al., 1996).

Tabela 1: Marcadores imunohistoquímicos e suas respectivas funções.

Marcadores	Descrição	Células que expressam	Função
BrdU	5-bromo-2'-deoxiuridina	todas as células que o incorporam na fase S da mitose	Após incorporado, permanece retido na célula por toda sua vida. Característica que permite traçar a linhagem da célula e seu tempo de sobrevivência.
DCX	<i>doublecortin</i>	neuroblastos migrantes e neurônios jovens	Expressa de forma transitória, com pico de expressão em torno de duas semanas. Depois é gradualmente substituída por marcadores de neurônios maduros.
GFAP	<i>glial fibrillary acidic protein</i>	astrócitos	Proteína ácida fibrilar glial, expressa por astrócitos no cérebro.
Ki-67	proteína nuclear	todas as células em divisão mitótica	Proteína nuclear expressa por todas as células em divisão durante o processo de mitose. Pode ser utilizada para confirmar a indução de proliferação celular.
NeuN	<i>neuronal specific nuclear protein</i>	neurônios maduros ou pós-mitóticos	Proteína expressa por neurônios maduros, que estabelecem seus contatos sinápticos no cérebro.

1.2.3. Fatores que regulam a neurogênese no cérebro adulto

No cérebro de roedores, neurônios recém-formados contribuem para a homeostase tecidual e em funções cerebrais, como certas formas de aprendizado e memória (Deng et al., 2010). Nesse sentido, a neurogênese tem se estabelecido como um importante fator na homeostase e está envolvido em diversas doenças cerebrais (Zhao et al., 2008).

Nas palavras do pesquisador Dr. G. Kempermann “*a neurogênese consiste em um processo e não em um evento*”. E como tal, pode sofrer influência através de estímulos internos e externos (Kempermann et al., 2015).

Na ZSV a neurogênese parece ser regulada por experiências olfativas dos animais (Lledo & Saghatelian, 2005; Lledo et al., 2006), já que estudos mostram que neurogênese nesta região está associada a processos de aprendizagem e memória relacionados com a estimulação do olfato (Alonso et al., 2006). Já na ZSG hipocampal foi demonstrado uma relação entre a neurogênese e os processos de aprendizagem e memória, tanto em animais quanto em humanos (Gould et al., 1999c; Kempermann & Gage, 2002; Bruel-Jungerman et al., 2005; Coras et al., 2010). Além disso, estímulos que podem melhorar os processos de aprendizagem e memória, como corrida voluntária, prática de exercícios físicos moderada e exposição a ambientes enriquecidos (van Praag et al., 1999; Bruel-Jungerman et al., 2005) aumentam a proliferação celular e a sobrevivência dos novos neurônios gerados na ZSG de roedores.

Em contrapartida, estudos revelam que existem fatores que levam a diminuição da proliferação celular e da neurogênese, como o estresse crônico físico ou psicossocial (Lucassen et al., 2010).

Algumas condições patológicas também geram um impacto na neurogênese adulta no SNC, como observado em modelos animais que simulam crises convulsivas generalizadas, características de um tipo dramático de epilepsia, nos quais houve uma forte estimulação da neurogênese após as convulsões (Parent et al., 1997; Madsen et al., 2000; Scott et al., 2010). Além disso, modelos animais de isquemia global e focal também induzem o aumento do número de neurônios novos na ZSV dos ventrículos laterais cerebrais e na ZSG do GD do hipocampo (Liu et al., 1998; Yagita et al., 2001). De modo semelhante, em um modelo de isquemia cerebral global e transitória, em ratos, houve um aumento na proliferação celular na

ZSG com migração e diferenciação dessas células com o passar do tempo após o insulto isquêmico (Kawai et al., 2004).

O envolvimento da neurogênese hipocampal adulta em desordens psiquiátricas é bastante amplo (Czéh et al., 2001; Santarelli et al., 2003; Petrik et al., 2012). Diversos transtornos de humor, relacionados com ansiedade e estresse, parecem diminuir a neurogênese hipocampal em roedores (Bannerman et al., 2004).

Já o tratamento crônico com ADs de várias classes, incluindo os tricíclicos, como a imipramina e os inibidores seletivos de recaptção da serotonina (ISRS), como a fluoxetina, aumentam o número de células progenitoras no hipocampo, as quais se diferenciam em neurônios maduros (Malberg et al., 2000; Santarelli et al., 2003; Sairanen et al., 2007).

1.3. Miricitrina

A miricitrina (MIRI) é um flavonóide, pertencente ao subgrupo flavonol, extraído de algumas plantas tropicais do gênero *Pouteria*, como, da *Manilkara zapota*, uma árvore conhecida como sapotizeiro, e da *Eugenia uniflora*, conhecida popularmente como pitanga (Ma et al., 2003, 2004).

No que diz respeito à cinética dessa substância, o estudo “*in vitro*” realizado por Yokomizo & Moriwaki (2005a), mostrou que a absorção da MIRI acontece de maneira concentração-dependente e tempo-dependente. A absorção pelo trato gastrointestinal ocorre após 30 minutos (porém o pico se deu após 2 horas com uma porcentagem de 68% de absorção) da administração e sua absorção se dá de forma passiva, por meio de transporte entre as junções extracelulares. A estrutura química da MIRI pode ser observada na Figura 4.

Diversas atividades farmacológicas foram atribuídas a esse flavonóide, incluindo ações antioxidante, antinociceptiva, anti-inflamatória, antialérgica e antioncogênica (Birt et al., 2001; Yokomizo & Moriwaki, 2005b; Meotti et al., 2006a; Meotti et al., 2006b; Meotti et al., 2008; Shimosaki et al., 2011).

No que se refere à sua ação antioxidante, estudos realizados “*in vitro*” mostraram *que* a MIRI e seus produtos de degradação demonstram efeito protetor contra a oxidação da lipoproteína de baixa densidade (LDL), por meio de uma

atividade quelante e seqüestradora (*scavenger*) de radicais livres. (Yokomizo & Moriwaki, 2005b).

Em relação à ação antinociceptiva da MIRI em modelos animais de dor aguda e crônica (Meotti et al., 2006a, 2006b, 2007) foi demonstrado que esse flavonóide diminuiu, por exemplo, dores viscerais induzidas por administração de ácido acético e inibiu a dor neuropática gerada através da administração intraplantar de capsaicina (Meotti et al., 2006a). Além disso, a MIRI foi capaz de diminuir a alodinia e reduzir o edema de pata, causados por injeção subcutânea de adjuvante completo de Freund na pata dos animais ou induzidos pela constrição parcial do nervo ciático (Meotti et al., 2006b). Ainda investiga-se o mecanismo de ação exato pelo qual a MIRI gera seu efeito antinociceptivo, mas mecanismos moleculares, como a inibição da sinalização celular da proteína quinase C (PKC) e do NO, além da inibição do transporte de Ca^{+2} e potássio, parecem estar envolvidos nesse processo (Meotti et al., 2006a).

No SNC a ação da MIRI é relacionada a uma possível ação ansiolítica e antipsicótica (Fernandez et al., 2009; Pereira et al., 2011). A administração aguda desse flavonóide aumentou o número de entradas e tempo gasto nos braços abertos do labirinto em cruz elevado, demonstrando um efeito tipo-ansiolítico, sem, entretanto causar efeito de sedação (Fernandez et al., 2009).

O efeito antipsicótico gerado pela MIRI pode ser observado em diversos modelos animais de mania, como escaladas induzidas por apomorfina, observação de estereotipias e teste da pata. Esse efeito foi alcançado em doses que não induziram à catalepsia ou alteraram a atividade locomotora, o que indica um perfil de antipsicótico atípico para esse composto (Pereira et al., 2011). Ainda caracterizando o efeito antipsicótico da MIRI, Pereira e colaboradores (2014), observaram a capacidade dessa substância em reverter o aumento de vocalizações ultrasônicas de alta-frequência induzidas por anfetaminas em ratos.

A ação antipsicótica da MIRI no SNC parece estar relacionada com a atividade nitrérgica dessa substância, que atua diretamente na cascata de síntese do NO, modulando a atividade da nNOS, através da inativação dessa enzima (Figura 5). O NO possui a capacidade de modular a neurotransmissão dopaminérgica, bloqueando a recaptação de dopamina e facilitando a ativação pós-

sináptica de receptores dopaminérgicos (Del Bel & Guimarães, 2000; Bernstein et al., 2005). De fato, drogas que atuam inibindo o NO podem apresentar efeitos antipsicóticos (West et al., 2002; Bernstein et al., 2005).

Mais um mecanismo envolvido na atividade da MIRI também parece ocorrer pela inibição da fosforilação da PKC (Meotti et al., 2006a; Pereira et al., 2011), que consiste em um grupo de enzimas encontradas em grande quantidade no cérebro e envolvidas em diversas funções, entre elas, liberação de neurotransmissores, plasticidade sináptica e regulação da excitabilidade neuronal (Mc Donald et al., 2011). A ativação dessas enzimas leva a uma subsequente ativação de sistemas monoaminérgicos, com maior atividade no sistema dopaminérgico (White & Kalivas, 1998; Chen et al., 2009). Apesar de fármacos estabilizadores de humor, como o lítio e o valproato, atuarem em sítios diferentes da PKC, o padrão de ação destes fármacos parece ser, ao menos em parte, devido à diminuição da ativação dessa enzima (Watson & Lenox, 1996; Manji & Lenox, 1999; Manji & Chen, 2002).

Como demonstrado por Pereira e colaboradores (2011; 2014) a administração de MIRI parece atenuar sintomas tipo-antipsicóticos e de mania, provavelmente devido à sua ação inibitória dessa substância sobre a PKC e a atividade do NO. Embora drogas com propriedades antipsicóticas possam ser utilizadas no tratamento da depressão, o efeito da MIRI em testes preditivos de atividade antidepressiva ainda não foi demonstrado.

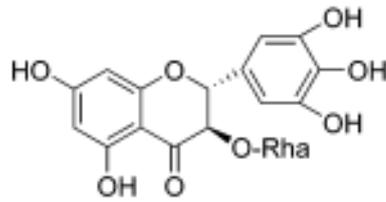


Figura 4: Estrutura química do antioxidante polifenólico Miricitrina (Fonte: Ma et al., 2004).

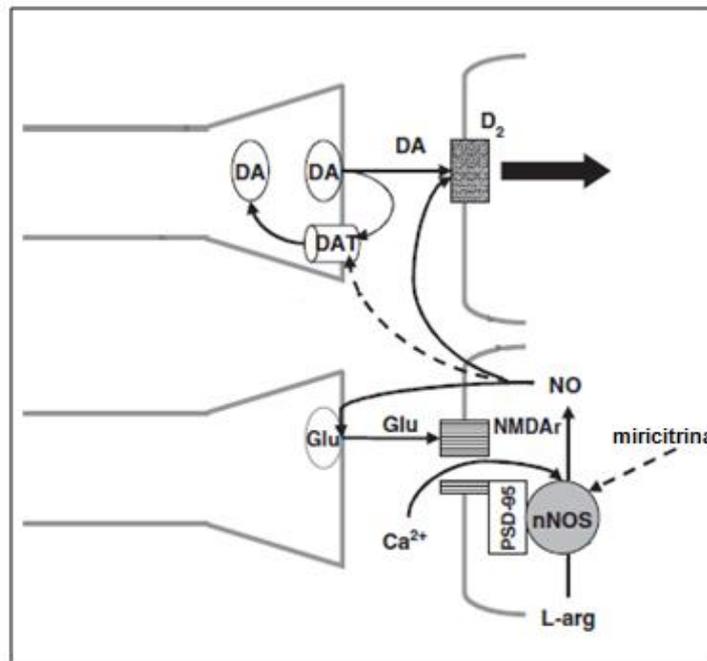


Figura 5: Efeitos do Óxido Nítrico (NO) na transmissão dopaminérgica: Glutamato (Glu) ativa receptores N-metil-D-aspartato (NMDAr) em neurônios nitrérgicos, gerando abertura de canais de Cálcio (Ca^{2+}), levando ao influxo desse íon. O aumento de Ca^{2+} intracelular ativa Óxido Nítrico Neuronal (nNOS), gerando NO a partir de L-arginina (L-arg). O NO se difunde para o espaço extracelular, inibindo o transporte de dopamina (DAT), o que reduz a recaptção de dopamina (DA) e aumenta o seu nível extracelular. DA ativa os receptores D_2 pós-sinápticos. Dessa forma, o NO facilita diretamente a ativação de receptores D_2 . Além disso, o NO aumenta a liberação de Glu, o que exacerba seu efeito sobre a produção de NO. A miricitrina bloqueia a síntese de NO, reduzindo o efeito facilitatório do NO na transmissão dopaminérgica. Linha cheia: ativação; linha tracejada: inibição. (Fonte: Pereira et al., 2011 – modificado).

1.4. Modelos animais no estudo da depressão

Como a fisiopatologia da depressão ainda não é completamente compreendida, os modelos animais de depressão são de extrema importância no entendimento desse processo, bem como na tentativa de produzir fármacos mais efetivos para o seu tratamento. Esses modelos, entretanto, possuem restrições, já que não são capazes de mimetizar características mais psicológicas da doença, como ideação suicida, sentimento de culpa, diminuição da concentração, entre outros. Apesar de falhos em alguns sentidos, são os modelos animais que nos permitem compreender melhor a neurobiologia da patologia e à medida que estes são responsivos ao tratamento com os fármacos hoje existentes, podemos, então, criar uma relação entre o comportamento do animal (embora carente de todos os sintomas da doença) e a doença (Abelaira et al., 2013).

Para um teste ou modelo animal ser validado, ele deve apresentar, pelo menos, uma das seguintes validades: validade preditiva (o comportamento induzido no animal é revertido ou prevenido com o tratamento utilizando-se fármacos eficazes em humanos para aquela condição); validade de face (quanto um modelo reproduz sintomas e/ou comportamentos da doença em estudo); validade de constructo (quanto o modelo reproduz os mecanismos neurobiológicos da doença) (Abelaira et al., 2013).

Os testes mais antigos de comportamento tipo-depressivo apresentam validade preditiva, como o teste do nado forçado e o teste de suspensão pela cauda (TSC). Em ambos os testes os animais são submetidos a uma situação inescapável e é avaliado o tempo de imobilidade, que é tomado como comportamento tipo depressivo (figura 6). Quando fármacos antidepressivos são utilizados nesses modelos, eles se mostram efetivos em diminuir a imobilidade dos animais (Nestler et al., 2002).

Pode-se, ainda, citar diversos outros modelos animais de depressão, como estresse brando repetido e imprevisível, privação materna, bulbectomia olfatória, animais modificados geneticamente, entretanto, o desenvolvimento de um modelo que represente melhor os sintomas da depressão e possua todas as validades preditivas continua sendo um desafio (Willner, 2005; Abelaira et al., 2013).

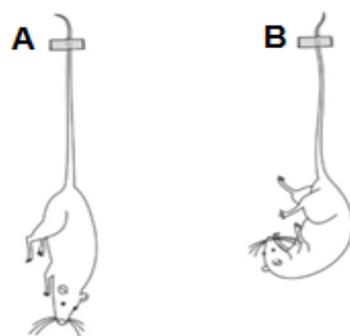


Figura 6: Esquema representativo da imobilidade (A) e mobilidade (B) no teste de suspensão pela cauda (Fonte: Abelaira et al., 2013).

2. Objetivos

2.1. Geral

Considerando as potenciais propriedades terapêuticas da MIRI e que a neurogênese hipocampal pode ser usada como marcador molecular da atividade antidepressiva de drogas, esse trabalho teve por objetivo investigar os efeitos do tratamento agudo e repetido com a MIRI no TSC, um teste comportamental preditivo de atividade tipo-antidepressiva, bem como o possível envolvimento da neurogênese hipocampal.

2.2. Específicos

➤ Investigar os efeitos da administração aguda (3, 10 e 30 mg/Kg) ou repetida de 21 e 28 dias (10mg/Kg) da MIRI em camundongos submetidos ao teste do campo aberto (CA), sobre parâmetros de atividade locomotora.

➤ Investigar os efeitos da administração aguda (3, 10 e 30 mg/Kg) ou repetida de 21 e 28 dias (10mg/Kg) da MIRI em camundongos submetidos ao TSC, um teste preditivo de atividade tipo-antidepressiva.

➤ Detectar se o tratamento repetido de 21 dias com MIRI leva à proliferação celular na ZSG do GD do hipocampo e na ZSV, através da imunohistoquímica para Ki67.

➤ Detectar se o tratamento repetido de 21 dias com MIRI altera a neurogênese na ZSG do GD do hipocampo e na ZSV, através da imunohistoquímica para DCX.

➤ Observar se a administração repetida de 28 dias de MIRI aumenta a sobrevivência celular na ZSG do GD, 14 dias após a administração de BrDU, através de imunofluorescência para o marcador BrDU.

➤ Observar se a administração repetida de 28 dias de MIRI induz à diferenciação celular em um fenótipo neuronal específico na ZSG do GD, 14 dias após a administração de BrDU, por meio da técnica de imunofluorescência com tripla marcação para o BrdU, NeuN e GFAP.

3. Materiais e métodos

3.1. Animais

Foram utilizados camundongos machos adultos albinos, Swiss e Balb/C, pesando de 30 a 35 g. Os animais permaneceram em condições padrões de alojamento, com ciclo de luz claro/escuro (12 h), temperatura controlada ($22 \pm 1^\circ\text{C}$) e suprimento de água e ração à vontade durante o desenvolvimento de todo o experimento.

Todos os procedimentos experimentais seguiram os “Princípios Básicos para a Utilização Animal”, conforme aprovação pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal da Universidade Estadual de Maringá (Parecer CEUA nº 8488121214).

3.2. Procedimento experimental

3.2.1. Experimento I - tratamento agudo

O tratamento agudo foi realizado no intuito de obter uma curva dose x efeito da MIRI. Para analisar se a ausência do efeito da MIRI no tratamento agudo estaria relacionada com a espécie utilizada foram utilizadas duas espécies de camundongos distintas, os camundongos Swiss e camundongos Balb/C.

Primeiramente, os animais foram tratados, intraperitonealmente (*i.p.*), com veículo (solução de salina com 1% de Tween 80), imipramina (IMIP) (20 mg/Kg Sigma-Aldrich®, São Paulo, Brasil) e MIRI (3, 10 ou 30 mg/Kg; Sigma-Aldrich®, São Paulo, Brasil) uma hora antes de serem expostos aos testes comportamentais. A MIRI e a IMIP foram previamente dissolvidas em solução de salina com 1 % de Tween 80. A dose utilizada de 20mg/Kg da IMIP foi baseada no trabalho de Schiavon e colaboradores (2015).

Os animais foram divididos em cinco grupos (n= 8-13):

- (i) grupo veículo (controle)
- (ii) grupo tratado com IMIP 20 mg/Kg (controle positivo)
- (iii) grupo tratado com MIRI 3 mg/Kg (MIRI 3)
- (iv) grupo tratado com MIRI 10 mg/Kg (MIRI 10)
- (v) grupo tratado com MIRI 30 mg/Kg (MIRI 30)

Os animais foram submetidos ao teste do CA e, logo em seguida, ao TSC. Após os testes os animais foram eutanasiados com overdose de tiopental (Thiopentax[®], Cristália, Itapira-SP, Brasil), conforme especificações do Comitê de Ética Local.

3.2.2. Experimento II - tratamento repetido de 21 dias: proliferação celular e neurogênese

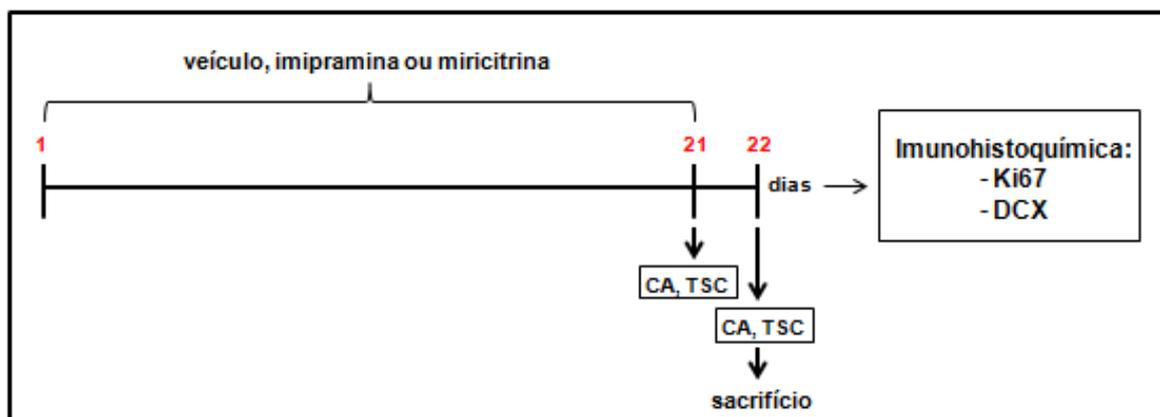
O tratamento repetido foi realizado em camundongos da espécie Balb/C, sendo que os animais foram divididos em três grupos (n= 11-14):

- (i) grupo veículo (controle)
- (ii) grupo tratado com IMIP 20 mg/Kg (controle positivo)
- (iii) grupo tratado com MIRI 10 mg/Kg

Estes animais foram tratados, *i.p.*, com veículo, IMIP (20 mg/Kg Sigma-Aldrich[®], São Paulo, Brasil) ou MIRI (10 mg/Kg; Sigma-Aldrich[®], São Paulo, Brasil) uma vez ao dia, durante 21 dias, no início do período da tarde. Baseado no trabalho de Pereira e colaboradores (2011) foi utilizada a MIRI na dose de 10mg/Kg.

No 21º dia, uma hora após o tratamento, os animais foram submetidos ao teste do CA e, logo em seguida, ao TSC.

Vinte e quatro horas após a última administração os animais foram reexpostos ao CA e TSC. Imediatamente após os retestes esses animais foram eutanasiados e tiveram seus cérebros retirados para posterior detecção de imunorreatividade para Ki67 e DCX (Esquema 1).

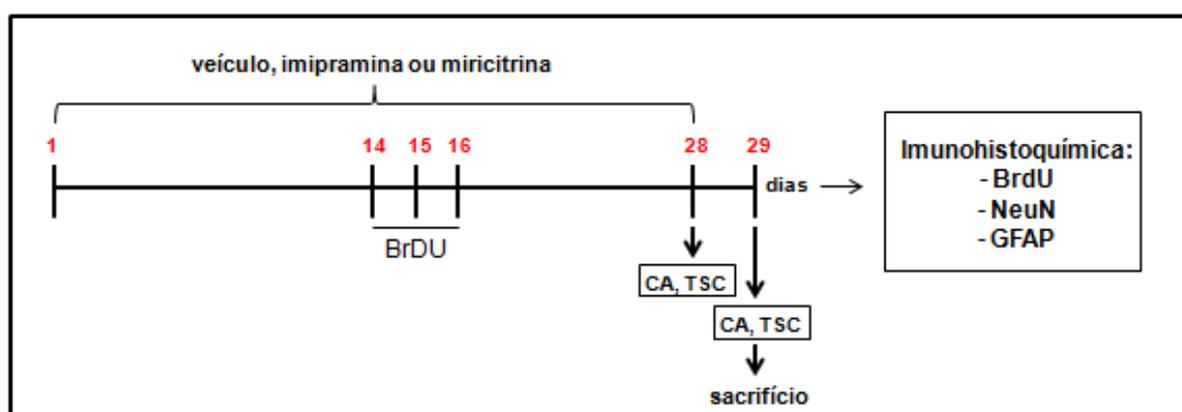


Esquema 1: Delineamento experimental de 21 dias de tratamento.

3.2.3. Experimento III - tratamento repetido de 28 dias: sobrevivência e diferenciação celular

Os grupos de animais, doses utilizadas, testes comportamentais e retirada dos cérebros para esse esquema de tratamento foi idêntico ao do tratamento repetido de 21 dias.

Adicionalmente, no 14^o, 15^o e 16^o dia os animais receberam injeção de BrDU 100 mg/Kg, *i.p.* (Campos et al., 2013), para posterior avaliação da sobrevivência e diferenciação celular através da detecção de imunorreatividade para BrDU, NeuN e GFAP (Esquema 2).



Esquema 2: Delineamento experimental de 28 dias de tratamento.

3.3. Avaliação comportamental

3.3.1. Campo aberto

O teste foi realizado de acordo com Zanelati e colaboradores (2010). Nesse teste os animais foram colocados numa arena quadrangular (70 cm de lado e 40 cm de altura, feita de madeira, com fundo escuro, para dar contraste com os animais) (Figura 7) e sua atividade exploratória foi filmada de uma sala adjacente à sala do teste.

Uma hora após a última administração do tratamento, os camundongos foram submetidos ao CA durante 5 min. Os animais foram posicionados sempre no mesmo canto da arena, escolhido aleatoriamente pelo experimentador. O comportamento foi analisado com o auxílio do *software* Any-maze (versão 4.9; Stoelting, EUA). Este programa detecta a posição do animal no aparato e calcula a distância total

percorrida, em metros, por cada camundongo durante o experimento. Além disso, com o auxílio do mesmo programa, uma zona central, hipotética, foi desenhada dentro da arena, a qual corresponde ao 'centro'. O número de entradas e o tempo que animal permaneceu nessa região central foram calculados. Após cada tentativa foi realizada a limpeza da arena com uma solução de etanol a 70%.



Figura 7: Foto representativa do aparato utilizado para o teste do campo aberto (CA).

3.3.2. Teste de suspensão pela cauda

Imediatamente após o teste do CA os animais foram, individualmente, submetidos ao TSC. Neste teste, cada animal permaneceu pendurado, pela cauda, presa com fita adesiva (2 - 3 cm a partir da ponta da cauda) a uma barra de madeira ligada a um suporte de fundo escuro, usado como contraste. Durante o teste, os animais foram mantidos suspensos 30 cm acima do solo (Figura 8).

O desempenho individual de cada animal foi registrado com uma câmera de vídeo, posicionada no mesmo nível do camundongo, durante um período de 6 min. A latência para apresentar o primeiro episódio de imobilidade e o tempo de imobilidade durante os 4 últimos minutos do teste foram quantificados. A imobilidade foi definida, operacionalmente, quando os camundongos permaneciam pendurados sem se movimentarem (Steru et al., 1985).

Vinte e quatro horas após a última administração da droga os animais foram reexpostos ao TSC, e, novamente foi realizada a conduta descrita acima. Esse procedimento foi adotado, no sentido de se verificar o efeito residual do tratamento em contraposição com o efeito agudo, avaliado uma hora após a administração das drogas.



Figura 8: Foto representativa do modelo experimental do teste de suspensão pela cauda (TSC).

3.4. Preparo do tecido para análise imuno-histoquímica

Imediatamente após os retestes comportamentais, os animais foram anestesiados com tiopental (Thiopentax[®], Cristália, Itapira-SP, Brasil), conforme especificações do Comitê de Ética Local. Em seguida, procedeu-se a perfusão transcardíaca com solução tampão fosfato-salino (PBS) 0,01 M (3 min; 10 mL/min), seguida de solução de paraformaldeído (PFA) 4% em tampão fosfato (PB) 0,2 M (5 min; 10 mL/min), com o auxílio de uma bomba dosadora peristáltica (Milan[®], BP-601, Curitiba-Brasil). Após a perfusão, os camundongos foram decapitados e tiveram seus cérebros removidos e conservados em solução fixadora de PFA 4% em PB 0,2 M durante 24 horas. Após esse período os cérebros foram transferidos para solução de sacarose 30% em PBS 0,01 M, durante 72 horas a 4°C, para crioproteção.

Para congelamento adequado, os cérebros foram mergulhados em isopentano, sob refrigeração de nitrogênio líquido, e armazenados a -20°C. Em seguida, os cérebros congelados foram seccionados com o auxílio de um micrótomo criostato (Criocut 1800, Reichert-Jung, Heidelberg, Alemanha). Secções coronais adjacentes (30 µm), foram, consecutivamente coletadas, em sete tubos de 5 mL contendo PBS acrescido de 1% de azido sódico. As secções coletadas compreenderam toda a extensão do hipocampo, correspondendo às coordenadas estereotáxicas entre -1.06 a -2.18 mm, posteriores ao Bregma, de acordo com o atlas de Franklin e Paxinos (1997).

3.4.1. Imuno-histoquímica para Ki-67 e DCX

Para a detecção de Ki-67 e DCX, as secções foram submetidas a sucessivas lavagens em PBS 0,1 M e, em seguida, incubadas em solução de tampão citrato a 50° C durante 30 minutos, para recuperação antigênica. Após mais algumas lavagens, as secções foram mantidas, sob agitação constante, em solução de PBS 0,1 M contendo H₂O₂, por um período de 30 minutos, para eliminar resquícios de sangue. Após esses procedimentos, as secções foram incubadas em solução contendo 2% de soro albumina bovino (BSA) (Santa Cruz Biotechnology) em PBS 0,1 M acrescido de Triton-X 100 (Sigma-Aldrich[®], Steinheim, Alemanha) 0,3% (PBS+) durante 60 min para o bloqueio de reações inespecíficas. As secções foram, então, incubadas com anticorpo *rabbit* anti-Ki-67 (1:200, Acris Antibodies) ou *goat* anti-DCX (1:100, Santa Cruz Biotechnology) em solução de PBS+, contendo 1% de BSA e mantidas, *overnight*, sob agitação constante à 4°C. Após este período, as secções foram lavadas com PBS+ e, então, incubadas com os anticorpos secundários *donkey* anti-*goat* ou *goat* anti-*rabbit* (1:500, Santa Cruz Biotechnology), biotinilados, respectivamente, em uma solução idêntica à utilizada para o anticorpo primário, e foram mantidas, sob agitação constante, à temperatura ambiente por 1,5h. Posteriormente, as secções foram incubadas com o complexo avidina-biotina (ABC; Kit, Vector Laboratories) em PBS+, sob agitação constante, à temperatura ambiente, por mais 2 h. A revelação foi realizada usando uma solução tampão de acetato de sódio contendo 3,3,9-hidrocloro de diaminobenzidina (DAB; Sigma-Aldrich[®], Steinheim, Alemanha) e H₂O₂, acrescida de sulfato de níquel (Sigma-Aldrich[®], Steinheim, Alemanha). Após estes processos, as secções foram lavadas em PBS 0,1 M e montadas em lâminas previamente gelatinizadas. Após desidratação e diafanização adequadas, as lâminas foram cobertas com Permount[®] (Fisher Scientific, New Jersey, EUA) e lamínulas.

3.4.2. Imuno-histoquímica para BrdU

Para imuno-histoquímica e detecção do BrdU, após algumas lavagens com PBS 0,1 M as secções foram incubadas em metanol (MeOH) absoluto contendo H₂O₂ durante 30 minutos à temperatura ambiente. Logo em seguida, foram incubadas em solução de glicina (Invitrogen[®], Carlsbad, EUA) 0,1 M em PBS 0,1 M por 5 min. à temperatura ambiente. Na sequência, tiveram o seu DNA desnaturado em solução de HCl (Synth[®], Diadema-SP, Brasil) 2 M em água destilada por 60 min. a 40°C e, então, incubadas em solução de ácido bórico (Merck[®], Darmstadt, Alemanha) 0,1 M em água destilada à temperatura ambiente durante 10 min. Após sucessivas lavagens em PBS 0,1 M, as secções foram incubadas em solução contendo 2% de BSA (Santa Cruz Biotechnology) em PBS 0,1 M durante 60 min., para o bloqueio de reações inespecíficas. As secções foram, então, incubadas com anticorpo *rat* anti-BrdU (1:400, Abcam) em solução de PBS 0,1 M contendo 1% de BSA acrescida de 0,1% Triton-X 100, e mantidas, *overnight*, sob agitação constante à 4°C. A partir dessa etapa, os procedimentos realizados foram idênticos aos descritos acima para a imunohistoquímica para Ki-67 e DCX.

3.4.3. Imunofluorescência para BrdU, GFAP e NeuN

Para a imunohistoquímica e detecção simultânea do BrdU, GFAP e NeuN, após algumas lavagens com solução de salina tamponada com tris (hidroximetil) aminometano (TBS) 50mM, as secções tiveram o seu DNA desnaturado em solução de HCl (Synth[®], Diadema-SP, Brasil) 2 M em água destilada à 37°C por 30 min. Em seguida, essas secções foram lavadas com solução de ácido bórico (Merck[®], Darmstadt, Alemanha) 0,1 M em água destilada e, então, incubadas em solução contendo 2% de BSA (Santa Cruz Biotechnology) em TBS 50mM acrescido de 0,25% Triton-X 100 (TBS+) durante 3 horas, para o bloqueio de reações inespecíficas. A seguir, as secções foram incubadas com os anticorpos primários *rat* anti-BrdU (1:100, Abcam), *rabbit* anti-GFAP (1:500, Cell Signaling) e *mouse* anti-NeuN (1:500, Millipore) em solução de TBS+ contendo 0,1% de BSA e mantidas, *overnight*, sob agitação constante à 4°C. Após este período, as secções foram lavadas com TBS e, então, incubadas com os anticorpos secundários *goat* anti-*rat* (1:1000, Alexa Fluor 488), *donkey* anti-*rabbit* (1:1000, Alexa Fluor 594), *goat* anti-

mouse (1:1000, Alexa Fluor 647), fluorescentes, em uma solução idêntica à utilizada para o anticorpo primário, e foram mantidas, sob agitação constante, à temperatura ambiente por 1,5 horas. Posteriormente, as secções foram lavadas em solução de TBS+, montadas em lâminas previamente gelatinizadas e cobertas com Flouromount® (Interprise) e lamínulas. As lâminas prontas foram protegidas da luz com papel alumínio e estocadas na geladeira.

3.5. Análise quantitativa

As lâminas foram previamente codificadas, de modo que a análise foi realizada de maneira “cega” pelo experimentador. A seguir, todas as secções presentes nas lâminas foram mapeadas em relação à coordenada estereotáxica correspondente. Foram quantificadas de 6-8 secções por animal (já que toda a extensão do hipocampo foi retirada), onde analisou-se a ZSG e 2 secções por animal (correspondentes às coordenadas -1,34 e -1,58 mm, posteriores ao Bregma), quando analisou-se a ZSV (Schiavon et al., 2015).

3.5.1. Células Ki-67 e DCX-positivas na ZSG do GD e na ZSV

As células positivas para Ki-67, DCX e BrdU foram quantificadas, manualmente, por toda a ZSG do GD hipocampal de ambos os hemisférios em 6-8 secções, em microscópio óptico comum (Olympus, BX41), com aumento de 40x.

Na ZSV as células positivas para Ki-67 e DCX, foram contadas, manualmente, em ambos os hemisférios em 2 secções, em microscópio óptico comum (Olympus, BX41), com aumento de 100x.

O número de células Ki-67, DCX e BrdU-positivas nas áreas quantificadas foi expresso como média (\pm erro padrão da média (EPM)).

3.5.2. Células BrdU, NeuN e GFAP-positivas na ZSG do GD

As células BrdU/NeuN-positivas, assim como, BrdU/GFAP-positivas foram quantificadas, manualmente, por toda a ZSG do GD hipocampal de ambos os hemisférios em 6-8 secções, em microscópio fluorescente Confocal (Leica, TCS-SPE), com aumento de 40x. Foram analisadas 50 células BrdU-positivas por lâmina.

O número de células BrdU/NeuN-positivas nas áreas quantificadas foi expresso como porcentagem do número de células BrdU/NeuN-positivas sobre número total de células BrdU-positivas (\pm erro padrão da média (EPM)).

3.6. Análise estatística

Ambos os dados, comportamentais e histológicos, foram examinados, primeiramente, para os pressupostos de normalidade e homocedasticidade. A seguir, os dados foram analisados utilizando a análise de variância de um fator (*one-way ANOVA*), seguida do *posthoc* de Tukey para comparações múltiplas. O nível de significância de 5% ($p < 0,05$) foi considerado estatisticamente significativo.

4. Resultados

4.1. Experimento I - tratamento agudo

4.1.1. Campo aberto

Uma hora após a administração das drogas, o desempenho dos camundongos Swiss no CA foi avaliado e está demonstrado na Figura 9 (A-C). Nenhuma diferença significativa entre os grupos foi encontrada na distância percorrida no CA (Figura 9A, $F_{4,53}=0,30$, $p=0,87$), tempo no centro (Figura 9B, $F_{4,53}=0,36$, $p=0,83$) e número de entradas no centro do CA (Figura 9C, $F_{4,53}=1,35$, $p=0,26$).

Da mesma forma, uma hora após a administração do tratamento, o desempenho dos camundongos Balb/C no CA foi avaliado e está demonstrado na Figura 9 (D-F). Nenhuma diferença significativa entre os grupos foi encontrada na distância percorrida no CA (Figura 9D, $F_{4,59}=1,06$, $p=0,39$), tempo no centro (Figura 9E, $F_{4,59}=0,66$, $p=0,62$) e número de entradas no centro do CA (Figura 9F, $F_{4,59}=0,61$, $p=0,66$).

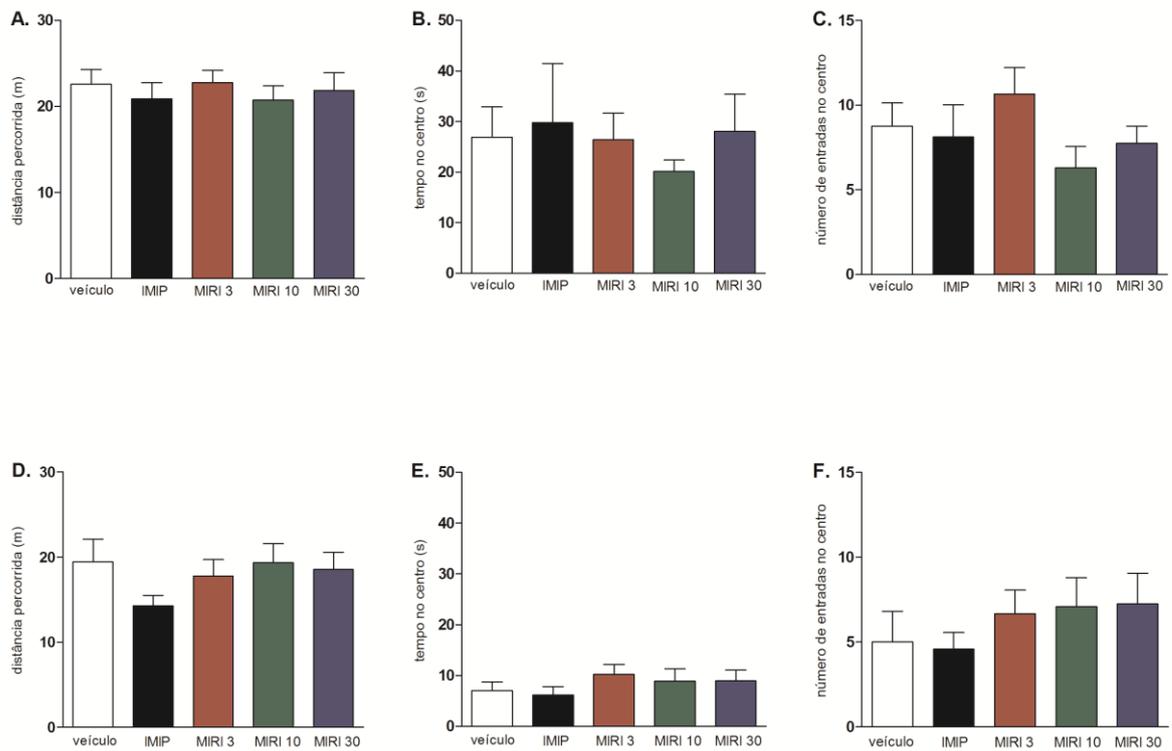


Figura 9: Tratamento agudo com IMIP ou MIRI não alterou a atividade locomotora de camundongos submetidos ao campo aberto (CA). Os animais receberam injeções *i.p.* de veículo, IMIP ou MIRI (3, 10 ou 30 mg/Kg). Uma hora após a administração os camundongos foram submetidos ao CA por 5 min. As colunas representam as médias e as barras verticais os EPMs dos grupos veículo (n=13), IMIP (n=8), MIRI 3 (n=12), MIRI 10 (n=13) e MIRI 30 (n=8) de camundongos Swiss e dos grupos veículo (n=12), IMIP (n=12), MIRI 3 (n=12), MIRI 10 (n=12) e MIRI 30 (n=12) de camundongos Balb/C. (A/D) Distância total percorrida no CA (m), (B/E) tempo na zona central do CA (s), (C/F) número de entradas na zona central do CA. Para todos os parâmetros analisados, $p > 0,05$ (*one-way ANOVA*).

4.1.2. Teste de Suspensão pela cauda

O desempenho dos animais da espécie Swiss no TSC está demonstrado na figura 10A. A ANOVA detectou uma diferença estatística, para o primeiro episódio de imobilidade, no parâmetro latência ($F_{4,53}=6,81$, $p=0,0002$), e também no parâmetro imobilidade nos quatros minutos finais ($F_{4,53}=3,81$, $p=0,009$). O grupo IMIP, apresentou um aumento na latência ($p=0,0002$), quando comparado ao grupo veículo. Já, para o tempo de imobilidade durante os últimos quatro minutos, ANOVA demonstrou diminuição desse parâmetro no grupo IMIP ($p=0,009$), quando comparado ao veículo. Já nos grupos MIRI 3, MIRI 10 e MIRI 30 nenhuma diferença estatística foi encontrada, em ambos parâmetros, quando comparados ao grupo veículo ($p>0,05$).

A figura 10B mostra o desempenho dos animais da espécie Balb/C no TSC. A ANOVA detectou uma diferença estatística no parâmetro latência ($F_{4,58}=8,52$, $p=0,00002$), e também no parâmetro imobilidade nos quatros minutos finais ($F_{4,58}=4,13$, $p=0,005$). O tratamento com a IMIP aumentou a latência ($p=0,0003$) para o primeiro episódio de imobilidade dos animais, quando comparado ao grupo veículo. ANOVA demonstrou, ainda, uma diminuição no parâmetro tempo de imobilidade durante os últimos quatro minutos no grupo IMIP ($p=0,013$), quando comparado ao veículo. Já nos grupos MIRI 3, MIRI 10 e MIRI 30 nenhuma diferença estatística foi encontrada, em ambos parâmetros, quando comparados ao grupo veículo ($p>0,05$).

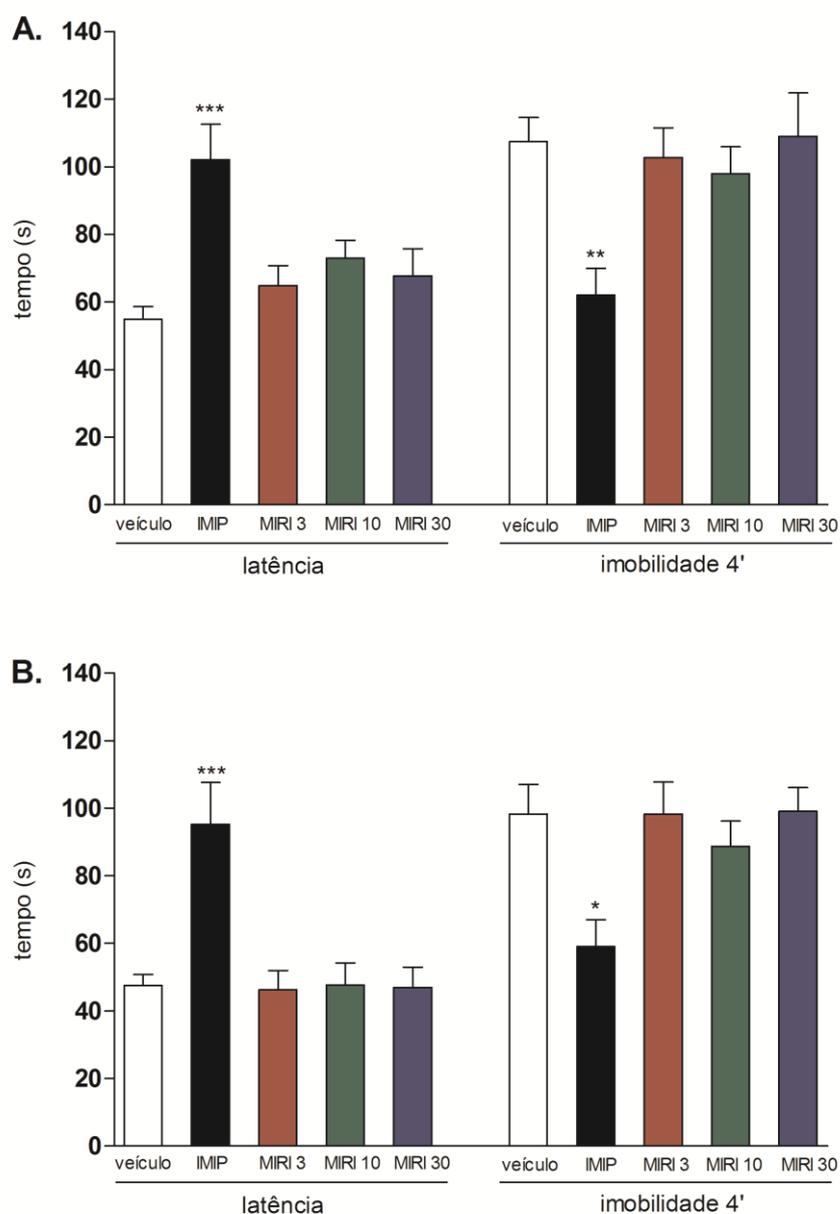


Figura 10: Tratamento agudo com IMIP aumentou o tempo de latência e diminuiu o tempo de imobilidade de camundongos submetidos ao teste de suspensão pela cauda (TSC). Os animais receberam injeções *i.p.* de veículo, IMIP ou MIRI (3, 10 ou 30 mg/Kg) uma hora antes de serem expostos, primeiramente ao CA, e então, ao TSC por 6 min. O tempo de latência para o primeiro episódio de imobilidade e o tempo de imobilidade nos últimos 4 min. foram registrados em segundos (s). As colunas representam as médias e as barras verticais os EPMS dos diferentes grupos. A figura 10A representa os resultados obtidos com camundongos Swiss nos grupos veículo (n=13), IMIP (n=8), MIRI 3 (n=12), MIRI 10 (n=13) e MIRI 30 (n=8). A figura 10B representa os resultados obtidos com camundongos Balb/C nos grupos veículo (n=12), IMIP (n=11), MIRI 3 (n=12), MIRI 10 (n=12) e MIRI 30 (n=12). * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ e *** $p < 0,001$ comparados ao grupo veículo (*one-way ANOVA* seguida do teste *post hoc* de Tukey).

4.2. Experimento II – tratamento repetido de 21 dias

4.2.1. Campo aberto

Após o término do tratamento repetido com IMIP ou MIRI 10 por 21 dias consecutivos, realizado em camundongos Balb/C, o desempenho dos animais no CA foi analisado e está demonstrado na Figura 11 (A-C). Nenhuma diferença significativa entre os grupos foi encontrada na distância percorrida no CA (Figura 11A, $F_{2,36}=0,52$, $p=0,59$), tempo no centro (Figura 11B, $F_{2,36}=2,01$, $p=0,15$) ou número de entradas no centro do CA (Figura 11C, $F_{2,36}=1,06$, $p=0,36$).

Vinte e quatro horas após o término do tratamento repetido os animais foram reexpostos ao teste do CA Figura 11 (D-F). Novamente, nenhuma diferença significativa entre os grupos foi encontrada na distância percorrida no CA (Figura 11D, $F_{2,36}=1,82$, $p=0,18$), tempo no centro (Figura 11E, $F_{2,36}=0,08$, $p=0,92$) e número de entradas no centro do CA (Figura 11F, $F_{2,36}=0,49$, $p=0,61$).

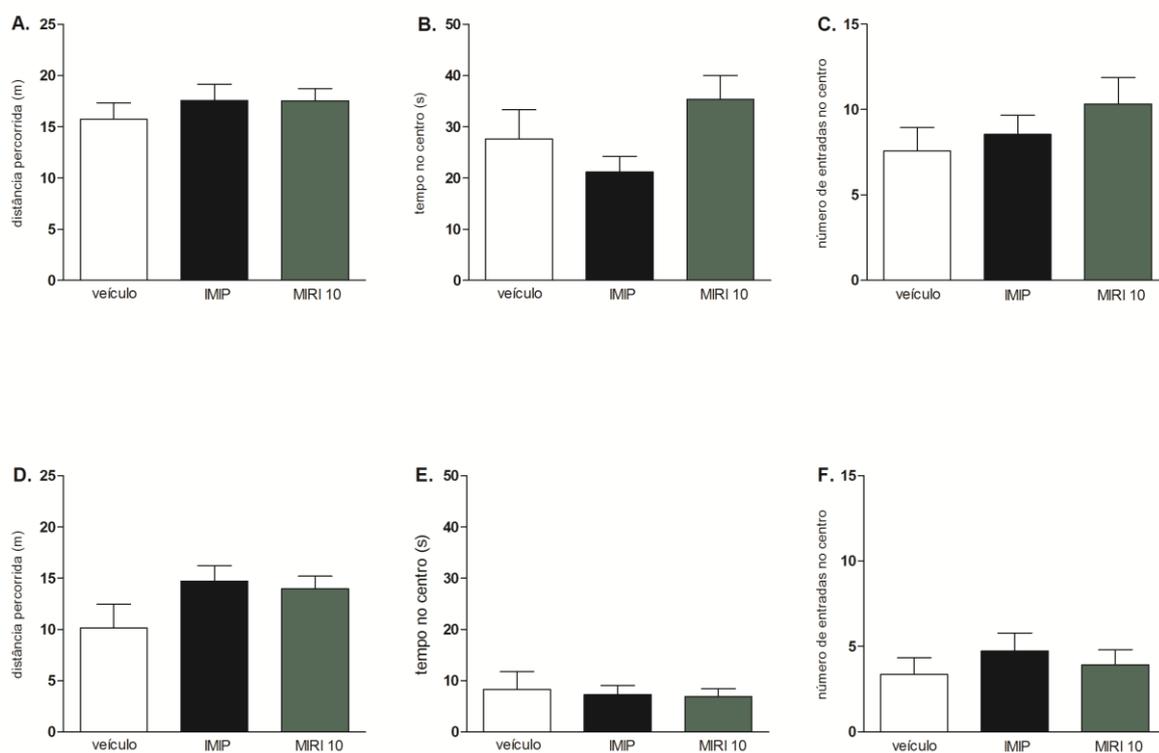


Figura 11: Tratamento repetido de 21 dias com IMIP ou MIRI 10 não alterou a atividade locomotora de camundongos submetidos ao campo aberto (CA). Os animais receberam injeções *i.p.* de veículo, IMIP ou MIRI (10 mg/Kg) durante 21 dias consecutivos. Uma hora após a última administração os camundongos foram submetidos ao CA por 5 min (10A, 10B e 10C). Vinte e quatro horas após a última administração os camundongos foram reexpostos ao teste por 5 min (10D, 10E e 10F). As colunas representam as médias e as barras verticais os EPMS dos grupos veículo (n=14), IMIP (n=11) e MIRI 10 (n=12). (A,D) Distância total percorrida no CA (m), (B,E) tempo na zona central do CA (s), (C,F) número de entradas no centro do CA. Para todos os parâmetros analisados, $p > 0,05$ (*one-way ANOVA*).

4.2.2. Teste de Suspensão pela cauda

Subsequentemente ao CA, os animais foram submetidos ao TSC. A figura 12A mostra os resultados obtidos nesse teste. ANOVA demonstrou uma diferença estatística no parâmetro latência ($F_{2,36}=5,46$, $p=0,01$), e também no parâmetro imobilidade nos quatros minutos finais ($F_{2,36}=3,38$, $p=0,05$). O grupo IMIP, apresentou aumento na latência ($p=0,02$), quando comparado ao grupo veículo. Já, para o parâmetro imobilidade nos últimos quatro minutos, ANOVA mostrou diminuição no grupo IMIP ($p=0,04$), quando comparado ao veículo. Já no grupo MIRI 10 nenhuma diferença estatística foi encontrada, em ambos os parâmetros, quando comparado ao grupo veículo ($p>0,05$).

Vinte e quatro horas após o término do tratamento repetido, e após serem reexpostos ao CA, os animais foram novamente submetidos ao TSC (Figura 12B). ANOVA não demonstrou diferença estatística no parâmetro latência ($F_{2,36}=0,79$, $p=0,46$), mas sim, no parâmetro imobilidade nos quatros minutos finais ($F_{2,36}=11,79$, $p=0,0001$). O grupo IMIP mostrou diminuição para o parâmetro imobilidade nos últimos quatro minutos ($p=0,0002$), assim como o grupo MIRI 10 ($p=0,03$), quando comparados ao veículo.

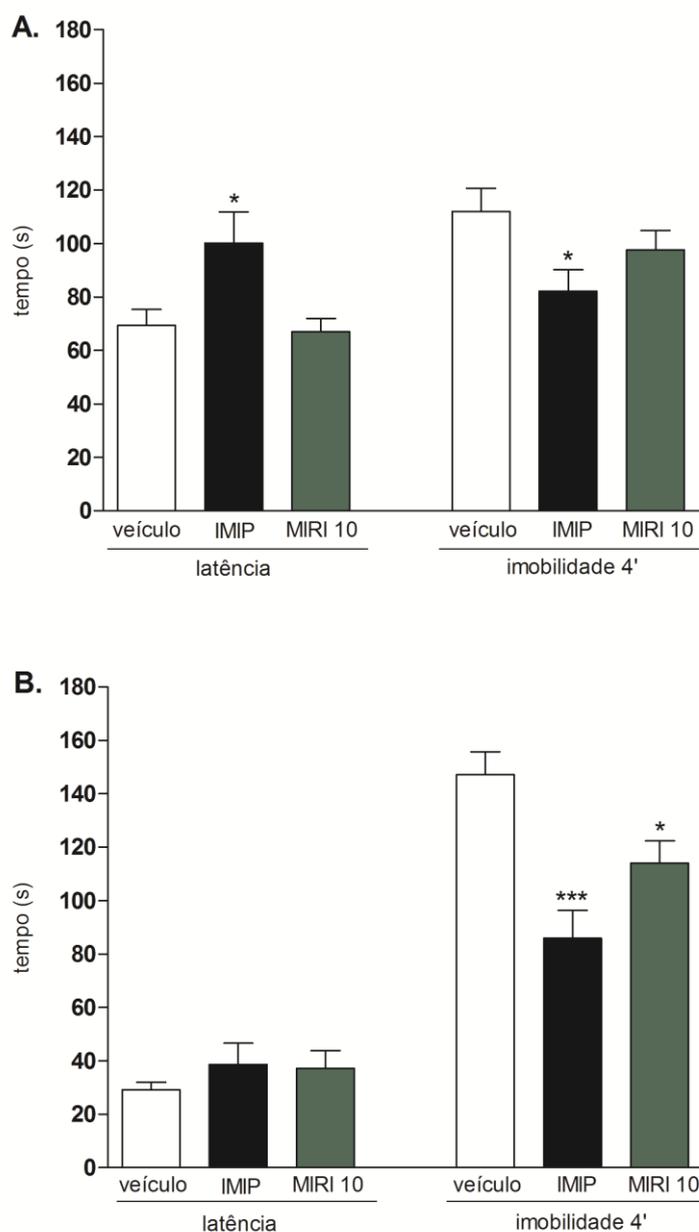


Figura 12: Tratamento repetido de 21 dias com IMIP ou MIRI 10 diminuiu o tempo de imobilidade de camundongos submetidos ao teste de suspensão pela cauda (TSC), vinte e quatro horas após a última administração. Os animais receberam injeções *i.p.* de veículo, IMIP ou MIRI (10 mg/Kg) durante 21 dias consecutivos. Uma hora após a última administração, os animais foram expostos, primeiramente ao CA, e então, ao TSC por 6 min (11A). Vinte e quatro horas após a última administração, os animais foram reexpostos, primeiramente ao CA, e então, ao TSC por 6 min (11B). O tempo de latência para o primeiro episódio de imobilidade e o tempo de imobilidade nos últimos 4 min. foram registrados em segundos (s). As colunas representam as médias e as barras verticais os EPs dos grupos veículo (n=14), IMIP (n=11) e MIRI 10 (n=12). *p<0,05 e ***p<0,001 comparado ao grupo veículo (*one-way* ANOVA seguida do teste *post hoc* de Tukey).

4.3. Experimento III – tratamento repetido de 28 dias

4.3.1. Campo aberto

Após 28 dias de tratamento repetido com IMIP ou MIRI 10, o desempenho dos animais no CA foi analisado e está demonstrado na Figura 13 (A-C). Nenhuma diferença significativa entre os grupos foi encontrada na distância percorrida no CA (Figura 13A, $F_{2,15}=0,84$, $p=0,45$), tempo no centro (Figura 13B, $F_{2,15}=0,11$, $p=0,89$) e número de entradas no centro do CA (Figura 13C, $F_{2,15}=0,79$, $p=0,47$).

Vinte e quatro horas após o término do tratamento repetido os animais foram reexpostos ao teste do CA Figura 13 (D-F). Novamente nenhuma diferença significativa entre os grupos foi encontrada na distância total percorrida (Figura 13D, $F_{2,15}=1,56$, $p=0,25$), tempo no centro (Figura 13E, $F_{2,15}=1,32$, $p=0,30$) e número de entradas no centro do CA (Figura 13F, $F_{2,15}=2,30$, $p=0,14$).

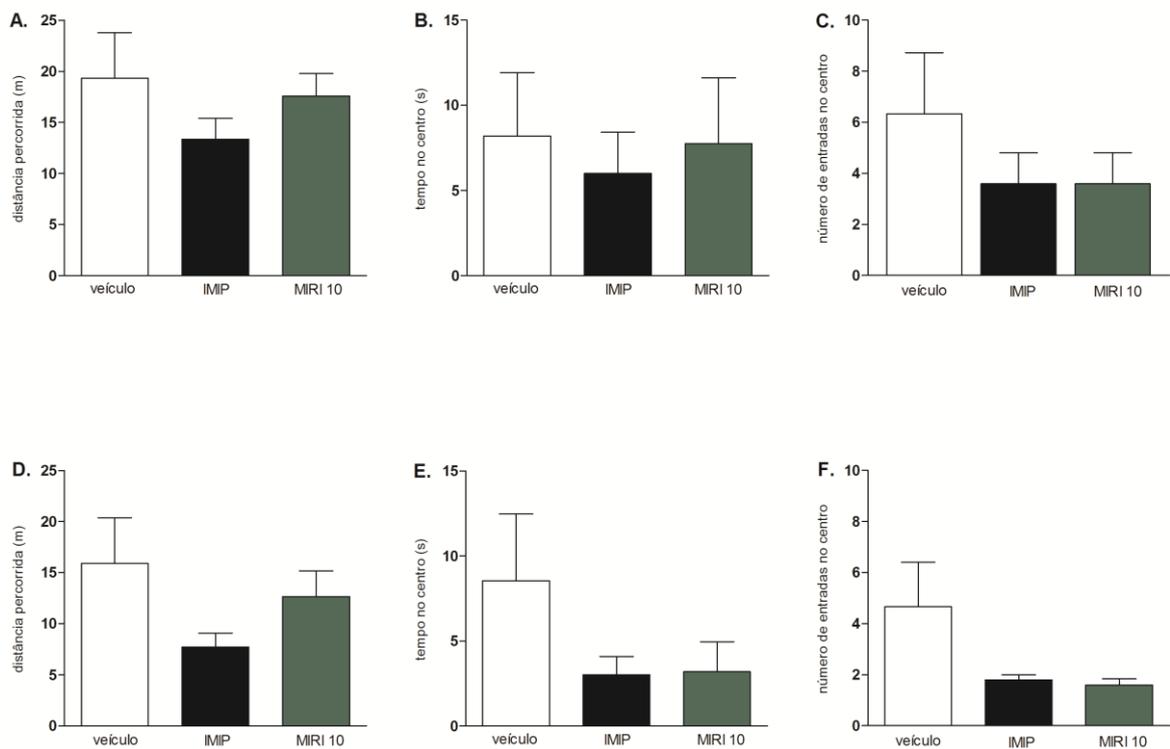


Figura 13: Tratamento repetido de 28 dias com IMIP ou MIRI 10 não alterou a atividade locomotora de camundongos submetidos ao campo aberto (CA). Os animais receberam injeções *i.p.* de veículo, IMIP ou MIRI (10 mg/Kg) durante 28 dias consecutivos. Uma hora após a última administração os camundongos foram submetidos ao CA por 5 min (12A, 12B e 12C). Vinte e quatro horas após a última administração, os camundongos foram reexpostos ao CA, novamente por 5 min (12D, 12E e 12F). As colunas representam as médias e as barras verticais os EPMS dos grupos veículo (n=6), IMIP (n=5) e MIRI 10 (n=5). (A) Distância total percorrida no CA (m), (B) tempo na zona central do CA (s), (C) número de entradas na zona central do CA. Para todos os parâmetros analisados, $p > 0,05$ (*one-way ANOVA*).

4.3.2. Teste de Suspensão pela cauda

Subsequentemente ao CA, os animais foram submetidos ao TSC. A figura 14A mostra os resultados obtidos nesse teste. ANOVA não detectou uma diferença estatística no parâmetro latência ($F_{2,15}=1,25$, $p=0,32$), e no parâmetro imobilidade nos quatro minutos finais ($F_{2,15}=0,07$, $p=0,93$).

Vinte e quatro horas após o término do tratamento repetido, e após serem reexpostos ao CA, os animais foram novamente submetidos ao TSC (Figura 14B). Nenhuma diferença estatística entre os grupos foi encontrada nos parâmetros latência ($F_{2,15}=1,11$, $p=0,36$) e imobilidade nos quatro minutos finais ($F_{2,15}=0,08$, $p=0,92$).

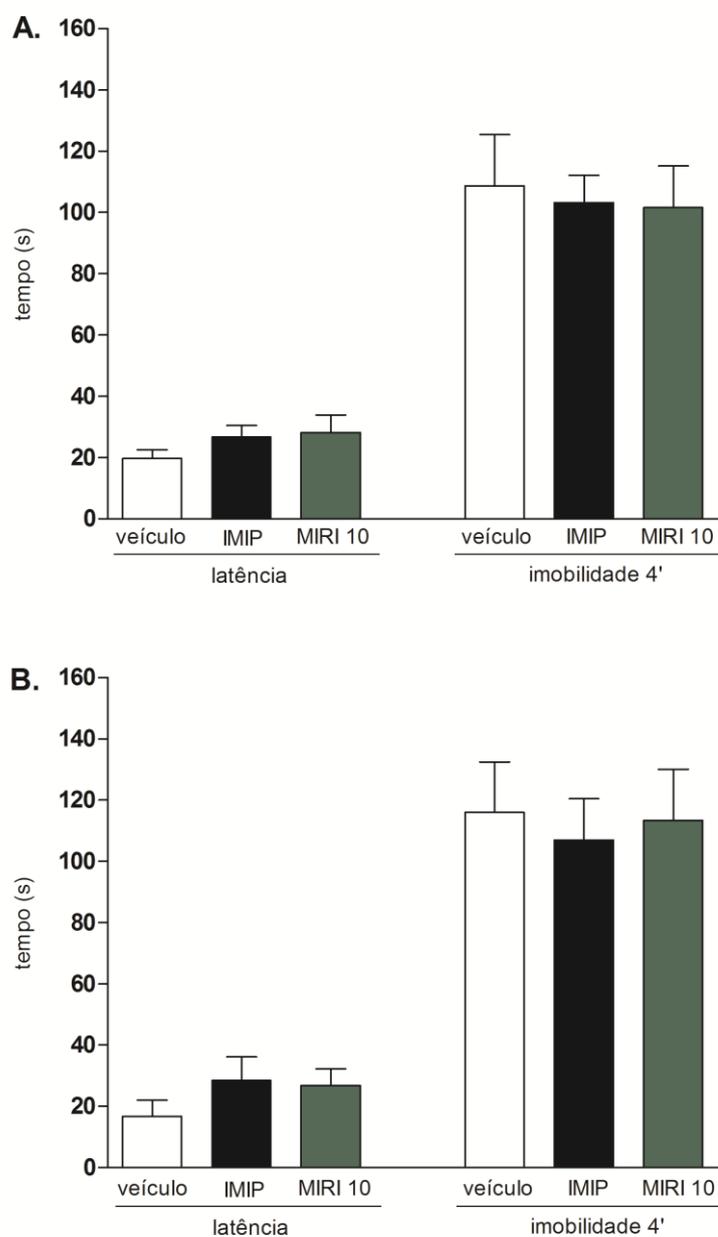


Figura 14: Tratamento repetido de 28 dias com IMIP ou MIRI 10 não alterou os tempos de latência e imobilidade de camundongos submetidos ao teste de suspensão pela cauda (TSC). Os animais receberam injeções *i.p.* de veículo, IMIP ou MIRI (10 mg/Kg) durante 28 dias consecutivos. Uma hora após a última administração, os animais foram expostos, primeiramente ao CA, e então, ao TSC por 6 min (13A). Vinte e quatro horas após a última administração, os animais foram reexpostos, primeiramente ao CA, e então, ao TSC por 6 min (13B). O tempo de latência para o primeiro episódio de imobilidade e o tempo de imobilidade nos últimos 4 min. foram registrados em segundos (s). As colunas representam as médias e as barras verticais os EPMS dos grupos veículo (n=6), IMIP (n=5) e MIRI 10 (n=5). Para todos os parâmetros analisados, $p > 0,05$ (*one-way ANOVA*).

4.4. Avaliação da proliferação celular na ZSG hipocampal e ZSV

A análise imuno-histoquímica para quantificação da proliferação foi realizada após o término do tratamento repetido de 21 dias com veículo, IMIP ou MIRI 10. Fotomicrografias representativas no GD hipocampal e da ZSV, contendo células Ki67-positivas para cada grupo experimental estão representadas na Figura 16. Conforme observado nestas figuras, os núcleos corados das células Ki67-positivas aparecem escuros e distribuídos pela camada celular da ZSG do GD hipocampal (Figura 16 A-C) e na ZSV (Figura 16 D-F), onde são tipicamente encontrados e, frequentemente, aparecem agrupados ou em *clusters*.

Comparado com o grupo veículo, o tratamento repetido com MIRI 10 causou aumento na proliferação de células Ki67-positivas no GD hipocampal (Figura 15A, $F_{2,19}=4,45$, $p=0,039$). No grupo tratado com IMIP apenas uma tendência foi observada em aumentar o número de células Ki67-positivas na ZSG, quando comparado ao grupo veículo (Figura 15A, $F_{2,19}=4,45$, $p=0,054$). Na ZSV o tratamento repetido com MIRI 10 causou aumento no número de células Ki67-positivas, quando comparado com o grupo veículo (Figura 15B, $F_{2,20}=27,11$, $p=0,0002$). Da mesma forma houve aumento significativo no número de células Ki67-positivas na ZSV no grupo IMIP, quando comparado ao grupo veículo (Figura 15B, $F_{2,20}=27,11$, $p=0,0002$).

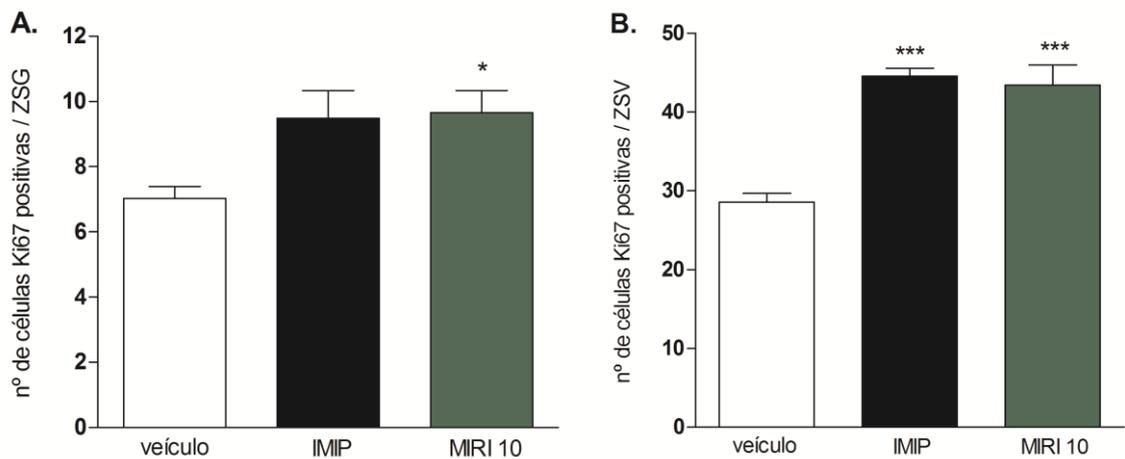


Figura 15: Tratamento repetido de 21 dias com IMIP ou MIRI 10 aumentou a proliferação celular na ZSG (A) e ZSV (B) de camundongos. Os animais receberam injeções *i.p.* de veículo, IMIP ou MIRI 10 durante 21 dias consecutivos. Logo após a análise comportamental, os animais tiveram seus cérebros adequadamente retirados e processados para a detecção imunohistoquímica de Ki67. Células positivas para Ki67 foram quantificadas por toda a extensão da ZSG (A) e ZSV (B). As colunas representam as médias e as barras verticais os EPMS dos grupos veículo (n=6), IMIP (n=7) e MIRI 10 (n=7). * $p < 0,05$ e *** $p < 0,001$ comparados ao grupo veículo (ANOVA seguida do teste *post hoc* de Tukey).

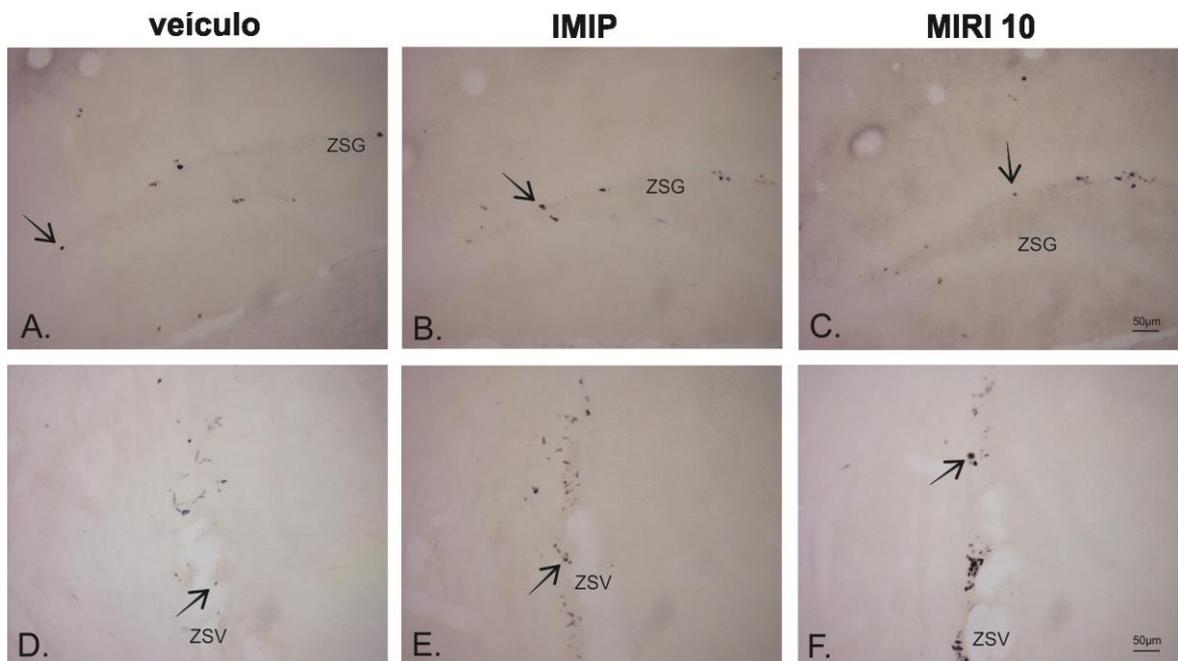


Figura 16: Fotomicrografias representativas de células Ki67-positivas. As setas indicam células Ki67-positivas na ZSG (A-C) e na ZSV (D-F), representadas no aumento de 20x.

4.5. Avaliação da neurogênese na ZSG hipocampal e ZSV

A expressão de neurônios DCX-positivos no GD do hipocampo foi utilizada para avaliar o efeito do tratamento repetido de 21 dias com veículo, IMIP ou MIRI 10 na geração de neurônios jovens (neurogênese).

Houve um aumento significativo na quantidade de neurônios DCX-positivos na ZSG do GD do grupo MIRI 10 ($F_{2,20}=8,12$, $p=0,01$) e do grupo IMIP ($F_{2,20}=8,12$, $p=0,004$), quando comparados ao grupo veículo (Figura 17A). ANOVA mostrou, ainda, aumento significativo na quantidade de neurônios DCX-positivos na ZSV do grupo IMIP ($F_{2,20}=6,15$, $p=0,0089$), quando comparado ao grupo veículo. Entretanto, apenas uma tendência em aumentar a quantidade de neurônios DCX-positivos, nessa área, foi encontrada no grupo MIRI 10 ($F_{2,20}=6,15$, $p=0,055$), quando comparado ao grupo veículo (Figura 17B).

Fotomicrografias representativas, contendo células DCX-positivas para cada grupo experimental, estão representadas da Figura 18. As fotomicrografias de A-C representam o GD hipocampal e de D-F a ZSV.

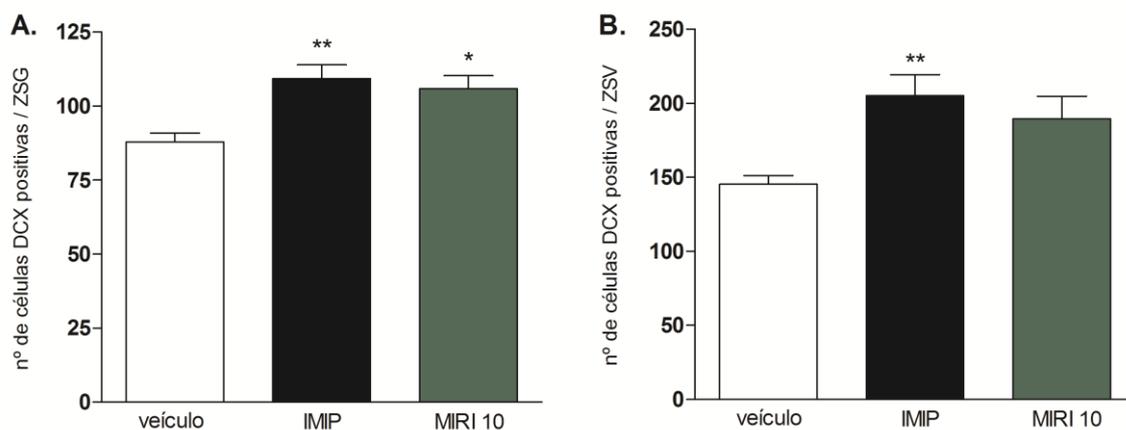


Figura 17: Tratamento repetido de 21 dias com IMIP ou MIRI 10 aumentou o número de neurônios DCX-positivos na ZSG hipocampal (A) de camundongos. Os animais receberam administração *i.p.* de veículo, IMIP ou MIRI 10 durante 21 dias consecutivos. Logo após a análise comportamental, os animais tiveram seus cérebros adequadamente retirados e processados para a detecção imunohistoquímica de DCX, um marcador de neurônios jovens, para verificação de neurogênese. Células positivas para DCX foram quantificadas por toda a extensão da ZSG (A) e ZSV (B). As colunas representam as médias e as barras verticais os EPMS dos grupos veículo (n=7), IMIP (n=7) e MIRI 10 (n=7). * $p < 0,05$ e ** $p < 0,01$ comparados ao grupo veículo (ANOVA seguida do teste *post hoc* de Tukey).

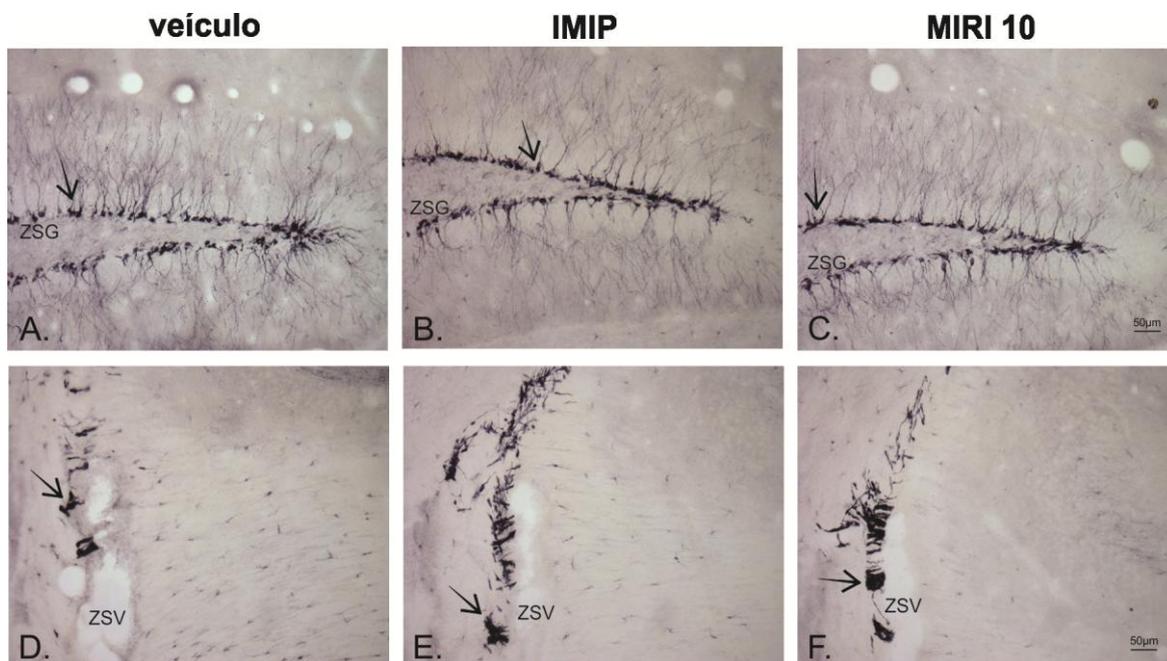


Figura 18: Fotomicrografias representativas de células DCX-positivas. As setas indicam células DCX-positivas na ZSG (A-C) e na ZSV (D-F), representadas no aumento de 20x.

4.6. Avaliação da sobrevivência celular na ZSG

Para a avaliação da sobrevivência celular os animais tratados durante 28 dias com veículo, IMIP ou MIRI 10 receberam injeção de BrdU nos 14^o, 15^o e 16^o dias. Após o término do tratamento, ou seja, 14 dias após a administração de BrdU, os animais foram sacrificados e realizou-se a análise imuno-histoquímica, com revelação colorimétrica com DAB, para quantificação das células sobreviventes que incorporaram o BrdU no seu DNA. No GD hipocampal, as células progenitoras estão localizadas na ZSG. Essas células proliferam-se e migram para a CCG do GD, onde se maturam em células granulares excitatórias e, finalmente, integram se ao circuito hipocampal. Aqui, os núcleos corados das células BrdU-positivas ainda aparecem escuros e distribuídos uniformemente pela camada celular da ZSG do GD hipocampal, onde são tipicamente encontrados e já demonstram-se arredondados, como indicativo do início da maturação e migração para a CCG, como pode ser observado na figura 20. Após a quantificação das células BrdU-positivas na ZSG, ANOVA revelou que não houve diferença significativa no número dessas células entre os grupos ($F_{2,16}=2,39$, $p>0,05$), 14 dias após a injeção de BrdU (Figura 19A).

Para a avaliação da sobrevivência celular por meio da técnica de imunofluorescência, foram analisados os mesmos tecidos, porém novas secções, utilizados na análise anterior. Aqui, os núcleos das células BrdU-positivas emitem luz em um comprimento de onda que gira em torno de 488 nm, sendo observados em verde fluorescente e distribuídos pela camada celular da ZSG do GD hipocampal (Figura 21). Da mesma forma, não houve diferença significativa no número dessas células entre os grupos ($F_{2,16}=1,14$, $p>0,05$), 14 dias após a injeção de BrdU (Figura 19B).

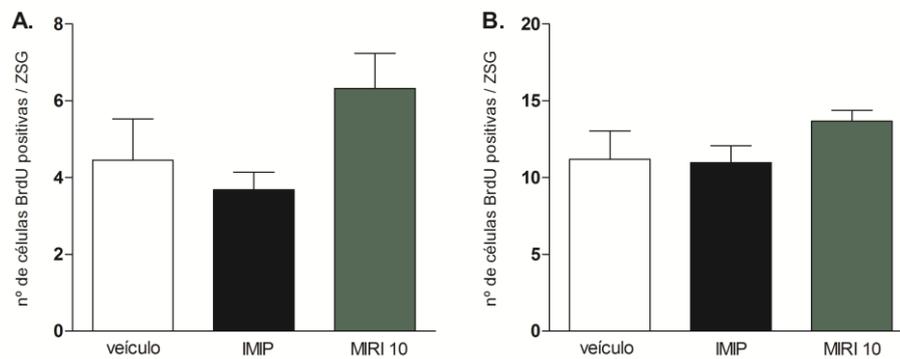


Figura 19: Tratamento repetido de 28 dias com IMIP ou MIRI 10 não aumentou a taxa de sobrevivência celular na ZSG hipocampal de camundongos, 14 dias após a injeção de BrdU, analisada por meio de imuno-histoquímica (A) e de imunofluorescência (B). Os animais receberam administração *i.p.* de veículo, IMIP ou MIRI 10 durante 28 dias. Nos dias 14^o, 15^o e 16^o do tratamento, os animais receberam injeção *i.p.* de BrdU (100 mg/Kg) durante os 3 dias consecutivos. No dia posterior ao término do tratamento os animais tiveram seus cérebros adequadamente retirados e processados para a detecção de imunorreatividade para o BrdU, para verificação da sobrevivência celular. Células positivas para BrdU foram quantificadas por toda a extensão da ZSG. As colunas representam as médias e as barras verticais os EPMS dos grupos veículo (n=6), IMIP (n=6) e MIRI 10 (n=5). Para todos os parâmetros analisados, $p > 0,05$ (*one-way ANOVA*).

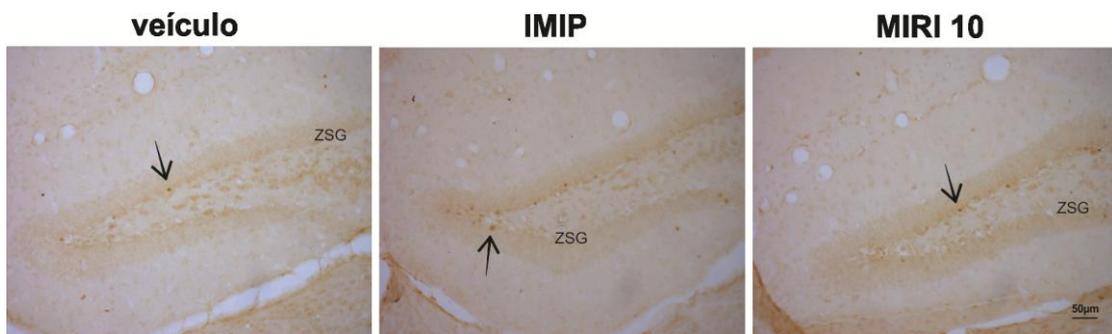


Figura 20: Fotomicrografias representativas de células BrdU-positivas no aumento de 20x. As setas indicam as células BrdU-positivas na ZSG, representadas no aumento de 20x.

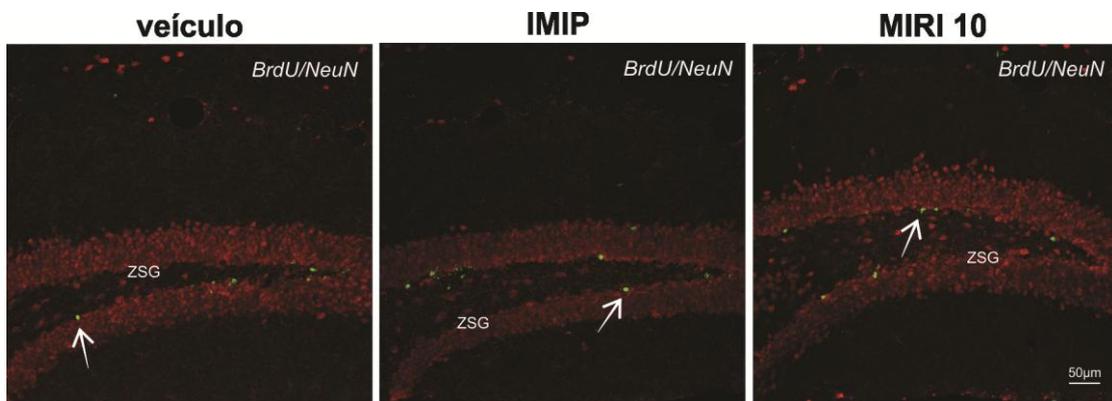


Figura 21: Fotomicrografias representativas de células BrdU-positivas no aumento de 40x. As setas indicam as células BrdU-positivas na ZSG, representadas no aumento de 20x.

4.7. Avaliação da diferenciação celular na ZSG

Para posterior análise da diferenciação celular, realizou-se a técnica de imunofluorescência para marcadores de sobrevivência celular, astrócitos e neurônios maduros (BrdU, GFAP e NeuN, respectivamente). O intuito dessa análise foi avaliar se as células sobreviventes se diferenciaram em astrócitos ou em neurônios, ou seja, se o tratamento repetido com veículo, IMIP ou MIRI 10 favoreceu a diferenciação em alguma linhagem neuronal específica.

Como pode ser observado nas figuras 23A, 23F e 23K os núcleos das células BrdU-positivas emitem luz em um comprimento de onda que gira em torno de 488 nm, emitindo luz verde fluorescente e distribuídos uniformemente pela camada celular da ZSG do GD hipocampal. Os astrócitos são visualizados na cor vermelha e emitem luz em um comprimento de onda de cerca de 594 nm. Essas células apresentam-se distribuídas por todo o GD, o que pode ser evidenciado nas figuras 23B, 23G e 23L.

Os neurônios maduros são observados nas figuras 23C, 23H e 23M na cor azul, referente ao comprimento de onda em torno de 647 nm, constituindo a CCG que compõe o giro denteado. Por fim, as figuras 23D, 23L e 23N representam as três marcações, simultaneamente, nos diferentes grupos de tratamento, no aumento de 20x, enquanto as figuras 23E, 23J e 23O representam essas marcações no aumento de 40x.

Após a quantificação das células BrdU/NeuN-positivas na ZSG, 14 dias após a injeção de BrdU, ANOVA revelou que houve um aumento significativo no número dessas células duplamente marcadas no grupo MIRI ($F_{2,16}=25,90$, $p=0,0002$) e no grupo IMIP ($F_{2,16}=25,90$, $p=0,0004$), quando comparados ao grupo veículo (Figura 22).

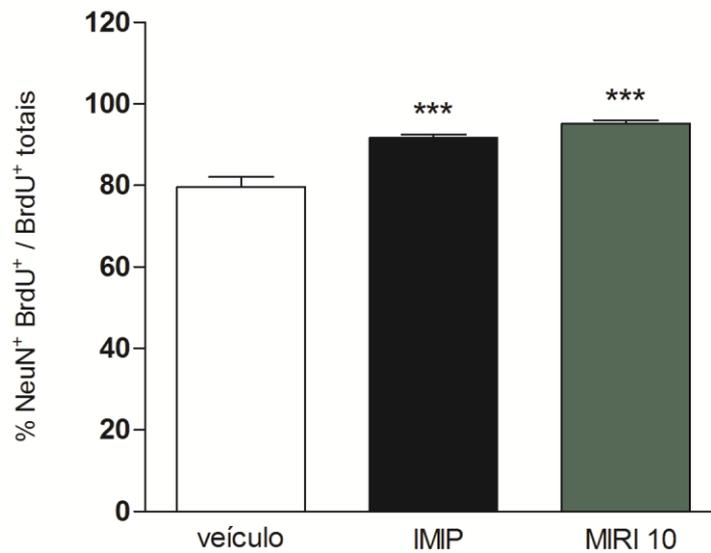


Figura 22: Tratamento repetido de 28 dias com IMIP ou MIRI 10 aumentou a geração de novos neurônios na ZSG hipocampal de camundongos, 14 dias após a injeção de BrdU, analisada por meio de imunofluorescência. Os animais receberam administração *i.p.* de veículo, IMIP ou MIRI 10 durante 28 dias. Nos dias 14^o, 15^o e 16^o do tratamento, os animais receberam injeção *i.p.* de BrdU (100 mg/Kg) durante os 3 dias consecutivos. No dia posterior ao término do tratamento os animais tiveram seus cérebros adequadamente retirados e processados para a detecção de imunorreatividade para o BrdU, GFAP e NeuN para verificação da diferenciação celular. Células duplamente positivas para BrdU e NeuN e para BrdU e GFAP foram quantificadas por toda a extensão da ZSG. As colunas representam as médias e as barras verticais os EPMS dos grupos veículo (n=6), IMIP (n=6) e MIRI 10 (n=5). ***p<0,001 comparado ao grupo veículo (ANOVA seguida do teste *post hoc* de Tukey).

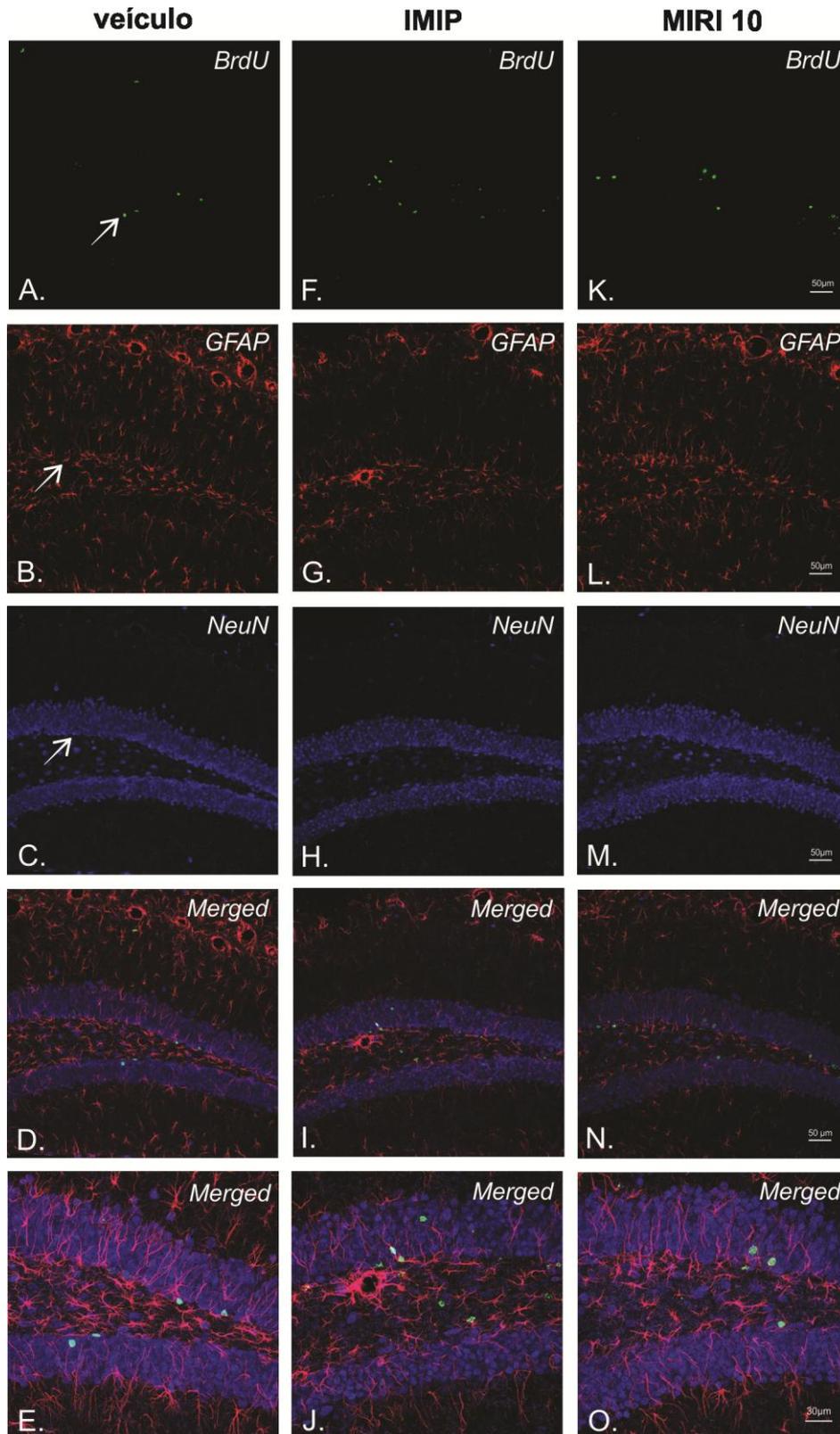


Figura 234: Fotomicrografias representativas de células BrdU, GFAP e NeuN-positivas. As setas indicam as células BrdU-positivas (A, F e K), GFAP-positivas (B, G e L) e NeuN-positivas (C, H e M) na ZSG, nos diferentes grupos de tratamento. As fotomicrografias D, I e N representam as três marcações simultâneas, no aumento de 20x e as fotomicrografias E, J e O no aumento de 40x.

5. Discussão

A MIRI, um composto que apresenta um perfil de antipsicótico atípico (Pereira et al., 2011), foi analisada em relação à sua possível atividade antidepressiva, por meio do TSC, e ao seu impacto sobre a neurogênese adulta em roedores.

Anteriormente ao TSC os animais foram submetidos ao teste do CA, no intuito de avaliar a sua atividade locomotora. Esse teste é bem validado, e permite verificar se o tempo de imobilidade apresentado pelos animais no TSC foi decorrente de alterações na locomoção, causadas pela dose dos tratamentos aplicados. Como não foi observada diferença de locomoção, analisada no CA, entre os grupos tratados com IMIP e MIRI em relação ao grupo tratado com veículo, pôde-se constatar que as doses utilizadas para ambas as drogas não prejudicam a atividade locomotora, não causando interferência no TSC (Walsh & Cummins, 1976; Pereira et al., 2011).

O TSC consiste em um dos mais antigos testes para se avaliar atividade antidepressiva de drogas, apresentando boa validade preditiva (Cryan et al., 2002). Sua premissa é de que em situação de estresse inescapável os animais adquirem uma postura de imobilidade, que é reduzida por drogas com atividade antidepressiva, sendo que maior tempo de imobilidade é tomado como comportamento tipo-depressivo (Ripoll et al., 2003; Varty et al., 2003).

No TSC realizado uma hora após o tratamento a MIRI não foi eficaz em diminuir o tempo de imobilidade dos animais nos quatro minutos finais do teste. É provável que a administração i.p. diária por 21 dias, tenha gerado estresse e desconforto aos animais, influenciando de forma negativa a resposta destes ao teste. Além disso, o comportamento dos animais uma hora após as injeções reflete o efeito agudo das drogas e não o efeito residual do tratamento. Já o resultado do TSC realizado vinte e quatro horas após o tratamento demonstrou eficácia da IMIP (usada como controle positivo) e MIRI em diminuir o tempo de imobilidade dos animais nos quatro minutos finais do teste. Levando em conta que um dos mecanismos de ação proposto para a MIRI seja a inibição da nNOS, nossos resultados estão de acordo com diversos trabalhos que demonstram o papel do NO na neurobiologia da depressão, bem como no efeito antidepressivo de algumas drogas disponíveis. Hoje se sabe que a serotonina e a dopamina são moduladas pelo NO (Fossier et al., 1999; Wegener et al., 2000), já que a administração local ou

sistêmica de inibidores da nNOS aumentam a concentração extracelular desses neurotransmissores no hipocampo ventral de roedores, uma das áreas mais envolvidas com a patofisiologia da depressão (Volke et al., 2003). Quando o precursor de NO, L- Arg, é administrado, em roedores, observa-se o efeito oposto, sendo, então, demonstrado que o NO endógeno age como um controle negativo sobre os níveis de serotonina e dopamina no hipocampo (Harkin et al., 2003; Dhir et al., 2011). Além das evidências citadas, encontradas em estudos com animais, é importante ressaltar que estudos em humanos mostraram que o nível plasmático de metabólitos do NO em pacientes depressivos suicidas foi significativamente maior do que em indivíduos controle (Suzuki et al., 2001; Harkin et al., 2004; Lee et al., 2006).

Além de sua ação sobre a síntese de NO, outro mecanismo de ação proposto para a MIRI é a inibição da fosforilação da PKC, e consequente inibição de sua ativação (Meotti et al., 2006a). Levando em consideração que enzimas como a PKC podem modular a fosforilação/defosforilação de receptores NMDA, a MIRI poderia atuar indiretamente, diminuindo a fosforilação dos receptores NMDA e, com isso, diminuir a produção de NO, uma vez que a produção de NO está ligada ao influxo de Ca^{+2} por esses receptores (Cheng & Huang, 1992). Esses mecanismos de ação propostos para a MIRI poderiam explicar, pelo menos em parte, o efeito tipo-antidepressivo gerado no TSC, após administração repetida dessa substância.

Já no tratamento repetido de 28 dias não foi possível observar o mesmo efeito, tanto no grupo tratado com IMIP como no grupo tratado com MIRI, provavelmente devido a grande variabilidade de resposta dos animais. A administração i.p. diária de 28 dias juntamente com as injeções adicionais de BrdU pode ter gerado estresse nos animais, o que influencia a resposta destes aos testes, como ocorrido no TSC uma hora após o tratamento.

Em relação ao impacto do tratamento repetido sobre a proliferação celular, nossos dados mostraram que houve aumento das células Ki67-positivas na ZSG do GD hipocampal no grupo tratado com MIRI, quando comparado com o veículo, enquanto no grupo tratado com IMIP uma tendência foi observada. Um aumento significativo na proliferação foi encontrado nos grupos tratados com IMIP ou MIRI, quando se analisou a ZSV dos ventrículos laterais. Vale ressaltar, que o Ki67 não consiste em um marcador para um fenótipo celular específico, ou seja, as células

Ki67-positivas não possuem, necessariamente, um fenótipo neuronal comprometido, não se diferenciando, necessariamente, em neurônios. Como a ZSV consiste em uma área extremamente ativa em roedores, é possível que a proliferação celular nesse nicho seja mais intensa do que na ZSG. É provável, ainda, que a administração i.p. diária por 21 dias, tenha causado estresse e desconforto aos animais, influenciando negativamente a proliferação celular na ZSG. O estresse é conhecido por elevar os níveis circulantes de esteróides suprarrenais e estimular a liberação de glutamato na formação do hipocampo (De Bruin et al., 1990; Moghaddam B, 1993). Estudos em animais e em primatas mostraram que esses hormônios, secretados em resposta ao estresse, suprimem a proliferação de células precursoras granulares hipocampais de ratos e de primatas durante o desenvolvimento e na fase adulta (Gould & Cameron, 1996; Gould et al., 1998). Assim, a supressão da proliferação celular, induzida pelo estresse, pode envolver fatores hormonais e neurais. Em conjunto com outros dados sobre a resposta da formação do hipocampo de ratos e primatas para situações de estresse, estudos sugerem que a inibição na produção de neurônios granulares durante a idade adulta, resultante de experiências estressantes, pode ser comum a muitas espécies, incluindo humanos (Gould et al., 1998).

Em relação à neurogênese, ambos os tratamentos (IMIP e MIRI) foram efetivos em aumentar o número de células DCX-positivas na ZSG do GD hipocampal. Já na ZSV, somente o tratamento com a IMIP levou ao aumento da neurogênese. O resultado para o tratamento com a IMIP está de acordo com diversos trabalhos que demonstram que o tratamento crônico com ADs de várias classes, incluindo os tricíclicos, como a imipramina e os inibidores seletivos de recaptção da serotonina (ISRS), como a fluoxetina, aumentam o número de células progenitoras no hipocampo de roedores (Malberg et al., 2000; Santarelli et al., 2003; Sairanen et al., 2005; Sairanen et al., 2007; Chen et al., 2010). Em relação ao tratamento repetido com a MIRI, nossos resultados estão de acordo com estudos, que mostraram aumento na neurogênese hipocampal após tratamento repetido com antipsicóticos atípicos (Wang et al., 2004; Halim et al., 2004). Segundo Kodama et al., 2004, a administração repetida de 28 dias do antipsicótico atípico olanzapina aumentou a neurogênese na ZSG hipocampal, sendo que este aumento não foi

observado na ZSV. Esses resultados suportam os achados obtidos com o tratamento repetido com a MIRI.

Para analisar as fases mais tardias da neurogênese foi utilizado o marcador BrdU. Como este possui a propriedade de integrar-se ao DNA da célula e permanecer retido por toda a vida, é possível estimar o tempo de sobrevivência das células que o incorporaram e traçar a linhagem celular destas (célula glial ou neurônio). Nesse sentido, com o objetivo de determinar os efeitos da MIRI sobre a sobrevivência das células em proliferação, a expressão de BrdU foi investigada após o tratamento de 28 dias e 14 dias após a injeção de BrdU. No entanto, nenhuma diferença significativa entre os grupos tratados com IMIP, MIRI ou veículo foi observada. Vale ressaltar que, quantitativamente, a regulação na neurogênese ocorre, principalmente, na fase do desenvolvimento neuronal, e não na fase de expansão, como se assume frequentemente (Kempermann et al., 2006). Isso baseia-se no fato de que a proliferação de células precursoras gera um grande número de novos neurônios, mas apenas uma pequena proporção sobrevive durante longos períodos de tempo (Kempermann et al., 2003). Aparentemente as células que sobrevivem às primeiras 2 semanas serão integradas, estavelmente, ao circuito do giro dentado por um longo período de tempo. Depois dessa fase, apenas pequenas alterações no número de células ocorre. Uma consequência desta observação é que a neurogênese adulta, ao longo da vida, contribui para o crescimento do giro denteado e não substitui as células mais velhas (Crespo et al., 1986).

Em uma última etapa da investigação sobre a influência do tratamento com a MIRI sobre a neurogênese, analisou-se a diferenciação das células BrdU-positivas sobreviventes, 14 dias após a última administração de BrdU. A identificação fenotípica das células marcadas com BrdU foi realizada por meio da técnica de tripla marcação imunofluorescente com marcadores específicos, o NeuN e o GFAP. Os resultados obtidos mostraram o aumento da neurogênese nos grupos tratados com MIRI e IMIP, quando comparados com o grupo veículo. Esse aumento é evidenciado pelo alto número de células BrdU-positivas expressando o marcador de neurônios maduros NeuN, demonstrando, dessa forma, que a administração repetida de MIRI ou IMIP exerce um efeito pró-neurogênico. Esse resultado está de acordo com o

trabalho de Campos e colaboradores (2013), onde a administração repetida do Canabidiol, uma substância com perfil de antipsicótico atípico, apresentou semelhante efeito pró-neurogênico, em camundongos. Corroborando esses resultados, a administração repetida de 28 dias do antipsicótico atípico olanzapina aumentou a neurogênese na ZSG hipocampal, com a maioria das células sobreviventes diferenciando-se em neurônios no hipocampo (Kodama et al., 2004; Samuel et al., 2004).

Dessa maneira, nossos resultados indicam que a MIRI apresenta propriedade tipo-antidepressiva, e que além de sua ação de inibição sobre a PKC e sobre a síntese do NO, esses efeitos obtidos podem estar relacionados com a capacidade dessa substância em aumentar a neurogênese hipocampal em camundongos.

Entretanto, neste estudo não avaliamos a toxicidade (aguda ou crônica) da MIRI. Dessa forma, estudos adicionais devem ser conduzidos para avaliar a segurança do uso dessa substância.

6. Conclusão

O presente trabalho mostrou que o tratamento repetido com a MIRI apresentou um efeito tipo-antidepressivo, quando avaliado no TSC, sem, entretanto, alterar a atividade locomotora dos animais, analisada no CA.

Observou-se também a capacidade dessa substância em aumentar a geração de novos neurônios no hipocampo de camundongos, uma área relacionada à fisiopatologia da depressão.

Nossos dados suportam a idéia de que a MIRI é um bom alvo de estudo para a produção de um novo fármaco com atividade antidepressiva.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Abelaira HM, Réus GZ, Quevedo J. Animal models as tools to study the pathophysiology of depression. *Revista Brasileira de Psiquiatria*; 35:112-120; 2013.

Alonso M, Viollet C, Gabellec MM, Meas-Yedid V, Olivo-Marin JC, Lledo PM. Olfactory discrimination learning increases the survival of adult-born neurons in the olfactory bulb. *The Journal of Neuroscience*; 26(41):10508-10513; 2006.

Altman J, Das GD. Autoradiographic and histological evidence of postnatal hippocampal neurogenesis in rats. *The Journal of Comparative Neurobiology*; 124(3):319–335; 1965.

Alvarez-Buylla A, García-Verdugo JM. Neurogenesis in the adult subventricular zone. *The Journal of Neuroscience*; 22(3):629-634; 2002.

Anand A, Charney DS. Norepinephrine dysfunction in synapse in depression. *Journal of Clinical Psychiatry*; 61(10):16-24; 2000.

Bannerman DM, Rawlins JN, McHugh SB, Deacon RM, Yee BK, Bast T, Zhang WN, Pothuizen HH, Feldon J. Regional dissociations within the hippocampus--memory and anxiety. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*; 28(3):273-283; 2004.

Barbee JG, Conrad EJ, Jamhour NJ. The effectiveness of olanzapine, risperidone, quetiapine, and ziprasidone as augmentation agents in treatment-resistant major depressive disorder. *The Journal of Clinical Psychiatry*; 65(7):975-981; 2004.

Bergmann O, Liebl J, Bernard S, Alkass K, Yeung MS, Steier P, Kutschera W, Johnson L, Landen M, Druid H, Spalding KL, Frisen J. The age of olfactory bulb neurons in humans. *Neuron*; 74(4):634–639; 2012.

Berman RM, Narasimhan M, Charney DS. Treatment-refractory depression: definitions and characteristics. *Depression and Anxiety*; 5(4):154–164; 1997.

Bernstein HG, Bogerts B, Keilhoff G. The many faces of nitric oxide in schizophrenia: a review. *Schizophrenia Research*; 78(1):69–86; 2005.

Birt DF, Hendrich S, Wang W. Dietary agents in cancer prevention: flavonoids and isoflavonoids. *Pharmacology & Therapeutics*; 90:157–177; 2001.

Bonaguidi MA, Wheeler MA, Shapiro JS, Stadel RP, Sun GJ, Ming GL, Song H. In vivo clonal analysis reveals selfrenewing and multipotent adult neural stem cell characteristics. *Cell*; 145(7):1142–1155; 2011.

Bonhomme N, Esposito E. Involvement of serotonin and dopamine the mechanism of antidepressant drugs - review. *Journal of Clinical Psychopharmacology*; 18(6): 447-454; 1998.

Boockvar JA, Kapitonov D, Kapoor G, Schouten J, Counelis GJ, Bogler O, Snyder EY, McIntosh TK, O'Rourke DM. Constitutive EGFR signaling confers a motile phenotype to neural stem cells. *Molecular and Cellular Neurosciences*; 24(4):1116-1130; 2003.

Braun SMG, Jessberger S. Adult neurogenesis: mechanisms and functional significance. *The Company of Biologists*; 141:1983-1986; 2014.

Bredt DS & Snyder SH. Isolation of nitric oxide synthetase, a calmodulin-requiring enzyme. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA*; 87(2):682-685; 1990.

Bredt DS. Nitric oxide signaling specificity - the heart of the problem. *Journal of the Cell Science*; 116:9-15; 2003.

Brill MS, Ninkovic J, Winpenny E, Hodge RD, Ozen I, Yang R, Lepier A, Gascon S, Erdelyi F, Szabo G, Parras C, Guillemot F, Frotscher M, Berninger B, Hevner RF, Raineteau O, Götz M. Adult generation of glutamatergic olfactory bulb interneurons. *Nature Neuroscience*; 12(12):1524–1533; 2009.

Bruel-Jungerman E, Laroche S, Rampon C. New neurons in the dentate gyrus are involved in the expression of enhanced long-term memory following environmental enrichment. *The European Journal of Neuroscience*; 21(2):513-521; 2005.

Cameron HA, McKay RD. Adult neurogenesis produces a large pool of new granule cells in the dentate gyrus. *The Journal of Comparative Neurology*; 435(4):406-417; 2001.

Campos AC, Ortega Z, Palazuelos J, Fogaça MV, Aguiar DC, Díaz-Alonso J, Ortega-Gutiérrez S, Vázquez-Villa H, Moreira FA, Guzmán M, Galve-Roperh I, Guimarães FS. The anxiolytic effect of cannabidiol on chronically stressed mice depends on hippocampal neurogenesis: involvement of the endocannabinoid system. *The International Journal of Neuropsychopharmacology*; 16(6):1407-1419; 2013.

Carleton A, Petreanu LT, Lansford R, Alvarez-Buylla A, Lledo PM. Becoming a new neuron in the adult olfactory bulb. *Nature Neuroscience*; 6(5):507–518; 2003.

Ceylan NÖ, Cimenci IG, Kilincaslan A, Bülbül F, Savas HA. Alterations in nitric oxide plasma level and arginase activity during the treatment of bipolar depressive episode. *Journal of Mood Disorders*; 1(1):1-6; 2011.

Chen L, Huang LY. Protein kinase C reduces Mg²⁺ block of NMDA receptor channels as a mechanism of modulation. *Nature*; 356:521-523; 1992.

Chen R, Furman CA, Zhang M, Kim MN, Gereau RW, Leitges M, Gnegy ME. Protein Kinase C β is a critical regulator of dopamine transporter trafficking and regulates

the behavioral response to amphetamine in mice. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*; 328(3):912–920; 2009.

Chen F, Madsen TM, Wegener G, Nyengaard JR. Imipramine treatment increases the number of hippocampal synapses and neurons in a genetic animal model of depression. *Hippocampus*; 20(12):1376-1384; 2010.

Coras R, Siebzehnrubl FA, Pauli E, Huttner HB, Njunting M, Kobow K, Villmann C, Hahnen E, Neuhuber W, Weigel D, Buchfelder M, Stefan H, Beck H, Steindler DA, Blumcke I. Low proliferation and differentiation capacities of adult hippocampal stem cells correlate with memory dysfunction in humans. *Brain*; 133(11):3359-3372; 2010.

Crespo D, Stanfield BB, Cowan WM. Evidence that late-generated granule cells do not simply replace earlier formed neurons in the rat dentate gyrus. *Experimental Brain Research*; 62(3):541-548; 1986.

Cryan JF, Markou A, Lucki I. Assessing antidepressant activity in rodents: recent developments and future needs. *Trends in Pharmacological Sciences*; 23(5):238-245; 2002.

Curtis MA, Kam M, Nannmark U, Anderson MF, Axell MZ, Wikkelso C, Holtas S, van Roon-Mom WM, Bjork-Eriksson T, Nordborg C, Frisen J, Dragunow M, Faull RL, Eriksson PS. Human neuroblasts migrate to the olfactory bulb via a lateral ventricular extension. *Science*; 315:1243–9; 2007.

Czéh B, Michaelis T, Watanabe T, Frahm J, de Biurrun G, van Kampen M, Bartolomucci A, Fuchs E. Stress-induced changes in cerebral metabolites, hippocampal volume, and cell proliferation are prevented by antidepressant treatment with tianeptine. *Proceedings of the National Academy of Science of the USA*; 98(22):12796-12801; 2001.

Dayer AG, Ford AA, Cleaver KM, Yassaee M, Cameron HA. Short-term and long-term survival of new neurons in the rat dentate gyrus. *The Journal of Comparative Neurology*; 460(4):563-572; 2003.

Dayer AG, Cleaver KM, Abouantoun T, Cameron HA. New GABAergic interneurons in the adult neocortex and striatum are generated from different precursors. *The Journal of Cell Biology*; 168(3):415–427; 2005.

De Bruin LA, Schasfoort EM, Steffens AB, Korf J. Effects of stress and exercise on rat hippocampus and striatum extracellular lactate. *The American Journal of Physiology*; 259(4 Pt 2):R773-779; 1990.

de Chevigny A, Core N, Follert P, Wild S, Bosio A, Yoshikawa K, Cremer H, Beclin C. Dynamic expression of the pro-dopaminergic transcription factors Pax6 and Dlx2 during postnatal olfactory bulb neurogenesis. *Frontiers in Cellular Neuroscience*; 6:6; 2012.

Del Bel EA, Guimarães FS. Sub-chronic inhibition of nitric-oxide synthesis modifies haloperidol-induced catalepsy and the number of NADPH-diaphorase neurons in mice. *Psychopharmacology*; 147:356-361; 2000.

Deng W, Aimone JB, Gage F H. New neurons and new memories: how does adult hippocampal neurogenesis affect learning and memory? *Nature Reviews. Neuroscience*. 11(5): 339-350; 2010.

Dhir A, Kulkarni SK. Nitric oxide and major depression. *Nitric Oxide*; 24(3):125-131; 2011.

DSM-V Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders. American Psychiatric Association: Washington, DC. 2014.

Doetsch F, Caille I, Lim DA, Garcia-Verdugo JM, Alvarez-Buylla A. Subventricular zone astrocytes are neural stem cells in the adult mammalian brain. *Cell*; 97(6):703–716; 1999.

Eckenhoff MF, Rakic P. Nature and fate of proliferative cells in the hippocampal dentate gyrus during the life span of the rhesus monkey. *The Journal of Neuroscience*; 8(8):2729–2747; 1988.

Encinas JM, Michurina TV, Peunova N, Park JH, Tordo J, Peterson DA, Fishell G, Koulakov A, Enikolopov G. Division-coupled astrocytic differentiation and age-related depletion of neural stem cells in the adult hippocampus. *Cell Stem Cell*; 8(5):566–579; 2011.

Eriksson PS, Perfilieva E, Björk-Eriksson T, Alborn AM, Nordborg C, Peterson DA, Gage FH. Neurogenesis in the adult human hippocampus. *Nature Medicine*; 4:1313–1317; 1998.

Esplugues JV. NO as a signaling molecule in the nervous system. *British Journal of Pharmacology*; 135(5):1079-1095; 2002.

Fava M. Diagnosis and definition of treatment-resistant depression. *Biological Psychiatry*; 53(8):649–659; 2003.

Favaro R, Valotta M, Ferri AL, Latorre E, Mariani J, Giachino C, Lancini C, Tosetti V, Ottolenghi S, Taylor V, Nicolis SK. Hippocampal development and neural stem cell maintenance require Sox2-dependent regulation of Shh. *Nature Neuroscience*; 12:1248-1256; 2009.

Fernandez SP, Nguyen M, Yow TT, Chu C, Johnston GAR, Hanrahan JR, Chebib M. The flavonoid glycosides, myricitrin, gossypin and naringin exert anxiolytic action in mice. *Neurochemical Research*; 34:1867-1875; 2009.

Fossier P, Blanchard B, Ducrocq C, Leprince C, Tauc L, Baux G. Nitric oxide transforms serotonin an inactive form and this affects neuromodulation. *Neuroscience*; 93(2):597-603; 1999.

Francis F, Koulakoff A, Boucher D, Chafey P, Schaar B, Vinet MC, Friocourt G, McDonnell N, Reiner O, Kahn A, McConnell SK, Berwald-Netter Y, Denoulet P, Chelly J. Doublecortin is a developmentally regulated, microtubule-associated protein expressed in migrating and differentiating neurons. *Neuron*; 23(2):247–256; 1999.

Franklin KBJ, Paxinos G. *The Mouse Brain in Stereotaxic Coordinates*. 2.ed. San Diego: *Editora Academic Press*; 1997.

Gage F. Mammalian neural stem cells. *Science*; 287(5457):1433–1438; 2000.

Garcia AD, Doan NB, Imura T, Bush TG, Sofroniew MV. GFAP-expressing progenitors are the principal source of constitutive neurogenesis in adult mouse forebrain. *Nature Neuroscience*; 7(11):1233–1241; 2004.

Garthwaite J, Charles SL, Chess-Williams R. Endothelium-derived relaxing factor release on activation of NMDA receptors suggests role as intercellular messenger in the brain; *Nature*; 336:385–388; 1988.

Gleeson JG, Lin PT, Flanagan LA, Walsh CA. Doublecortin is a microtubule-associated protein and is expressed widely by migrating neurons. *Neuron*; 23(2):257-271; 1999.

Gould E, Cameron HA. Regulation of neuronal birth, migration and death in the rat dentate gyrus. *Developmental Neuroscience*; 18(1-2):22-35; 1996.

Gould E, Tanapat P, McEwen BS, Flügge G, Fuchs E. Proliferation of granule cell precursors in the dentate gyrus of adult monkeys is diminished by stress. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA*; 95(6):3168-3171; 1998.

Gould E, Reeves AJ, Fallah M, Tanapat P, Gross CG, Fuchs E. Hippocampal neurogenesis in adult old world primates. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA*; 96(9):5263–5267; 1999a.

Gould E, Reeves AJ, Graziano MS, Gross CG. Neurogenesis in the neocortex of adult primates. *Science*; 286(5439):548–552; 1999b.

Gould E, Beylin A, Tanapat P, Reeves A, Shors TJ. Learning enhances adult neurogenesis in the hippocampal formation. *Nature Neuroscience*; 2(3):260-265; 1999c.

Gould E, Vail N, Wagers M, Gross CG. Adult-generated hippocampal and neocortical neurons in macaques have a transient existence. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA*; 98(19):10910–10917; 2001.

Guix FX, Uribealago I, Coma M, Muñoz FJ. The physiology and pathophysiology of nitric oxide in the brain. *Progress in neurobiology*; 76(2):126-152; 2005.

Halim ND, Weickert CS, McClintock BW, et al. Effects of chronic haloperidol and clozapine treatment on neurogenesis in the adult rat hippocampus. *Neuropsychopharmacology*; 29(6):1063–1069; 2004.

Harkin AJ, Bruce KH, Craft B, Paul IA. Nitric oxide synthase inhibitors have antidepressant-like properties in mice. 1. Acute treatments are active in the forced swim test. *European Journal of Pharmacology*; 372(3):207–213; 1999.

Harkin A, Connor TJ, Walsh M, St John N, Kelly JP. Serotonergic mediation of the antidepressant-like effects of nitric oxide synthase inhibitors. *Neuropharmacology*; 44(5):616-623; 2003.

Harkin A, Connor TJ, Burns MP, Kelly JP. Nitric oxide synthase inhibitors augment the effects of serotonin re-uptake inhibitors in the forced swimming test. *European Neuropsychopharmacology*; 14(4):575-580; 2004.

Hirschfeld RM. History and evolution of the monoamine hypothesis of depression. *The Journal of Clinical Psychiatry*; 61(6):4-6; 2000.

Jacobs BL, van Praag H, Gage FH. Adult brain neurogenesis and psychiatry: a novel theory of depression. *Molecular Psychiatry*; 5(3):262-269; 2000.

Kaehler ST, Singewald N, Sinner C, Philippu A. Nitric oxide modulates the release of serotonin in the rat hypothalamus. *Brain Research*; 835:346–349; 1999.

Karalay O, Doberauer K, Vadodaria KC, Knobloch M, Berti L, Miquelajauregui A, Schwark M, Jagasia R, Taketo MM, Tarabykin V, Lie DC, Jessberger S. Prospero-related homeobox 1 gene (Prox1) is regulated by canonical Wnt signaling and has a stage-specific role in adult hippocampal neurogenesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA*; 108:5807–5812; 2011.

Kawai T, Takagi N, Miyake-Takagi K, Okuyama N, Mochizuki N, Takeo S. Characterization of BrdU-positive neurons induced by transient global ischemia in adult hippocampus. *Journal of Cerebral Blood Flow and Metabolism*; 24(5):548–555; 2004.

Kee N, Sivalingam S, Boonstra R, Wojtowicz JM. The utility of Ki-67 and BrdU as proliferative markers of adult neurogenesis. *Journal of Neuroscience Methods*; 115:97-105; 2002.

Kempermann G, Kuhn HG, Gage FH. More hippocampal neurons in adult mice living in an enriched environment. *Nature*; 386(6624):493–495; 1997.

Kempermann G, Gage FH. Neurogenesis in the adult hippocampus. *Novartis Foundation Symposium*; 231:220-235; 2000.

Kempermann G, Gage FH. Genetic influence on phenotypic differentiation in adult hippocampal neurogenesis. *Brain research. Development of Brain Research*; 134(1-2):1-12; 2002.

Kempermann G, Gast D, Kronenberg G, Yamaguchi M, Gage FH. Early determination and long-term persistence of adult-generated new neurons in the hippocampus of mice. *Development*; 130(2):391-399; 2003.

Kempermann G, Chesler EJ, Lu L, Williams RW, Gage FH. Natural variation and genetic covariance in adult hippocampal neurogenesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA*; 103(3):780-785; 2006.

Kempermann G, Song H, Gage FH. Neurogenesis in the adult hippocampus. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*; 5(7); 2015.

Knobloch M, von Schoultz C, Zurkirchen L, Braun SM, Vidmar M, Jessberger S. SPOT14-positive neural stem/progenitor cells in the hippocampus respond dynamically to neurogenic regulators. *Stem Cell Reports*. 3(5):735-742; 2014.

Knoth R, Singec I, Ditter M, Pantazis G, Capetian P, Meyer RP, Horvat V, Volk B, Kempermann G. Murine features of neurogenesis in the human hippocampus across the lifespan from 0 to 100 years. *PLoS One*; 5(1):e8809; 2010.

Kodama M, Fujioka T, Duman RS. Chronic olanzapine or fluoxetine administration increases cell proliferation in hippocampus and prefrontal cortex of adult rat. *Biological Psychiatry*; 56(8):570–580; 2004.

Krishnan V, Nestler EJ. The molecular neurobiology of depression. *Nature*; 455:894-902; 2008.

Kuhn HG, Dickinson-Anson H, Gage FH. Neurogenesis in the dentate gyrus of the adult rat: age-related decrease of neuronal progenitor proliferation. *Journal of Neuroscience*; 16(6):2027–2033; 1996.

Lee BH, Lee SW, Yoon D, Lee HJ, Yang JC, Shim SH, Kim DH, Ryu SH, Han C, Kim YK. Increased plasma nitric oxide metabolites in suicide attempters. *Neuropsychobiology*; 53(3):127-132, 2006.

Lind D, Franken S, Kappler J, Jankowski J, Schilling K. Characterization of the neuronal marker NeuN as a multiply phosphorylated antigen with discrete subcellular localization. *Journal of Neuroscience Research*; 79(3):295–302; 2005.

Liu J, Solway K, Messing RO, Sharp FR. Increased neurogenesis in the dentate gyrus after transient global ischemia in gerbils. *The Journal of Neuroscience*; 18:7768-7778; 1998.

Lledo PM, Saghatelian A. Integrating new neurons into the adult olfactory bulb: joining the network, life-death decisions, and the effects of sensory experience. *Trends in Neurosciences*; 28(5):248-254; 2005.

Lledo PM, Alonso M, Grubb MS. Adult neurogenesis and functional plasticity in neuronal circuits. *Natural Reviews. Neuroscience*; 7(3):179-193; 2006.

Lorrain DS, Hull EM. Nitric oxide increases dopamine and serotonin release in the medial preoptic area. *Neuroreport*; 5:87-89; 1993.

Lucassen PJ, Meerlo P, Naylor AS, van Dam AM, Dayer AG, Fuchs E, Oomen CA, Czéh B. Regulation of adult neurogenesis by stress, sleep disruption, exercise and inflammation: Implications for depression and antidepressant action. *European Neuropsychopharmacology*; 20(1):1-17; 2010.

Machado DG, Bettio LE, Cunha MP, Capra JC, Dalmarco JB, Pizzolatti MG, Rodrigues AL. Antidepressant-like effect of the extract of *Rosmarinus officinalis* in mice: involvement of the monoaminergic system. *Progress in Neuro-psychopharmacology & Biological Psychiatry*; 33(4):642-650; 2009.

Ma J, Luo XD, Protiva P, Yang H, Ma C, Basile MJ, Weinstein IB, Kennely EJ. Bioactive novel polyphenols from the fruit of *Manilkara zapota* (Sapodilla). *Journal of Natural Products*; 66:983-986; 2003.

Ma J, Yang H, Basile MJ, Kennely EJ. Analysis of polyphenolic antioxidants from the fruits of three *Pouteria* species by selected ion monitoring liquid chromatography-mass spectrometry. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*; 52:5873-5878; 2004.

Madsen TM, Treschow A, Bengzon J, Bolwig TG, Lindvall O, Tingstrom A. Increased neurogenesis in a model of electroconvulsive therapy. *Biological Psychiatry*; 47(12):1043-1049; 2000.

Malberg JE, Eisch AJ, Nestler EJ, Duman RS. Chronic antidepressant treatment increases neurogenesis in adult rat hippocampus. *The Journal of Neuroscience*; 20(24):9104-9110; 2000.

Malberg JE. Implications of adult hippocampal neurogenesis in antidepressant action. *Journal of Psychiatry & Neuroscience*; 29(3):196-205; 2004

Manji HK, Lenox RH. Protein kinase C signaling in the brain: molecular transduction of mood stabilization in the treatment of manic-depressive illness. *Biological Psychiatry*; 46(10):1328-1351; 1999.

Manji HK, Chen G. PKC, MAP kinases and the bcl-2 family of proteins as long-term targets for mood stabilizers. *Molecular Psychiatry*; 7(1):46-56; 2002.

Marletta MA. Nitric oxide synthase: aspects concerning structure and catalysis. *Cell*; 78(6):927-930; 1994.

Maslov AY, Barone TA, Plunkett RJ, Pruitt SC. Neural stem cell detection, characterization, and age-related changes in the subventricular zone of mice. *The Journal of Neuroscience*; 24(7):1726–1733; 2004.

McDonald BJ, Chung HJ, Huganir RL. Identification of protein kinase C phosphorylation sites within the AMPA receptor GluR2 subunit. *Neuropharmacology*; 41(6):672-679; 2011.

Meotti FC, Luiz AP, Pizzolatti MG, Kassuya CAL, Calixto JB, Santos ARS. Analysis of the Antinociceptive Effect of the Flavonoid Myricitrin: Evidence for a Role of the L-Arginine-Nitric Oxide and Protein Kinase C Pathways. *The Journal of Pharmacology & Experimental Therapeutics*; 316:789–796; 2006a.

Meotti FC, Missau FC, Ferreira J, Pizzolatti MG, Mizuzaki C, Nogueira CW. Anti-allodynic property of flavonoid myricitrin in models of persistent inflammatory and neuropathic pain in mice. *Biochemical. Pharmacology*; 72:1707-1713; 2006b.

Meotti FC, Posser T, Missau FC, Pizzolatti MG, Leal RB, Santos ARS. Involvement of p38^{MAPK} on the antinociceptive action of myricitrin in mice. *Biochemical Pharmacology*; 74:924–931; 2007.

Meotti FC, Senthilmohan R, Harwood DT, Missau FC, Pizzolatti MG, Kettle AJ. Myricitrin as a substrate and inhibitor of myeloperoxidase: Implications for the pharmacological effects of flavonoids. *Free Radical Biology & Medicine*; 44:109-120; 2008.

Millan MJ. Multi-target strategies for the improved treatment of depressive states: conceptual foundations and neuronal substrates, drug discovery and therapeutic application. *Pharmacology and Therapeutics*. 110(2):135-370; 2006.

Ming GL, Song H. Adult neurogenesis in the mammalian central nervous system. *Annual Review of Neuroscience*; 28:223-250; 2005.

Mirzadeh Z, Merkle FT, Soriano-Navarro M, Garcia-Verdugo JM, Alvarez-Buylla A. Neural stem cells confer unique pinwheel architecture to the ventricular surface in neurogenic regions of the adult brain. *Cell Stem Cell*; 3(3):265–278; 2008.

Moghaddam B. Stress preferentially increases extraneuronal levels of excitatory amino acids in the prefrontal cortex: comparison to hippocampus and basal ganglia. *Journal of Neurochemistry*; 60(5):1650-1657; 1993.

Moncada S, Palmer RM, Higgs EA. Nitric oxide: physiology, pathophysiology and pharmacology. *Pharmacological Reviews*; 43(2):109-142; 1991.

Mullen RJ, Buck CR, Smith AM. NeuN, a neuronal specific nuclear protein in vertebrates. *Development*; 116(1):201–211; 1992.

Namba T, Mochizuki H, Onodera M, Mizuno Y, Namiki H, Seki T. The fate of neural progenitor cells expressing astrocytic and radial glial markers in the postnatal rat dentate gyrus. *The European Journal of Neuroscience*; 22(8):1928–1941; 2005.

Ngwenya LB, Peters A, Rosene DL. Maturation sequence of newly generated neurons in the dentate gyrus of the young adult rhesus monkey. *The Journal of Comparative Neurology*; 498(2):204–216; 2006.

Nestler EJ, Gould E, Manji H, Bunacan M, Duman RS, Greshenfeld HK, Hen R, Koester S, Lederhendler I, Meaney M, Robbins T, Winsky L, Zalcman S. Preclinical models: Status of basic research in depression. *Biological Psychiatry*; 52(6):503-528; 2002.

Nestler EJ, Carlezon WA Jr. The mesolimbic dopamine reward circuit in depression. *Biological Psychiatry*; 59(12):1151-1159; 2006.

Nowakowski RS, Lewin SB, Miller MW. Bromodeoxyuridine immunohistochemical determination of the lengths of the cell cycle and the DNA-synthetic phase for an anatomically defined population. *Journal of Neurocytology*; 18(3):311-318; 1989.

O'Connor E, Rossom RC, Henninger M, Groom HC, Burda BU, Henderson JT, Bigler KD, Whitlock EP. Screening for Depression in Adults: An Updated Systematic Evidence Review for the U.S. Preventive Services Task Force. Rockville (MD): Agency for Healthcare Research and Quality (US); 2016.

O'Reardon JP, Brunswick DJ, Amsterdam JD. Treatment resistant depression in the age of serotonin: evolving strategies. *Current Opinion in Psychiatry*; 13:93–98; 2000.

Papakostas GI, Shelton RC, Smith J, Fava M. Augmentation of antidepressants with atypical antipsychotic medications for treatment-resistant major depressive disorder: a metaanalysis. *The Journal of Clinical Psychiatry*; 68(6):826-831; 2007.

Parent JM, Yu TW, Leibowitz RT, Geschwind DH, Sloviter RS, Lowenstein DH. Dentate granule cell neurogenesis is increased by seizures and contributes to aberrant network reorganization in the adult rat hippocampus. *The Journal of Neuroscience*; 17:3727–3738; 1997.

Pereira M, Siba IP, Chioca LR, Correia D, Vital MABF, Pizzolatti MG, Santos ARS, Andreatini R. Myricitrin, a nitric oxide and protein kinase C inhibitor, exerts antipsychotic-like effects in animal models. *Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry*; 35(7):1636-1644; 2011.

Pereira M, Andreatini R, Schwarting RKW, Brenes JC. Amphetamine-induced appetitive 50-kHz calls in rats: a marker of affect in mania? *Psychopharmacology*; 231(13):2567-2577; 2014.

Petrik D, Lagace DC, Eisch AJ. The neurogenesis hypothesis of affective and anxiety disorders: are we mistaking the scaffolding for the building? *Neuropharmacology*; 62(1): 21-34; 2012.

Pittenger C, Duman RS. Stress, depression, and neuroplasticity: a convergence of mechanisms. *Neuropsychopharmacology*; 33(1):88-109; 2008.

Rao MS, Shetty AK. Efficacy of doublecortin as a marker to analyse the absolute number and dendritic growth of newly generated neurons in the adult dentate gyrus. *The European Journal of Neuroscience*; 19(2):234-246; 2004.

Reynolds BA, Weiss S. Generation of neurons and astrocytes from isolated cells of the adult mammalian central nervous system. *Science*; 255:1707–1710; 1992.

Ripoll N, David DJ, Dailly E, Hascoet M, Bourin M . Antidepressant like effects in various mice strains in the tail suspension test. *Behavioural Brain Research*; 143(2):193–200; 2003.

Ruhé HG, Mason NS, Schene AH. Mood is indirectly related to serotonin, norepinephrine and dopamine levels in humans: a meta-analysis of monoamine depletion studies. *Molecular Psychiatry*; 12(4):331-359; 2007.

Rush AJ, Thase ME, Dubé S. Research issues in the study of difficult-to-treat depression. *Biological Psychiatry*; 53(8):743–753; 2003.

Sairanen M, Lucas G, Ernfors P, Castrén M, Castrén E. Brain-derived neurotrophic factor and antidepressant drugs have different but coordinated effects on neuronal turnover, proliferation, and survival in the adult dentate gyrus. *The Journal of Neuroscience*; 25(5):1089-1094; 2005.

Sairanen M, O'leary OF, Knuutila JE, Castrén E. Chronic antidepressant treatment selectively increases expression of plasticity-related proteins in the hippocampus and medial prefrontal cortex of the rat. *Neuroscience*;144:368-374; 2007.

Kodama M, Fujioka T, Duman RS. Chronic olanzapine or fluoxetine administration increases cell proliferation in hippocampus and prefrontal cortex of adult rat. *Biological Psychiatry*; 56(8):570-580; 2004.

Santarelli L, Saxe M, Gross C, Surget A, Battaglia F, Dulawa S, Weisstaub N, Lee J, Duman R, Arancio O, Belzung C, Hen R. Requirement of hippocampal neurogenesis for the behavioral effects of antidepressants. *Science*; 301(5634):805-809; 2003.

Scharfman H, Goodman J, Macleod A, Phani S, Antonelli C, Croll S. Increased neurogenesis and the ectopic granule cells after intrahippocampal BDNF infusion in adult rats. *Experimental Neurology*; 192(2):348-356; 2005.

Schiavon AP, Bonato JM, Milani H, Guimarães FS, Weffort de Oliveira RM. Influence of single and repeated cannabidiol administration on emotional behavior and markers

of cell proliferation and neurogenesis in non-stressed mice. *Progress in Neuro-psychopharmacology & Biological Psychiatry*; 64:27-34; 2015.

Scott BW, Chan KF, Wong G, Ahmed M, Chievert L, Liu RR, Wood J, Burnham WM. Cytogenesis in the adult rat dentate gyrus is increased following kindled seizures but is unaltered in pharmacological models of absence seizures. *Epilepsy & Behavioral*; 18(3):179-185; 2010.

Segovia G, Porrás A, Mora F. Effects of a nitric oxide donor on glutamate and GABA release in striatum and hippocampus of the conscious rat. *Neuroreport*; 5:1937–1940; 1994.

Shimosaki S, Tsurunaga Y, Itamura H, Nakamura M. Anti-allergic effect of the flavonoid myricitrin from *Myrica rubra* leaf extracts in vitro and in vivo. *Natural Product Research: Formerly Natural Product Letters*; 25(4):374-380; 2011.

Silva MT, Galvao TF, Martins SS, Pereira MG. Prevalence of depression morbidity among Brazilian adults: a systematic review and meta-analysis. *Revista brasileira de psiquiatria*; 36(3):262-270; 2014.

Spalding KL, Bergmann O, Alkass K, Bernard S, Salehpour M, Huttner HB, Boström E, Westerlund I, Vial C, Buchholz BA, Possnert G, Mash DC, Druid H, Frisen J. Dynamics of hippocampal neurogenesis in adult humans. *Cell*; 153(6):1219–1227; 2013.

Spiacci A Jr, Kanamaru F, Guimarães FS, Oliveira RM. Nitric oxide-mediated anxiolytic-like and antidepressant-like effects in animal models of anxiety and depression. *Pharmacology, Biochemistry and Behavior*; 88(3):247-255; 2008.

Steinert JR, Chernova T, Forsythe ID. Nitric Oxide signaling in brain function, dysfunction and dementia. *Neuroscientist*; 16(4):435-452; 2010.

Steru L, Chermat R, Thierry B, Simon P, Porsolt R. The tail suspension test: a new method for screening antidepressants in mice. *Psychopharmacology*; 85(3):367–370; 1985.

Strasser A, McCarron RM, Ishii H, Stanimirovic D, Spatz M. L-arginine induces dopamine release from the striatum in vivo. *Neuroreport*; 5(17):2298–2300; 1994.

Suzuki E, Yagi G, Nakaki T, Kanba S, Asai M. Elevated plasma nitrate levels in depressive states. *Journal of Affective Disorders*; 63(1-3):221-224; 2001.

Taylor S, Stein MB. The future of selective serotonin reuptake inhibitors (SSRIs) in psychiatric treatment. *Medical Hypotheses*; 66(1):14-21; 2006.

Toni N, Teng EM, Bushong EA, Aimone JB, Zhao C, Consiglio A, van Praag H, Martone ME, Ellisman MH, Gage FH. Synapse formation on neurons born in the adult hippocampus. *Nature Neuroscience*; 10(6):727–734; 2007.

- Toni N, Laplagne DA, Zhao C, Lombardi G, Ribak CE, Gage FH, Schinder AF. Neurons born in the adult dentate gyrus form functional synapses with target cells. *Nature Neuroscience*; 11(8):901–907; 2008.
- van Praag H, Kempermann G, Gage FH. Running increases cell proliferation and neurogenesis in the adult mouse dentate gyrus. *Nature Neuroscience*; 2(3):266-270; 1999.
- Varty GB, Cohen-Williams ME, Hunter JC. The antidepressant-like effects of neurokinin NK1 receptor antagonists in a gerbil tail suspension test. *Behavioural Pharmacology*; 14(1):87-95; 2003.
- Vasconcelos FF, Castro DS. Transcriptional control of vertebrate neurogenesis by the proneural factor *Ascl1*. *Frontiers in Cellular Neuroscience*; 8:412; 2014.
- Volke V, Wegener G, Bourin M, Vasar E. Antidepressant- and anxiolytic-like effects of selective neuronal NOS inhibitor 1-(2-trifluoromethylphenyl)-imidazole in mice. *Behavioural Brain Research*; 140(1-2):141-147; 2003.
- von Bohlen und Halbach O. Immunohistological markers for staging neurogenesis in adult hippocampus. *Cell and Tissue Research*.; 329(3):409-420; 2007.
- von Bohlen und Halbach O. Immunohistological markers for proliferative events, gliogenesis, and neurogenesis within the adult hippocampus. *Cell and Tissue Research*.; 345:1–19; 2011.
- Walsh RN, Cummins RA. The open-field test: a critical review. *Psychological Bulletin*; 83(3):482-504; 1976.
- Wang HD, Dunnavant FD, Jarman T, et al. Effects of antipsychotic drugs on neurogenesis in the forebrain of the adult rat. *Neuropsychopharmacology*; 29(7):1230–1238; 2004.
- Watson DG, Lenox RH. Chronic lithium-induced downregulation of MARCKS in immortalized hippocampal cells: Potentiation by muscarinic receptor activation. *Journal of Neurochemistry*; 67:767–777; 1996.
- Wegener C, Volke V, Rosenberg R. Endogenous nitric oxide decreases hippocampal levels of serotonin and dopamine in vivo. *British Journal of Pharmacology*; 130(3):575-580; 2000.
- West AR, Galloway MP, Grace AA. Regulation of striatal dopamine neurotransmission by nitric oxide: effector pathways and signaling mechanisms. *Synapse*; 44(4):227–245; 2002.
- White FJ., Kalivas PW. Neuroadaptations involved in amphetamine and cocaine addiction. *Drug and Alcohol Dependence*; 51:141-153, 1998.

Willner P. Chronic mild stress (CMS) revisited: consistency and behavioural-neurobiological concordance in the effects of CMS. *Neuropsychobiology*; 52(2):90-110; 2005.

Winner B, Cooper-Kuhn CM, Aigner R, Winkler J, Kuhn HG. Long-term survival and cell death of newly generated neurons in the adult rat olfactory bulb. *The European Journal of Neuroscience*; 16(9):1681–1689; 2002.

Wolf HK, Buslei R, Schmidt-Kastner R, Schmidt-Kastner PK, Pietsch T, Wiestler OD, Blümcke I. NeuN: a useful neuronal marker for diagnostic histopathology. *The Journal of Histochemistry and Cytochemistry*; 44(10):1167–1171; 1996.

Wong ML & Licinio J. Research and treatment approaches to depression. *Nature Reviews Neuroscience*; 2:343-351; 2001.

Yagita Y, Kitagawa K, Ohtsuki T, Takasawa K, Miyata T, Okano H, Hori M, Matsumoto M. Neurogenesis by progenitor cells in the ischemic adult rat hippocampus. *Stroke*; 32:1890-1896; 2001.

Yokomizo A, Moriwaki M. Transepithelial permeability of Myricitrin and its degradation by simulated digestion in human intestinal Caco-2 cell monolayer. *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry*; 69(9):1774-1776; 2005a.

Yokomizo A, Moriwaki M. Myricitrin Degraded by Simulated Digestion Inhibits Oxidation of Human Low-Density Lipoprotein. *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry*; 69(4): 693-699; 2005b.

Yun HY, Dawson VL, Dawson TM. Nitric oxide in health and disease of the nervous system. *Molecular Psychiatry*; 2(4):300-310; 1997.

Zacchetti A, Garderen E van, Teske E, Nederbragt H, Dierendonck JH, Rutteman GR. Validation of the use of proliferation markers in canine neoplastic and non-neoplastic tissues: comparison of KI-67 and proliferating cell nuclear antigen (PCNA) expression versus in vivo bromodeoxyuridine labelling by immunohistochemistry. *APMIS*; 111(3):430–438; 2003.

Zanelati TV, Biojone C, Moreira FA, Guimarães FS, Joca SR. Antidepressant-like effects of cannabidiol in mice: possible involvement of 5-HT_{1A} receptors. *British Journal of Pharmacology*; 159(1):122-128; 2010.

Zhao C, Teng EM, Summers RG Jr, Ming GL, Gage FH. Distinct morphological stages of dentate granule neuron maturation in the adult mouse hippocampus. *The Journal of Neuroscience*; 26(1):3–11; 2006.

Zhao C, Deng W, Gage FH. Mechanisms and functional implications of adult neurogenesis. *Cell*; 132(4):645-660; 2008.