

**Universidade Federal de Ouro Preto**

Núcleo de Pesquisas em Ciências Biológicas

Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas  
CBIOL

---

Dissertação

---

**O modelo de depressão da  
Bulbectomia Olfatória em Ratos  
Wistar induz alterações na  
expressão de receptores  
purinérgicos em córtex frontal:  
um estudo exploratório***Daniela Vieira de Oliveira*Ouro Preto  
2022

Daniela Vieira de Oliveira

**O modelo de depressão da Bulbectomia Olfatória em Ratos *Wistar* induz alterações na expressão de receptores purinérgicos em córtex frontal: um estudo exploratório**

Orientador: Prof. Dr. Roberto Farina de Almeida

Coorientador: Prof. Dr. Rodrigo Cunha Alvim de  
Meneses

Dissertação apresentada ao Programa de Pós Graduação em Ciências Biológicas da Universidade Federal de Ouro Preto, como parte integrante dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Ciências Biológicas, área de concentração Bioquímica Estrutural e Biologia Molecular

## SISBIN - SISTEMA DE BIBLIOTECAS E INFORMAÇÃO

- O48o Oliveira, Daniela Vieira De.  
O modelo de depressão da Bulbectomia Olfatória em Ratos Wistar induz alterações na expressão de receptores purinérgicos em córtex frontal [manuscrito]: um estudo exploratório. / Daniela Vieira De Oliveira. - 2022.  
52 f.: il.: color., tab..
- Orientador: Prof. Dr. Roberto Almeida.  
Coorientador: Prof. Dr. Rodrigo Meneses.  
Dissertação (Mestrado Acadêmico). Universidade Federal de Ouro Preto. Núcleo de Pesquisas em Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas.  
Área de Concentração: Bioquímica Estrutural e Biologia Molecular.
1. Psicofarmacologia. 2. Adenosina. 3. Purinas. I. Almeida, Roberto. II. Meneses, Rodrigo. III. Universidade Federal de Ouro Preto. IV. Título.

CDU 577.2

Bibliotecário(a) Responsável: Luciana De Oliveira - SIAPE: 1.937.800



## FOLHA DE APROVAÇÃO

Daniela Vieira de Oliveira

### O modelo de depressão da Bulbectomia Olfatória em Ratos *Wistar* induz alterações na expressão de receptores purinérgicos em córtex frontal: um estudo exploratório

Dissertação apresentada ao Programa de Pós Graduação em Ciências Biológicas da Universidade Federal de Ouro Preto como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Ciências Biológicas: Bioquímica Estrutural e Biologia Molecular

Aprovada em 29 de Julho de 2022

#### Membros da banca

Prof. Dr. Roberto Farina de Almeida - Orientador - Universidade Federal de Ouro Preto  
Prof. Dr. Adriano Martimbianco de Assis - Universidade Católica de Pelotas  
Dra. Sylvana Izaura Salyba Rendeiro de Noronha - Universidade Federal de Ouro Preto  
Prof. Dr. Rodrigo Cunha Alvim de Menezes (Co-orientador) - Universidade Federal de Ouro Preto

Roberto Farina de Almeida, orientador do trabalho, aprovou a versão final e autorizou seu depósito no Repositório Institucional da UFOP em 14/02/2023



Documento assinado eletronicamente por **Roberto Farina de Almeida, PROFESSOR DE MAGISTERIO SUPERIOR**, em 14/02/2023, às 14:24, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site [http://sei.ufop.br/sei/controlador\\_externo.php?acao=documento\\_conferir&id\\_orgao\\_acesso\\_externo=0](http://sei.ufop.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0), informando o código verificador **0475110** e o código CRC **98914D72**.

## Daniela Vieira de Oliveira

*“Desistir...eu já pensei seriamente nisso, mas nunca me levei realmente a sério; é que tem mais chão nos meus olhos do que o cansaço nas minhas pernas, mais esperança nos meus passos do que tristeza nos meus ombros, mais estrada no meu coração do que medo na minha cabeça” Cora Coralina*

*O correr da vida embrulha tudo,  
a vida é assim: esquenta e esfria,  
aperta e daí afrouxa, sossega e depois desinquieta.*

*O que ela quer da gente é coragem.*

*O que Deus quer é ver a gente*

*aprendendo a ser capaz*

*de ficar alegre a mais,*

*no meio da alegria,*

*e inda mais alegre*

*ainda no meio da tristeza!*

*A vida inventa!*

*A gente principia as coisas,*

*no não saber por que,*

*e desde aí perde o poder de continuação*

*porque a vida é mutirão de todos,*

*por todos remexida e temperada.*

*O mais importante e bonito, do mundo, é isto:*

*que as pessoas não estão sempre iguais,*

*ainda não foram terminadas,*

*mas que elas vão sempre mudando.*

*Afinam ou desafinam. Verdade maior.*

*Viver é muito perigoso; e não é não.*

*Nem sei explicar estas coisas.*

*Um sentir é o do sentente, mas outro é do sentidor.”*

*João Guimarães Rosa*

## **AGRADECIMENTOS**

Agradeço a Deus, meu tudo, pelo dom da vida, amor infinito, por me inspirar e auxiliar em busca de ser alguém melhor todos os dias.

A minha mãe Izildinha e meu pai Geraldo, meu amor maior, minha razão de vida, por vocês busco continuamente melhorar, pois são minha fonte de amor incondicional, cuidado, dedicação, muito obrigada por segurar minha mão, secar minhas lágrimas e não me deixar desistir dos meus objetivos, gratidão pelas orações e força. Aos meus irmãos, Iara e Ronan, meu tudo, meus maiores parceiros, cúmplices da vida, pelo carinho, apoio e por se fazerem sempre presentes em minha caminhada. A toda a minha família, em especial a tia Gracinha, o tio Valtair e aos meus primos: Renata, Rafael e Cássio, pelos momentos juntos em família, apoio, eu tenho a melhor família do mundo.

Meu sincero agradecimento, respeito e dedicatória a cada animal, que doaram de sua existência em prol dessa pesquisa.

Ao orientador Dr. Roberto Farina de Almeida e ao coorientador Dr. Rodrigo Cunha Alvim de Menezes, pela orientação acadêmica, conhecimento compartilhado, sugestões de melhoria, mesmo frente aos muitos obstáculos que encontramos, fomos em busca de fazer essa pesquisa se concretizar. Prof. Dr. Roberto, apesar dos inúmeros desafios, tu não deixaste isso impedir a concretização do projeto, muito obrigada por custear essa pesquisa, pois em anos de desvalorização e cortes na ciência, sem você esse projeto não aconteceria.

Ao grupo de pesquisa OBX: Sulamita, Camila, Paulo e Tiago, por somarem forças e fazer esse projeto acontecer, assim como o Lucas da UFRS, um grande parceiro, que agregou, grandemente, na execução e nos esclarecimentos nessa pesquisa. Agradeço em especial minha grande amiga Sulamita, que me deu força, apoio, me instruiu, chorou e sorriu comigo, vibrou, passou todos os perrengues ao meu lado, dividiu esse fardo e tornou tudo mais leve, sem você, minha amiga, não teria conseguido, vou te levar para a vida.

Aos laboratórios LFC, LBM, CCA, por cederem espaço, matérias e dividirem conhecimento para a execução desse projeto. Em especial, quero agradecer, enormemente, ao LBM, coordenado pela Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. Renata Guerra e Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. Sílvia Gomes, juntamente com toda

sua equipe, esse projeto também são de vocês e sem a compreensão, a força, a instrução, o carinho, não teríamos conseguido. Quero em especial, honrar e reconhecer o esforço, a parceria, a paciência e a dedicação da doutoranda Flávia, mais do que uma amiga, foi nossa instrutora, não nos deixou desistir, segurou nossas mãos e esteve ao nosso lado, esse projeto aconteceu por grande intervenção sua, que junto conosco ficou sem descanso e pacientemente nos auxiliou, não há palavras para te agradecer, sem você esse projeto não existiria, minha eterna gratidão. Ademais, agradeço aos veterinários do CCA, Hugo, Barbara, vocês foram grandes parceiros e suas instruções foram fundamentais para a concretização do projeto. Nosso muito obrigada, também à Érika e à Renata e cada funcionários do CCA, sempre solícitos, e dispostos a nos ajudar, na busca do bem estar dos animais e na execução da nossa pesquisa.

Aos Professores da UFOP, mestres do saber, que gentilmente compartilham de uma vida de conhecimento e de uma maneira tão inspiradora; vocês tornam o mundo melhor, porque a ciência dita os rumos da humanidade, obrigada por lutarem e acreditarem na educação e na pesquisa.

Aos amigos que fiz na UFOP, nessa pós graduação, compartilhamos não apenas conhecimento, mas bons momentos, alegrias, cansaço, vencendo a cada disciplina concluída, muitos vou manter em meu coração.

Aos bons e velhos amigos que são parte de mim, compreenderam minha ausência, meu estresse, que seguraram minha mão estando sempre presentes ao meu lado, ouviram minhas ideias, vibrando minhas vitórias, ouvindo minhas reclamações, secando minhas lágrimas e me levantando a cada tombo, vocês são inspiração. Meu muito obrigada a cada um, em especial à Patrícia, hoje entendo: “não entra neste mestrado” e a Carlinha.

Em especial, dedico essa busca a minha eterna amiga Lorena, infelizmente não pudemos impedir sua partida, mas seguimos à procura de entendimento sobre esse transtorno, para que mais Lorena's continuem presente, sendo o amor de seus pais, irmãos, amigos, eternas saudades.

Agradeço a minha psicóloga Polyana, sei que tem me acompanhado há pouco tempo, mas sem você não conseguiria “desbloquear” na escrita e não teria tido a tranquilidade que precisei para chegar ao fim, mesmo além dos meus limites de cansaço.

Ao CBIOL, ao NUPEB, à UFOP, à Fapemig, à CAPES e ao CNPq pelo apoio e fomento para a realização desse projeto, em especial ao Robson, secretário do programa, sempre solícito em nos auxiliar, instruir, facilitando em tudo o que pôde, na busca por solução.

Enfim, o meu muito obrigada a todos que de alguma forma fizeram parte dessa caminhada e torceram por mim.



## SUMÁRIO

1. Introdução .....	17
1.1. Transtorno de Depressão Maior (TDM).....	17
1.2. Epidemiologia TDM .....	18
1.3. Sintomas do TDM .....	19
1.4. Morbidade e Mortalidade .....	20
1.5. Diagnóstico – Sinais e sintomas.....	21
1.6. Impacto da depressão na sociedade atual e custos para a economia.....	22
1.7. Mecanismos envolvidos no TDM .....	22
1.8. Modelo de Depressão da Bulbectomia Olfatória Bilateral (OBX) .....	26
1.9. Sistema Glutamatérgico - SG.....	27
1.10. Sistema Purinérgico – SP .....	30
1.10.1. Receptores de Adenosina P1: A1 e A2a.....	31
1.10.2. Receptores de Purinas P2: P2X / P2Y.....	32
2. Justificativa .....	34
3. Objetivos .....	35
3.1. Objetivo Geral .....	35
3.2. Objetivos Específicos .....	35
4. Materiais e Métodos.....	35
4.1. Drogas .....	35
4.2. Animais .....	35
4.3. Delineamento Experimental.....	36
4.4. Supressão do Bulbo Olfatório – OBX.....	37
4.5. Teste Comportamental .....	37
4.5.1. Splash Test.....	37
4.6. Eutanásia .....	38

4.7.	Expressão Gênica por qRT-PCR.....	38
4.8.	Análise estatística.....	39
5.	Resultados.....	39
5.1.	Resultado teste comportamental - Splash Test.....	39
5.2.	Expressão gênica de receptores purinérgicos P1 (ADORA1, ADORA2a) em córtex frontal.....	40
5.3.	Expressão gênica de receptores purinérgicos P2 (P2X7, P2Y1) em córtex frontal ..	41
6.	Discussão .....	12
7.	Conclusão:.....	16
8.	Referências:.....	17

## **ABREVIATURAS**

AC- Adenilato ciclase

ACTH- Hormônio adrenocorticotropina

ADO – Adenosina

AMP - Adenosina Monofosfato

AMPA- Ácido  $\alpha$ -amino-3-hidroxi-5-metil-isoxazol-4-propiónico

AMPC - Monofosfato cíclico de Adenosina

ATP – Adenosina trifósfato

AVP- Arginina vasopressina

BDNF- Neurotrófico derivado do cérebro

BNST- Núcleo do leito da estria terminal

CCA- Centro de criação de animais

CBIOL – Ciências Biológicas

CONCEA – Brasil- Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal

COVID-19 – Coronavírus- 19

CPF – Córtex Pré-Frontal

CRH- Hormônio liberador de corticotropina

DNA - Ácido Desoxirribonucleico

DSM-V- Manual Diagnóstico e Estatístico de Transtornos Mentais

EAATs- Via transportadores de aminoácidos excitatórios

GABA - Ácido Gama Aminobutírico

GDP – Guanosina difosfato

GMP - Guanosina monofosfato

GR- Receptor de glicocorticóide

GREs- Elementos de resposta a glicocorticóides

GTP – Guanosina trifosfato

GUO - Guanosina

HP - Hipocampo

HPA- Hipotálamo-pituitária-adrenal

IMAOs- Inibidores das monoaminas

IL-6 - Interleucina-6

ISRS- Inibidores Seletivos da Recaptação de Serotonina

LCR- Líquido cefalorraquidiano

LFC- Laboratório de cardiologia vascular

MAPK- Mitógeno

MAPK- mitógeno

mGluRs- Receptores acoplados à proteína G

NMDA- N-metil-D-aspartato

NORT- Reconhecimento de Objeto

OBX- Bulbectomia Bilateral Olfatória

OFT- Teste de campo aberto

OMS- Organização mundial de saúde

PI3K- Via fosfatidilinositol 3-cinase

PKA- Proteína quinase A

PLC- $\gamma$ - Fosfolipase C-gama

PPG – Programa de Pós Graduação

PVN- Núcleos paraventriculares

RNA – Ácido Ribonucléico

SERT- Inibição seletiva do transportador de serotonina

SNC-Sistema nervoso central

SG – Sistema Glutamatérgico

SNC – Sistema Nervoso Central

SNPs- Polimorfismo de nucleotídeo único

SP – Sistema Purinérgico

TCAs - Antidepressivos tricíclicos

TDM- Transtorno de Depressão Maior

TNF $\alpha$  - Fatores de Necrose Tumoral Alfa

TrkB- Tropomiosina

UFOP- Universidade federal de Ouro Preto

## RESUMO

O Transtorno Depressivo Maior (TDM), é um transtorno psiquiátrico altamente prevalente, que afeta milhões de pessoas em todo o mundo. Acredita-se que o TDM não possui uma única causa, mas decorre de múltiplos fatores, que somados desempenham um papel importante na sua progressão. Apesar da alta prevalência do TDM e dos avanços obtidos nos últimos anos, a compreensão das bases neurobiológicas desse transtorno e de seu tratamento, ainda representam um desafio. Atualmente, como grande promessa no campo da psicofarmacologia, moduladores do sistema glutamatérgico vêm sendo amplamente estudados. Uma estratégia que vêm demonstrando potencial para avanços terapêuticos, através da modulação indireta do sistema glutamatérgico, são drogas capazes de modular o sistema purinérgico. Diante disso, nessa dissertação, através de um estudo exploratório, buscaremos investigar as possíveis alterações na expressão gênica de importantes receptores purinérgicos, como os receptores P1 (ADORA1 e ADORA2a) e os receptores P2 (P2X7 e P2Y1) na região do córtex frontal em ratos Wistar, submetidos ao modelo de Depressão Maior da Bulbectomia Olfatória (OBX). Nossos resultados demonstram que animais submetidos a OBX apresentam aumento da média na realização do primeiro episódio de *grooming*, quando comparados com o grupo Sham, no teste comportamental do *Splash Test*, o que pode ser considerado um fenótipo do tipo depressivo. Ademais, observamos que os animais pertencentes ao grupo OBX apresentaram uma diminuição na expressão relativa de mRNA nos receptores A2a de adenosina, além de uma grande diminuição na média da expressão dos receptores A1 de adenosina, em comparação com os animais do grupo Sham. Com relação aos receptores P2, apenas um efeito no aumento da média dos receptores P2Y1 nos grupos OBX, em comparação com o grupo Sham, foi observado. Considerando que as pesquisas exploratórias buscam suscitar novas hipóteses e possibilitam a utilização de abordagens estatísticas mais amplas, do que as usualmente utilizadas; em nosso estudo, demonstramos, pela primeira vez, que os animais submetidos ao modelo de depressão pela OBX, apresentaram importantes alterações na expressão de genes do sistema purinérgico, na região do córtex frontal.

**Palavras chaves:** Transtorno Depressivo Maior, Sistema Purinérgico, Adenosina, Purinas, Córtex Frontal.

## **ABSTRACT**

Major Depressive Disorder (MDD) is a highly prevalent psychiatric disorder that affects millions of people worldwide. It is believed that MDD does not have a single cause, but remains from multiple factors, which together play an important role in its progression. Despite the high prevalence of MDD and the advances in recent years in the psychiatry field, understanding the neurobiological bases of this disorder still represents a challenge. Currently, the involvement of the glutamatergic system in MDD has been widely studied. One strategy that has shown potential for therapeutic advances through indirect modulation of the glutamatergic system is drugs capable of modulating the purinergic system. In view of this, through an exploratory study, here we aim to investigate changes in purines receptors gene expression in the frontal cortex of Wistar rats submitted to the Olfactory Bulbectomy (OBX) depression model. Our results demonstrate that OBX surgery increasing the average to perform the first grooming episode by the OBX rats in the splash test comparing them with the Sham group. Furthermore, we observed that the animals belonging to the OBX group showed a decrease in the adenosine A2a receptors mRNA expression in frontal cortex, accompanied by a large size-effect in decreasing the average of adenosine A1 receptors expression comparing OBX and Sham groups. Regarding to P2 receptors, only a large size-effect in increasing the average in P2Y1 gene expression in the frontal cortex of OBX groups was observed in comparison with Sham animals. Considering that exploratory studies allow greater flexibility in the study hypotheses, as well as the use of broader statistical approaches than those usually used, our study demonstrated, for the first time, that animals submitted to the OBX model of depression showed important changes in purines receptor gene expression in the region of the frontal cortex.

**Keywords:** Major Depressive Disorder, Purinergic System, Adenosine, Purines, Frontal Cortex.

## 1. Introdução

### 1.1. Transtorno de Depressão Maior (TDM)

As últimas décadas foram de importantes avanços na pesquisa, visando entender mais sobre a fisiopatologia do Transtorno de Depressão Maior - TDM e os possíveis tratamentos para esse transtorno (Potter & O'Connor, 2022). Apesar desses avanços, o TDM é um transtorno debilitante, que acomete uma gama heterogênea de sintomas e continua sendo uma das principais causas de incapacidade (James et al., 2018), afetando cerca de 280 milhões de pessoas no mundo, segundo a Organização Mundial da Saúde.

Segundo a Comissão de Saúde Mental Global e Desenvolvimento Sustentável, a saúde mental é um direito humano essencial e fundamental, todavia, os transtornos mentais são reconhecidos como a principal causa de problemas de saúde no mundo moderno (“Global, Regional, and National Burden of 12 Mental Disorders in 204 Countries and Territories, 1990–2019: A Systematic Analysis for the Global Burden of Disease Study 2019,” 2022).

Transtornos de ordem psicológica e mental acometem inúmeros indivíduos ao longo de suas vidas (Wong & Licinio, 2001). Sabe-se que há muito a humanidade convive com esses distúrbios, que são responsáveis por gerar mudanças em aspectos fisiológicos e bioquímicos e consequentemente, altera o comportamento e o convívio social, de indivíduos acometidos por esses transtornos (Wong & Licinio, 2001).

Dentre os transtornos psicológicos, a depressão possui grande prevalência e uma das formas de depressão é o transtorno depressivo maior (TDM), categorizado por recorrência ou cronicidade dos episódios depressivos (Mitchell et al., 2009). Segundo o DSM-V, o TDM é caracterizado por perda de interesse e ou de prazer, somado ao humor depressivo (considerando os “*core symptoms*” do TDM), que perdure, pelo menos, por duas semanas (Karyotaki et al., 2016). Assim também, episódios de depressão que durem por longos períodos, são caracterizados como depressão crônica, porém se durar por dois anos, sem nenhum período de remissão superior a dois meses, passa a ser denominado como transtorno depressivo persistente ou distímia (Mitchell et al., 2009).

Atualmente, é de amplo conhecimento que o TDM é uma desordem, cujas causas são multifatoriais, que podem ou não influenciar sua progressão, dentre essas, podemos citar: idade, gênero, estresse, mudanças hormonais, fatores gênicos, ambiente, uso de drogas e entorpecentes ou medicamentos, traumas mecânicos e emocionais (Czéh et al., 2016).

Ademais, outras manifestações clínicas somatizam ao quadro do paciente, importantes para o diagnóstico, como: agitação ou retardo psicomotor, distúrbios do sono, com hiperinsônia ou insônia, apatia, impotência, tristeza, ganho ou perda de peso, baixa concentração, memória e cognição (Réus et al., 2016).



## 1.2. Epidemiologia TDM

Segundo os autores, (“Global, Regional, and National Burden of 12 Mental Disorders in 204 Countries and Territories, 1990–2019: A Systematic Analysis for the Global Burden of Disease Study 2019,” 2022), na década de 90, observou-se que os transtornos mentais representaram 654,8 milhões de casos, enquanto que para 2019, estimava-se 970,1 milhões de casos, ou seja, houve um aumento de 48,1% entre os anos de 1990 a 2019 (“Global, Regional, and National Burden of 12 Mental Disorders in 204 Countries and Territories, 1990–2019: A Systematic Analysis for the Global Burden of Disease Study 2019,” 2022). Todavia, dentro dos transtornos mentais, esses mesmos autores mostraram que o transtorno depressivo, corresponde, em 1990, a 170.8, só que em 2019, foi para 279.6, quase que dobrou. Nesse relatório, também foi demonstrado que a depressão é mais comum em mulheres do que em homens, independente do período em análise; sendo mantida essa mesma proporção do estudo para homens, em 1990, era cerca de 65.6 e para as mulheres era de 105.2, mas em 2019, passou a ser de 109.2 para homens e 170.4 para mulheres e sendo ainda mais comum na faixa etária que vai dos 20 anos, até aproximadamente 59 anos (“Global, Regional, and National Burden of 12 Mental Disorders in 204 Countries and Territories, 1990–2019: A Systematic Analysis for the Global Burden of Disease Study 2019,” 2022).

De acordo com Ronald Kessler, em algum momento da vida, um em cada cinco indivíduos, vai experimentar pelo menos um episódio de depressão (Kessler & Bromet, 2013). Ademais, estudos mostram que em média, um em cada dez pacientes, apresentam sintomas depressivos, embora a prevalência de TDM aumente em ambientes de cuidados secundários, como hospitais (Bromet et al., 2011). Ainda, para Kessler, critérios sociais, como a classe socioeconômica, diferenças culturais, assim como os fatores biológicos ou genéticos, podem influenciar no desenvolvimento do TDM (Kessler & Bromet, 2013). Sabe-se que o período para o desenvolvimento do primeiro episódio de TDM varia da metade da adolescência, até meados dos 40 anos, no entanto quase 40% das pessoas têm seu primeiro episódio de depressão antes dos 20 anos, com uma idade média de início em meados dos 20 anos (Thomas et al., 2015), sendo o pico de prevalência, na segunda e na terceira década de vida, já para outros, na quinta e na sexta décadas (Kessler et al., 2005). Assim também, a depressão é quase duas vezes mais prevalente em mulheres do que em homens, pois fatores biológicos, como oscilações hormonais tornam as mulheres mais susceptíveis ao desenvolvimento do TDM (Kuehner, 2017). Apesar de saber que o TDM é mais prevalente em mulheres, faz-se necessário mais estudos com esse grupo, mas sendo esse um estudo inicial, o grupo poderá, *a posteriori*, buscar aprofundar nos estudos, que visem esclarecer maiores diferenças e suas associações, conforme esse grupo envolvido.

Aproximadamente 60% das pessoas que têm TDM poderão ter recorrentes episódios e a cada repetição de sucessivas crises, há um risco de 10 a 20% de não remissão com as abordagens terapêuticas atuais propostas (Monroe & Harkness, 2011).

Com relação à depressão em níveis mundiais Ronald Kessler e os outros autores, mostraram que ela é mais prevalente na África - Subcentral, próximo ao Saara, com prevalência média de 5536,9 pessoas (4801,3 – 6307,6); em seguida pela parte da África - Sub-Leste, também região do Saara, com média de 4849,4 pessoas (4317,2 – 5416,8) e da África - Subsaariana com 4540,4 indivíduos (4038,1 – 5112,4) (“Global, Regional, and National Burden of 12 Mental Disorders in 204 Countries and Territories, 1990–2019: A Systematic Analysis for the Global Burden of Disease Study 2019,” 2022). Já os países com menores índices são os da Ásia, próximo ao Pacífico, com alta renda, com média de 2084,3 (3764,6 – 4908,9); após Europa Central, média de 2601,0 (2309,7 – 2956,2); seguido do Sudeste da Ásia 2610,6 (2302,9 – 2958,4) (“Global, Regional, and National Burden of 12 Mental Disorders in 204 Countries and Territories, 1990–2019: A Systematic Analysis for the Global Burden of Disease Study 2019,” 2022) . Isso mostra que os fatores sociais, econômicos, interferem, drasticamente, nos altos índices de TDM (“Global, Regional, and National Burden of 12 Mental Disorders in 204 Countries and Territories, 1990–2019: A Systematic Analysis for the Global Burden of Disease Study 2019,” 2022).

### **1.3. Sintomas do TDM**

Estudos mostram que o primeiro episódio de depressão poderá se dar de forma abrupta, e seu curso é variável, não havendo como estabelecer regras, tornando esse transtorno imprevisível (Kessler et al., 2005).

A caracterização dos sintomas de TDM se dá por humor deprimido, perda de motivação, interesse, prazer, baixo auto estima, redução da concentração, sentimento de culpa, perda ou aumento de apetite, associados ao emagrecimento e distúrbios do sono (Deutschenbaur et al., 2016).

Os sintomas do TDM são agrupados em cognitivos, neurovegetativos e emocionais, mas a detecção da síndrome depressiva é difícil, por haver sintomas parecidos a outros transtornos psiquiátricos, como agitação psicomotora, concentração diminuída, que são mais semelhantes aos transtornos de mania, assim como a ansiedade (Goldberg & Fawcett, 2012). A ansiedade é comum no diagnóstico de depressão, pois quase dois terços dos pacientes com TDM apresentam quadro clínico de ansiedade (Goldberg & Fawcett, 2012). No entanto, a ansiedade pode ser sintoma do TDM, caracterizado como depressão ansiosa e descrita no

DSM-V, como um especificador de angústia ansiosa ou como uma outra comorbidade (Gaspersz et al., 2017).

Sabe-se que pacientes em remissão, são aqueles não mais sintomáticos e que conseguiram recuperar sua função habitual, após um episódio de TDM (Thomas et al., 2015). Estudos mostram que com o tratamento devido, os episódios podem durar cerca de três a seis meses, sendo que a maioria dos pacientes se recuperam com doze meses (M. B. Keller et al., 1992) - (Steinert et al., 2014).

Segundo dados atuais publicados por Penninx, cada episódio aumenta a probabilidade de recorrências e 80% dos pacientes terão, em algum momento, pelo menos mais uma crise depressiva (Penninx et al., 2011). Todavia, quanto mais tardiamente um indivíduo desenvolver uma primeira crise, mais favorável será o desfecho da doença (Burcusa & Iacono, 2007). Ademais, embora mais da metade dos indivíduos acometidos por um episódio do TDM se recuperem de seis meses até um ano, porém aproximadamente 27% dos pacientes não vão se recuperar e desenvolverão um quadro depressivo crônico (Angst et al., 2009).

#### **1.4. Morbidade e Mortalidade**

A depressão pode acontecer de forma recorrente ou crônica, trazendo prejuízos consideráveis ao indivíduo, que vão desde limitações em tarefas cotidianas, até ao suicídio, uma fatalidade trágica, que, segundo Deutschenbaur, cerca de 850.000 vidas são perdidas, anualmente, por esse transtorno (Deutschenbaur et al., 2016).

De acordo com a Organização Mundial da Saúde, a principal causa de incapacidade mensurada pelos anos de vida é o TDM (Deutschenbaur et al., 2016). Contudo, há a necessidade da criação de um sistema de saúde específico para lidar com esses fatores, em especial nos países de baixa e média renda, visando fornecer tratamento e cuidados necessários para uma população cada vez mais crescente, no que se refere aos acometidos pelo TDM (“Global, Regional, and National Burden of 12 Mental Disorders in 204 Countries and Territories, 1990–2019: A Systematic Analysis for the Global Burden of Disease Study 2019,” 2022). Assim, os países que investem em pacotes de intervenção eficazes, para transtornos mentais, têm o potencial de reduzir a carga de transtornos mentais, diminuindo, com isso a gravidade dos sintomas, aumentando a remissão e reduzindo o risco de mortalidade (Patel et al., 2016).

A nível global, há várias barreiras ao atendimento em saúde mental, em especial ao paciente portador do TDM, levando a uma escassez substancial nos recursos alocados para sua ampliação e no acesso a esses serviços, bem como a percepção da necessidade de atendimento, sem falar no estigma (“Global, Regional, and National Burden of 12 Mental Disorders in 204

Countries and Territories, 1990–2019: A Systematic Analysis for the Global Burden of Disease Study 2019,” 2022). No entanto, mesmo em países de alta renda, em que há maior aceitação de cuidados para esse transtorno mental, o tratamento ainda não atinge os padrões minimamente adequados que a população necessita (Jorm et al., 2017), sendo necessário expandir a criação de programas eficazes de prevenção e tratamento (Patel et al., 2016), visando cobrir a população atingida por esse distúrbio e reduzir, com isso esses altos índices de suicídio (“Global, Regional, and National Burden of 12 Mental Disorders in 204 Countries and Territories, 1990–2019: A Systematic Analysis for the Global Burden of Disease Study 2019,” 2022).

### **1.5. Diagnóstico – Sinais e sintomas**

Sabe-se que os dois principais sistemas de diagnóstico e de classificação de TDM são o CID (Classificação Internacional de Doenças) e o DSM (Manual Diagnóstico e Estatístico de Transtornos Mentais), sendo aquele o sistema classificatório predominante (Malhi et al., 2014).

Assim, a definição de depressão como transtorno é baseada em sintomas que formam uma síndrome e trazem prejuízo funcional, tendo alguns sintomas mais específicos, como fadiga, insônia, anedonia, que é diminuição da capacidade de sentir prazer, perda de apetite, com redução de peso (Malhi et al., 2014).

Segundo o DSM-V, o TDM está associado à angústia ansiosa, podendo vir acompanhado ou não de características maníacas ou hipomaníacas, descaracterizando o transtorno bipolar e dentro o diagnóstico de TDM, há um especificador de gravidade, que abrange a forma leve, moderada e grave (Hasin et al., 2018).

Assim, para o DSM-V o episódio depressivo maior é diagnosticado quando ocorre, pelo menos, persistente há duas semanas, humor deprimido, desesperança ou anedonia (declarada pelo paciente e ou observada por terceiros) e outros sintomas associados, sendo até cinco sintomas, caracterizando a forma leve; de seis a sete a moderada e acima de oito a grave (Hasin et al., 2018). Esses sintomas incluem distúrbios alimentares, do sono, perda ou ganho de peso, agitação ou apatia, ansiedade ou angústia, perda de concentração, baixa autoestima, (Hasin et al., 2018). Apesar de não incluir dentro da categorização do DSM-V, como um especificador de diagnóstico para o TDM, muitas vezes pacientes desenvolvem esse transtorno depressivo após a perda de um ente querido, iniciando pelo menos, após dois meses dessa perda (Hasin et al., 2018).

## **1.6. Impacto da depressão na sociedade atual e custos para a economia**

No mundo, o Transtorno de Depressão Maior afeta, atualmente, cerca de 280 milhões de pessoas (Möller et al., 2016) e é o mais prevalente dentre as distintas categorias dos transtornos de comportamento e mentais (Kessler et al., 1994), incapacitando indivíduos de executarem suas ações. Segundo a Organização Mundial de Saúde – OMS - o TDM, até 2030, será a maior doença incapacitante no mundo (Yin et al., 2019).

De acordo com os dados apresentados por Paul Greenberg, em um estudo feito nos Estados Unidos, o TDM afeta ao paciente e seus familiares, por incapacitá-lo, com isso há uma perda substancial da produtividade e diminuição da qualidade de vida, assim o ônus econômico do transtorno depressivo maior chega a cerca de 210,5 bilhões de dólares (Greenberg et al., 2015).

Ademais, o advindo da pandemia de COVID-19, em 2020, explicitou os maus e exacerbados resultados de saúde mental, existentes até mesmo anterior à pandemia (Santomauro et al., 2021). Assim, pesquisas epidemiológicas sugerem que os efeitos psicológicos da pandemia e os impactos de longo prazo nas questões sociais e econômicas da população, podem aumentar a prevalência da depressão maior (Santomauro et al., 2021).

## **1.7. Mecanismos envolvidos no TDM**

Devido ao grande potencial incapacitante do TDM, há um enorme interesse na busca e descoberta de sua etiologia, a fim de auxiliar na descoberta de terapias cada vez mais eficazes. Embora estudos relevantes já tenham elucidado alguns dos mecanismos patofisiológicos envolvidos em sua etiologia, ainda, nos dias de hoje, o desafio continua, pois nenhum mecanismo único foi capaz de explicar, satisfatoriamente, todos os aspectos dessa desordem (Belleau et al., 2019).

Dessa forma, além de estudos clínicos e *post-mortem* que busquem entender a neurobiologia da depressão, estudos explorando modelos animais, já foram e vêm sendo conduzidos, contudo, tem sido levado em consideração, que o uso desses modelos, como uma ferramenta para estudos, apenas se aproxima de alguns aspectos do TDM, por isso faz se necessário novas pesquisas, que consigam extrapolar a parte experimental e ir para a clínica, uma vez que, descobertas experimentais, nas ciências básicas, ainda esbarram em dificuldades na prática clínica (Nestler & Hyman, 2010).

Por isso, a hipótese monoaminérgica, uma das primeiras teorias que foram propostas para explicar a fisiopatologia do TDM, continua sendo reconhecida, desde o século XX. Dessa maneira, estudos que investigam neurotransmissores e seus metabólitos, tanto *in vivo*, quanto *post-mortem*, mostraram que antidepressivos tricíclicos e os inibidores de monoaminas oxidase

(IMAOs), têm capacidade de aumentar a neurotransmissão de monoaminas (serotonina, dopamina e noradrenalina) e com isso, proporcionar um efeito antidepressivo, tanto em estudos pré-clínicos, quanto na clínica (Delgado et al., 1990). Dessa forma, fármacos com maiores especificidade, como os antagonistas de receptores do sistema adrenérgico (mirtazapina) e agonistas de serotonina (gepirona), se tornaram medicações de maior comercialização (Delgado et al., 1990).

No entanto, mesmo com grande eficiência em explicar parte da patologia do TDM, esse modelo não conseguiu explicar a variabilidade, observada na clínica, com pacientes que apresentavam resistência medicamentosa e o grande intervalo para início do efeito terapêutico dessas medicações, que excede seis semanas (Willner et al., 2013). Assim também, sabe-se que 30% dos pacientes em tratamento com moduladores de monoaminas, apresentam remissão e essas medicações demoram cerca de oito semanas para começarem a fazer efeito. Dessa forma, aumentar a compreensão sobre as vias de sinalização relacionadas com o TDM, em especial no que tange a plasticidade neuronal, abrangida por diferentes sistemas de neurotransmissão, faz-se de fundamental importância (Deutschenbaur et al., 2016).

Por outro lado, alterações no eixo hipotálamo-hipófise-adrenal (HPA) têm sido alvo de pesquisas relacionadas ao TDM, pois descobertas biológicas apontaram que episódios de estresse (recorrentes ou agudos) levam a um aumento da quantidade de cortisol plasmático, com isso os receptores de glicocorticoide inibem a possibilidade de *feedback* positivo, levando a prejuízos da função cognitiva, e ao surgimento do TDM (Stetler & Miller, 2011). Todavia, as tentativas de tratamento medicamentoso clínico mostraram-se ineficientes, uma vez que os antagonistas dos receptores de glicocorticoides não inibiram as altas taxas de recidivas (Stetler & Miller, 2011). Como consequência do aumento de glicocorticoides sistêmicos, destaca-se ainda o acréscimo de citocina pró-inflamatórias, uma alteração bastante evidente em pacientes acometidos pelo TDM ou em roedores submetidos aos diversos modelos animais de TDM (Stetler & Miller, 2011).

Neste contexto, Setiawan, em seus estudos, apontou que o aumento das citocinas periféricas, ao atravessarem a barreira hematoencefálica, têm capacidade de modular a atividade das células gliais (como micróglia e astrócitos) e neurônios (Setiawan et al., 2015), levando a uma ativação das micróglia, principalmente pelo aumento de IL-6, que pode ser responsável pela instalação de um quadro de neuroinflamação, que poderá explicar o desenvolvimento de transtornos depressivos (Setiawan et al., 2015).

Assim, o processo inflamatório, também é um fator de risco biológico proeminente na patogênese do TDM. Indivíduos que sofrem de depressão, mas que são clinicamente saudáveis, geralmente têm níveis basais mais altos de mediadores pró-inflamatórios circulantes,

particularmente TNF $\alpha$  e IL-6 (Cattaneo et al., 2013). A inflamação, por si só, pode ser a única mediadora e suficiente para promover o surgimento de sintomas depressivo (James et al., 2018). Sabe-se que alguns medicamentos propostos como tratamento antidepressivo podem reduzir a neuroinflamação, mas a grande maioria dos estudos sugerem que os antidepressivos convencionais têm menor eficácia em pacientes com níveis de citocinas elevadas. No entanto, se por um lado, a inibição direta do TNF $\alpha$ , com medicamentos, foi ineficaz como antidepressivo em pacientes com níveis moderados de proteína C reativa, por outro lado foi bastante eficaz em pacientes resistentes ao tratamento, com alta quantidade de marcadores inflamatórios alterados (Hannestad et al., 2011). Assim, possível notar que a compreensão desse distúrbio, visando um tratamento eficaz, poderá vir da integração entre medicamentos já propostos e redutores de processos inflamatórios (James et al., 2018).

Em consonância com os achados descritos anteriormente, estudos sustentam que estresse e depressão estão intimamente associados à diminuição das conexões sinápticas e à atrofia neuronal, em diferentes regiões cerebrais, dentre elas, é possível citar o córtex pré frontal (CPF) e o hipocampo (Deutschenbaur et al., 2016). Uma das explicações plausíveis para tal fenômeno é a diminuição da expressão e a liberação de BDNF, o que justifica uma das muitas consequências do aumento dos níveis de glicocorticoides adrenais, induzidos pelo estresse (Deutschenbaur et al., 2016), nesse sentido, o envolvimento de neurotrofinas cerebrais abre uma outra hipótese que auxilia nessa explicação da fisiopatologia do TDM. Com relação ao BDNF, sabe-se que ele é uma neurotrofina cerebral, com mecanismos de ação baseado na sua ativação em receptores de células gliais, como astrócitos e micróglia e em neurônios (Deutschenbaur et al., 2016). Como consequência da ativação dessas vias celulares envolvidas na resposta ao BDNF, estudos já demonstraram estímulo da proliferação e sobrevivência celular, sinaptogênese, neurogênese e mecanismos essenciais à plasticidade cerebral (Greenberg et al., 2015).

Recentemente, as pesquisas de Egeland mostraram que proteínas reguladoras, como o fator neurotrófico derivado do cérebro (BDNF), tem suas concentrações diminuídas em pacientes com TDM (Egeland et al., 2015). No entanto, esse mesmo autor mostrou que a neurogênese, que é a presença de células tronco pluripotentes em cérebro adulto, tem a capacidade de permitir o surgimento e o crescimento de novos neurônios, com capacidade de adaptabilidade neuronal, permitindo, com isso a neuroplasticidade e o envolvimento no mecanismo de ação de drogas para o tratamento do TDM (Egeland et al., 2015). Assim, estratégias terapêuticas que induzem uma regulação positiva de BDNF já mostraram reversão do prejuízo induzido pelo estresse nas conexões sinápticas e na plasticidade cerebral, permitindo maior capacidade de adaptação e de flexibilidade cognitiva. Do contrário, uma

diminuição de BDNF poderá acarretar ou exacerbar episódios depressivos (Pittenger & Duman, 2008). Visto que, estudos mostraram que a presença do BDNF se encontra no sangue de pacientes deprimidos (Ghafari et al., 2015).

Ainda, os estudos de Keller, observaram que vítimas de suicídio apresentaram um aumento de metilação do DNA em região envolvida na expressão do BDNF, sugerindo uma ligação entre a regulação negativa de BDNF e o comportamento suicida (S. Keller et al., 2010).

Diante desses achados, estudos envolvendo modelos animais e clínicos, demonstraram a existência de uma regulação bidirecional entre esses fatores e a sintomatologia do TDM, pois níveis aumentados de mediadores inflamatórios demonstraram diminuir a expressão do BDNF, já o BDNF consegue desempenhar um importante papel na regulação dos marcadores inflamatórios no cérebro.

Assim também, a detecção desses biomarcadores, pela análise genética, poderá explicitar de forma antecipada, as pessoas mais vulneráveis para o desenvolvimento do transtorno depressivo maior, visando entender sua etiologia, na busca por um diagnóstico mais preciso, a fim de prevenir e tratar melhor esse distúrbio tão debilitante.

Outro mecanismo que explica, em parte, a fisiopatologia do TDM e que vem se destacando, recentemente, é a participação do sistema glutamatérgico no TDM. Afinal, estudos recentes demonstraram que diferentes mecanismos envolvidos no controle glutamatérgico e a ativação de diferentes receptores envolvidos no tônus do glutamato, têm a habilidade de atuar no tratamento do TDM (Deutschenbaur et al., 2016). Nesta perspectiva, a cetamina, um antagonista não competitivo do receptor NMDA, em doses sub anestésicas, vem ganhando destaque por sua ação antidepressiva rápida e tem sido utilizada como uma estratégia terapêutica para a depressão resistente (Deutschenbaur et al., 2016). Ademais, mais especificamente, estudos demonstram que a cetamina provoca aumento da desinibição da transmissão de glutamato, através do bloqueio da N-metil-o-aspartato (NMDA), em neurônios inibitórios (Deutschenbaur et al., 2016). Dessa forma, evidencia-se um aumento da liberação de BDNF, propiciando a sinaptogênese, permitindo que o circuito cerebral funcione de maneira mais adequada, através do controle do humor e das emoções (Deutschenbaur et al., 2016).

Segundo Sanacora, em uma revisão da literatura, envolvendo transtornos de humor em espectroscopia de ressonância magnética, foi possível perceber redução dos níveis de glutamina e de glutamato no CPF, amígdala e hipocampo em pacientes com depressão (Sanacora et al., 2012). Considerando resultados recentes, explorando as especificidades do córtex frontal, essa região cerebral vem se tornando de grande importância nas análises relacionadas ao TDM, por ser responsável por manter o indivíduo em manutenção da atenção, auxiliar no controle do comportamento emocional, por permitir que ele faça escolha de opções



e estratégias relacionadas ao comportamento, bem estar, prazer, motivação, recompensa (Benedetti & Smeraldi, 2009). Assim, o entendimento das bases biológicas envolvidas nesse transtorno, são de fundamental importância, uma vez que isso permite a descoberta de intervenções medicamentosas.

Ademais, Belleau, através de seus estudos, tem mostrado que dentre as anormalidades neuronais, o TDM causa uma perda volumétrica e estrutural no hipocampo e no CPF, expressa em marcadores de progressão da doença, em especial em pacientes que apresentaram, com maior frequência, episódios de crises, e ou com maior duração, e ou resistência medicamentosa (Belleau et al., 2019).

Para ampliarmos a investigação acerca dos mecanismos envolvidos na neurobiologia do TDM, modelos animais vêm sendo considerados ferramentas importantes para avanços na área. Dentre os modelos animais com alto potencial translacional, destacamos o modelo do Estresse Crônico, que é capaz de induzir um fenótipo do tipo depressivo em roedores, através da modulação de vias de sinalização como: a desregulação do eixo HPA; ativação das vias inflamatórias, com citocinas pró inflamatórias periféricas na micróglia cerebral, que podem resultar na redução da neurogênese em córtex frontal (Moylan et al., 2013); estresse oxidativo; distúrbios em neurotransmissores, apresentaram níveis aumentados de hormônio adrenocorticotrófico (ACTH), em resposta a um estressor moderado, que podem levar a redução do volume do córtex frontal (Belleau et al., 2019).

Ademais, modelos animais, como o de Estresse Prolongado pode levar ao desenvolvimento de comportamento depressivo e a hiper reatividade do eixo HPA, juntamente com anormalidades, como a redução volumétrica no córtex frontal e no hipocampo (Moylan et al., 2013). Assim, estudiosos acreditam que a excessiva expressão do receptor de glicocorticóide tem sido associada à neurogênese reduzida dentro do giro denteado, afina níveis circulantes mais altos de glicocorticóides demonstraram também, causar atrofia neuronal e retração dendrítica dentro do córtex frontal (Moylan et al., 2013).

### **1.8. Modelo de Depressão da Bulbectomia Olfatória Bilateral (OBX)**

Na busca por modelos experimentais, com alto poder translacional, com validade de constructo, de face e preditiva, a Ablação Bilateral do Bulbo Olfatório vem ganhando destaque nos últimos anos, em comparação com outros modelos roedores, para o estudo da TDM (Song & Leonard, 2005).

Estudos sobre a neurobiologia da depressão, feitos com animais, mostram uma extrapolação de modelos animais para o TDM, todavia as descobertas da parte experimental nas ciências básicas, esbarram em dificuldades na prática clínica (Nestler & Hyman, 2010).

Ademais, visando aprofundar o entendimento sobre as vias neurobiológicas envolvidas no TDM, assim como, ampliar o entendimento dos mecanismos de ação, de drogas inovadoras, com potencial ação antidepressiva, modelos animais, com alto poder de especificidade, de sensibilidade e de confiabilidade, são opções relevantes nas pesquisas científicas pré-clínicas (Song & Leonard, 2005). Diante disso, o modelo roedor da Bulbectomia Olfatória Bilateral (OBX), que consiste na ablação bilateral dos bulbos olfatórios, vem se tornando um modelo bastante explorado nas ciências básicas (Song & Leonard, 2005).

Por fim, as bases neurobiológicas da indução de manifestações comportamentais e bioquímicas, semelhantes as encontradas em pacientes acometidos pelo TDM, em roedores submetidos à OBX, são explicadas, em parte, pelo rompimento das conexões neuronais, que partem dos bulbos olfativos e migram para as regiões como hipocampo, córtex frontal e hipotálamo, desencadeando uma cascata de eventos que prejudicam a homeostase dessas regiões cerebrais destacadas (Hendriksen et al., 2015). Diante das alterações neuroquímicas induzidas pela OBX, sintomas semelhantes ao TDM, como: hiperatividade, redução da ingestão alimentar, agressividade, alterações emocionais, déficit cognitivo, anedonia, são observados, ratificando a validade de face, pela mimetização dos sintomas e comportamento depressivo no animal (Song & Leonard, 2005). Assim também, é importante destacar que drogas com conhecida ação antidepressiva nas clínicas, conseguem reverter as alterações do modelo, quando administradas de forma crônica, permitindo avaliar a validade preditiva (Almeida et al., 2017), mas são necessários ainda mais estudos nesse sentido.

### **1.9. Sistema Glutamatérgico**

Sabe-se que o principal neurotransmissor excitatório cerebral é o glutamato, presente em mais de 80% dos neurônios, atuando enquanto um transmissor sináptico excitatório, fundamental no desenvolvimento das ramificações dendríticas, além de importante na função de regulação da neuroplasticidade, memória, aprendizado (Sanacora et al., 2012). Ademais, o glutamato tem capacidade de regular a migração neuronal, a poda dos neurônios, a sinaptogênese e o crescimento neuronal, exercendo estas ações através da sua ligação a diferentes receptores ionotrópicos e metabotrópicos (Deutschenbaur et al., 2016).

O glutamato é produzido nos neurônios a partir da glutamina, por uma reação catalisada pela enzima glutaminase. Assim, os astrócitos captam o glutamato através de transportadores de aminoácidos excitatórios (EAATs); assim que ele é liberado no terminal sináptico, o glutamato é convertido de volta em glutamina, via glutamina sintetase e ainda, o glutamato pode ser convertido em GABA, via glutamato descarboxilase (Belleau et al., 2019).

O equilíbrio de glutamato e de GABA conseguem garantir a homeostase no sistema nervoso central (SNC) (Sanacora et al., 2012). No entanto, em caso da hiper estimulação da neurotransmissão glutamatérgica, o glutamato em excesso tem como consequência o fenômeno chamado de excitotoxicidade, que é a sinalização excessiva de glutamato em regiões cerebrais que leva a uma retração dendrítica, reduzindo, com isso os receptores de glutamato e como consequência final, trazem prejuízos aos mecanismos sinápticos, a comunicação neuronal, a sinaptogênese, trazendo perda da memória e do aprendizado (Sanacora et al., 2012).

A saber, sendo o glutamato o principal neurotransmissor excitatório do SNC, atuando em vias centrais do metabolismo e da sinalização cerebral, é de amplo conhecimento que alterações na homeostase glutamatérgica, que pode se dar devido a diferentes demandas ambientais, como o estresse por exemplo, induz importantes alterações no circuito neuronal, prejudicando a plasticidade sináptica, e consequentemente afetando processos fisiológicos e comportamentais, como memória, cognição e emocionalidade do indivíduo, podendo levar com isso, ao desenvolvimento de distúrbios emocionais, como o TDM (Ruggiero et al., 2011). Ademais, a exposição frequente ou prolongada a eventos estressores externos, podem desencadear alterações na neurotransmissão glutamatérgica, como uma resposta fisiológica e comportamental, que cronicamente acarreta, por exemplo, em mudanças funcionais persistentes, devido ao aumento da dosagem de hormônios como o cortisol, em humanos, produzido na suprarrenal.

Dessa forma, disrupções na homeostase glutamatérgica, através do estresse, podem acarretar em alteração nos mecanismos moleculares específicos, que envolvam, em grande parte, a sinalização glutamatérgica, como por exemplo, a modulação de canais de sódio e de cálcio, pela hiper estimulação dos receptores NMDA, que tem como consequência a ativação de vias envolvidas em mecanismos de sinaptotoxicidade e de neurodegeneração (Ruggiero et al., 2011).

Outro estudo que mostrou o antagonismo glutamatérgico, que parece desempenhar um papel importante no bloqueio dos sistemas hiperativo, no córtex frontal de ratos, desencadeando em transtornos, como o de depressão maior. (Sanacora et al., 2012). Ademais, novas pesquisas sugerem que o estresse leva a déficits de ácido gama-aminobutírico (GABA), associado a um aumento da neurotransmissão excitatória do glutamato, mecanismos envolvidos na patogênese do TDM e para provar isso, ressonância magnética feita em humanos, analisaram as respostas cerebrais na via glutamatérgica, diante de estímulos emocionais negativos e observaram o aumento da estimulação de estruturas límbicas, como a do córtex frontal, da amígdala, regiões relevantes no controle do medo e da reatividade emocional e também responsáveis por estados fisiológicos internos, envolvidos como as

emoções, e essas neuroimagens detectaram uma inadequação adaptativa do córtex frontal, diante de estímulos desencadeados pelo estresse e pela preocupação rigorosa e persistente, permitindo com isso, a busca pela tentativa de elucidação do sistema glutamatérgico e seus mecanismos, no desenvolvimento no TDM (Boff et al., 2021).

Ademais, Grimm em seus estudos, mostrou que o estresse crônico impacta fortemente no sistema glutamatérgico, pois o aumento da liberação de glicocorticoides (cortisol em humanos ou corticosterona em roedores) tem a capacidade de aumentar a liberação, ou reduzir a depuração do glutamato na fenda sináptica, e com isso há uma hiper estimulação da neurotransmissão glutamatérgica, principalmente em regiões como a do córtex frontal e da amígdala (Grimm et al., 2012).

Estudos feitos por Nagy e colaboradores, em análise de cérebro de humanos *post mortem*, apontaram que a depuração anormal do glutamato, altera o metabolismo e a modulação energética dos astrócitos, levando a diferenças significativas nos padrões de metilação astrocitária e como consequência, o surgimento do TDM (Nagy et al., 2015). Ainda, estudos atuais, com técnica de análise de biologia molecular, demonstraram, com clareza, que o glutamato poderá estar alterado, tanto no líquido cefalorraquidiano, com glutamina aumentada, quanto em plasma e em tecido cerebral, com glutamina reduzida (Levine et al., 2000). Assim também, níveis diminuídos de metabólitos de glutamato no córtex frontal medial, assim como em outras regiões cerebrais, sugerem fortíssima relação com a fisiopatologia da depressão (Moriguchi et al., 2019).

Assim estudos *post-mortem* já indicaram anormalidades das células gliais, cujo papel é a remoção sináptica do glutamato, e essa associação com a fisiopatologia dos transtornos de humor (Khoodoruth et al., 2022). Níveis diminuídos de glutamina/glutamato também foram encontrados no córtex frontal de pacientes com TDM (Khoodoruth et al., 2022). Ainda, um grande número de estudos clínico, com animais, tem demonstrado alterações no sistema glutamatérgico, em várias áreas límbicas e corticais do cérebro (Hasler et. Al., 2007) e (Sanacora et al., 2004). Além disso, dados *post mortem* de histopatologia (Feyissa et al., 2008) e uma série de estudos utilizando técnicas de neuroimagem (Sanacora et al., 1999), indicaram uma forte associação do sistema glutamatérgico com alterações mal adaptativas na estrutura e funções dos circuitos excitatórios cerebrais. Complementar a estes dados, estudos já observaram expressão diminuída dos receptores NMDA (Feyissa et al., 2008) e subunidades do receptor AMPA (Yuen et al., 2011), no córtex pré-frontal de indivíduos deprimidos. A expressão reduzida das subunidades do receptor NMDA, também foi observada nos cérebros *pós-mortem* de vítimas de suicídio (Gray et al., 2015). Além disso, a perda de neurônios glutamatérgicos no córtex orbitofrontal, está associada à fisiopatologia da depressão

(Raykowska et al., 2005). Essas evidências sugerem o envolvimento do sistema glutamatérgico com a fisiopatologia do TDM.

Haja vista o grande envolvimento da neurotransmissão glutamatérgica com o TDM, explorar novas vias de neurotransmissão que direta ou indiretamente são capazes de modular a liberação ou a captação de glutamato na fenda sináptica, vêm ganhando destaque nas áreas da neurociência e psicofarmacologia. Dentre as diversas vias capazes de influenciar a neurotransmissão do glutamato, com grande destaque infere-se que a modulação do sistema purinérgico pode ser uma estratégia importante, capaz de influenciar a homeostase do glutamato. Afinal, como demonstrado em estudos anteriores por Kaster, o efeito antidepressivo da adenosina, poderá ocorrer, pois essa neurosubstância é capaz de ativar os receptores de P1, que podem mediar a estimulação de receptor em A1, que em baixas concentrações, induz a diminuição da liberação de glutamato e conseqüentemente a redução da ativação dos receptores NMDA (Kaster, et al., 2-12). Ainda sobre a modulação dos receptores P1 de adenosina, através do antagonismo dos receptores A2a de adenosina, estudos anteriores também já observaram um efeito do tipo antidepressivo em modelos roedores para o estudo do TDM (Walter et al., 2009). De fato, mais pesquisas com foco no sistema purinérgico são consideradas de grande potencial para ampliar o entendimento da fisiopatologia do TDM e vislumbrar potenciais novas drogas.

### **1.10. Sistema Purinérgico**

Os receptores purinérgicos estão amplamente distribuídos no SNC, inclusive em regiões ligadas ao sistema límbico, como o CPF, hipotálamo e hipocampo, atuando na homeostase de neurônios, de células da glia, na modulação de neurotransmissores, no processo de neuro-inflamação e de mielinização (Andrejew et al., 2021).

Com relação às purinas, derivadas da guanina, essas são compostas pelos nucleotídeos: GTP (guanosina trifosfato), GDP (guanosina difosfato), e GMP (guanosina monofosfato), e o nucleosídeo é: GUO (guanosina). Já as purinas derivadas da adenina, podemos citar ATP (adenosina trifosfato) e ADP (adenosina difosfato) e AMP (adenosina monofosfato) e o nucleosídeo ADO (adenosina). Diferentemente das purinas derivadas da guanina, considerando especificamente os nucleotídeos derivados da adenina e nucleosídeo adenosina esses têm suas ações bem elucidadas, mediadas pelos receptores P2 e P1 respectivamente (Andrejew et al., 2021). Nota-se uma semelhança entre os nucleosídeos purinérgico pois ambos se acumulam, progressivamente em condições fisiológicas e em resposta a uma situação de estresse (Andrejew et al., 2021). Assim, estudos em ratos, já demonstraram a ação modulatória de receptores adenosinérgicos em nucleotídeos e nucleosídeos, pela administração sistêmica de

GUO (Almeida et al., 2010), todavia, são necessários mais estudos que busquem entender os mecanismos e ações envolvidas nas purinas, derivadas da guanina.

A sinalização extracelular do ATP é mediada pelos receptores do sistema purinérgico, através da ativação dos receptores do tipo P2, sendo os receptores P2X ionotrópico e os receptores P2Y metabotrópicos (Abbracchio et al., 2009). Ademias, os nucleosídeos, são ativados através dos receptores de P1, que são subdivididos em A1, A2a, A2b e A3, tendo a adenosina como seu sítio de ação, já o P2, tem os nucleotídeos como mediadores da sua sinalização (Abbracchio et al., 2009). Assim sendo, as purinas podem exercer tanto funções fisiológicas, quanto patológica no SNC, a depender de seu local de atuação e a concentração que estará depositada nessas regiões (Andrejew et al., 2021).

Assim sendo, os nucleotídeos podem ser acoplados em células neuronais, especificamente, dentro de suas vesículas sinápticas, para posteriormente serem liberados na fenda sináptica (Santos et al., 2006). Após sua liberação eles podem atuar em seus respectivos receptores ou ainda podem ser hidrolisados pelas ectonucleotidases, no meio extracelular e formar seus respectivos nucleosídeos. Ademais, as ectonucleotidases realizam o metabolismo extracelular das purinas, que através de uma cadeia enzimática, hidrolisa o ATP a AMP, caso uma nova hidrólise ocorra, será formado a adenosina (ADO), como produto final (Yegutkin, 2014). Dessa forma, o ATP pode ser liberado por diversos mecanismos, ou hidrolisado pelas ectonucleotidases, formando a adenosina, que atua no receptor P1, ou pode retornar ao citoplasma, pelos transportadores de nucleosídeo e ou ser desaminada e metabolizada em ácido úrico. Já os produtos de degradação do ATP, enquanto nucleotídeos têm capacidade de atuar nos receptores purinérgicos P1 e P2 (Menzies et al., 2017).

Dessa forma, tanto os nucleosídeos, quanto os nucleotídeos, conseguem atuar no SNC de diversas maneiras, uma vez que o corpo celular, a glia, os axônios e os dendritos podem liberar o ATP e havendo a hidrólise do ATP, vai ser gerado a adenosina que permite que eles atuem tanto como neurotransmissor, quanto neuromodulador (Burnstock, 2006).

### **1.10.1. Receptores de Adenosina P1: A1 e A2a**

Os receptores de P1 podem ser encontrados em diversas áreas cerebrais e se acoplam a proteína G, tendo sítio de ligação extracelular para adenosina e incluem os subtipos adenosinérgicos: A1, A2a, A2B e A3, que podem formar heterodímeros com os receptores metabotrópicos de glutamato do tipo 1 e tipo 5 (Ciruela et al., 2001). Assim, A1 poderá inibir a liberação de glutamato pré-sináptico, pois se liga a proteína G inibitória, já A2a poderá facilitar a liberação de glutamato pós-sináptico, por se acoplar a proteína G estimulatória, tornando o heterômero capaz de desencadear sinais opostos, que poderão afetar a via

intracelular dependente de AMPc, também, tem se notado que o glutamato poderá induzir o acúmulo extracelular de ADO (Ciruela et al., 2001). Assim também, A2a é capaz de promover a sinalização do receptor de dopamina D2, pela elaboração de heterodímeros, sendo que a porção extra-estriatal facilita a liberação de noradrenalina e GABA (Cunha, 2005).

Assim, estudos mostram que os níveis baixos de adenosina estão ligados ao heterômero do receptor A1, ativando à proteína G inibitória, reduzindo a ativação da adenilato ciclase (AC) e da proteína quinase A (PKA), e estimulando à liberação de glutamato na fenda sináptica (Dias, 2013). De outra forma, quando os níveis de adenosina estão aumentados, sua ligação favorece o acoplamento ao receptor A2a, o que reduz a ativação de A1a e, por meio da proteína G estimulatória, ele associa-se a cascata AC/AMPc/PKA, resultando no aumento da liberação de glutamato (Dias, 2013).

Segundo Coelho, a super expressão de receptores A2a está associada ao aumento do comportamento semelhante à depressão, mas antagonistas seletivos dos receptores A2a, como as drogas: agomelatina e a tianeptina, aumentam a atividade antidepressiva, comprovada por testes comportamentais para o TDM, como o do estresse crônico moderado (Coelho et al, 2014).

### **1.10.2. Receptores de Purinas P2: P2X / P2Y**

Segundo Jacobson (Jacobson, 2021), dentre as duas famílias de receptores purinérgicos do tipo P2, podemos classificá-los em P2Y (GPCRs, numerados em: 1,2,4,6,11,12,13 e 14) que pertencem a uma família de receptores acoplados à proteína G e ativam, de forma um pouco mais lenta, um número significativo de vias intracelulares. Já o P2X é numerado em: 1,2,3,4,5,6,7 e estão distribuídos amplamente nos tecidos, tendo canais iônicos ligantes de membrana, permeável ao sódio, cálcio, potássio, que se abrem após contato com o agonista ATP (Jacobson et al., 2021). A saber, o ATP extracelular tem sua ação mediada, na superfície celular, pela ativação dos receptores P2Y e P2X (Jacobson et al., 2021).

Assim, Basso e colaboradores (Basso, 2009), mostraram que antagonistas dos receptores P2 parecem ser alvo bastante promissor para o tratamento da TDM, sendo o P2X7 de grande importância, pois o polimorfismo de nucleotídeo único (SNPs), no gene de P2X7, sugere estar intimamente associado à suscetibilidade em desenvolver o TDM, pelo aumento na liberação de IL-1 $\beta$ , em resposta ao ATP (Basso, 2009). Já estudos pré-clínicos com camundongos modificados geneticamente por P2X7, mostraram possíveis mecanismos para o fenótipo antidepressivo, que podem ser explicados devido ao aumento na produção basal de BDNF, pois a neurogênese aumentada no giro denteado, bem como o aumento da biodisponibilidade de serotonina no hipocampo, levam à redução e ou ao bloqueio na liberação

de glutamato (Csolb, 2013). Com relação aos receptores P2Y1, estudos têm mostrado sua relação com diversos transtornos psiquiátricos como o TDM, ansiedade, esquizofrenia (Basso, 2009).

Por todo conteúdo exposto, estudos pré-clínicos ratificam o envolvimento do sistema purinérgico no desenvolvimento do TDM, havendo a necessidade de ampliar os conhecimentos e a compreensão sobre os mecanismos envolvidos no desenvolvimento desse transtorno. Com isso, a utilização de modelo animal para roedores, que acople a validade preditiva, constructo de face e com potencial translacional, como a OBX consegue abranger, sugere ser uma importante estratégia para expandir a compreensão sobre a modulação purinérgica e o TDM (Almeida et al.,2021). Neste sentido, essa dissertação visa investigar as possíveis alterações na expressão gênica dos receptores P1 (ADORA1 e ADORA2a) e P2 (P2X7 e P2Y1) de purina na região do córtex frontal, em ratos *Wistar*, submetidos ao modelo de Depressão Maior da Bulbectomia Olfatória (OBX).



## **2. Justificativa**

Considerando que amplas evidências indicam que (1) dentre todas as patologias que constituem os transtornos mentais e de comportamento, o TDM é uma das desordens psiquiátricas mais prevalentes, (2) que os mecanismos envolvidos na fisiopatologia do TDM não estão totalmente elucidados, (3) que evidências sustentam que o sistema purinérgico está fortemente relacionado com as bases neurobiológicas deste transtorno, utilizando o modelo bem caracterizado e com potencial translacional da bulbectomia olfatória em ratos, buscamos nesta dissertação investigar as possíveis alterações na expressão gênica dos receptores P1 (ADORA1 e ADORA2a) e P2 (P2X7 e P2Y1) de purina, na região do córtex frontal, em ratos Wistar, submetidos ao modelo de Depressão Maior da Ablação Bilateral do Bulbo Olfatória (OBX).

### 3. Objetivos

#### 3.1. Objetivo Geral

Investigar as possíveis alterações na expressão gênica dos receptores P1 (ADORA1 e ADORA2a) e P2 (P2X7 e P2Y1) de purinas na região do córtex frontal em ratos *Wistar* submetidos ao modelo de Depressão Maior da Bulbectomia Olfatória (OBX).

#### 3.2. Objetivos Específicos

- Avaliar parâmetros comportamentais relacionados ao fenótipo do tipo depressivo em ratos *Wistar* submetidos à OBX nos testes do *Splash Test*.
- Analisar a expressão gênica por RT-qPCR dos seguintes receptores P1 de adenosina: ADORA1, ADORA2a na região do córtex frontal;
- Analisar a expressão gênica por RT-qPCR dos seguintes receptores P2 de purina: P2X7 e P2Y1 na região do córtex frontal.

### 4. Materiais e Métodos

#### 4.1. Drogas

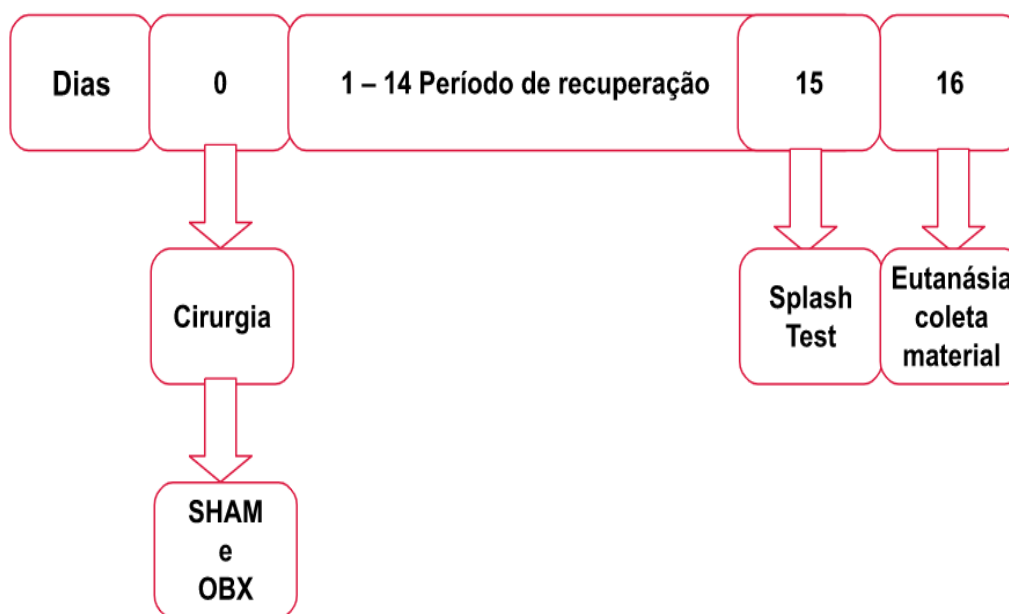
Para a realização da Bulbectomia Olfatória, seguindo o protocolo, foram utilizados os seguintes anestésicos: Cetamina 80mg/kg e Xilazina 10mg/kg, ambos adquiridos da empresa Syntec-tecnologia farmacêutica. Antibiótico Pentabiotico, 22.000 UI/kg, i.m., da Zoetis. Anti-inflamatório: Ketojet, 5mg/kg, i.m., adquirido da Agener União.

#### 4.2. Animais

Os animais foram fornecidos pelo Centro de Ciências Animal da Universidade Federal de Ouro Preto e toda parte experimental foi realizada no Laboratório de Fisiologia Cardiovascular dessa mesma Instituição. Vinte e quatro ratos *Wistar*, machos, com idade de sete semanas, pesando cerca de 250g, foram mantidos sob um ciclo claro/escuro de 12 horas, com luz acesa às 7:00h e apagada às 19:00h, mantidos a  $22 \pm 1$  °C em gaiolas de polipropileno (30 × 20 × 13 cm), sendo mantido quatro animais por gaiola, tendo água e ração *ad libidum* em livre demanda. Os procedimentos experimentais obedeceram às normas oficiais do Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA – Brasil) e os cuidados no uso de animais de laboratório foram aprovados pelo Comitê de Ética da Universidade Federal de Ouro Preto - Minas Gerais, sendo a aprovação do Projeto nº 3596151019.

### 4.3. Delineamento Experimental

Os animais, ratos *Wistar*, com vinte e um dias de nascimento, foram retirados do Centro de Criação de Animais (CCA) da Universidade Federal de Ouro Preto, e transferidos para o biotério do Laboratório de Fisiologia Cardiovascular (LFC) da UFOP. Em seguida, eles foram distribuídos em seis caixas de polietileno, sendo quatro animais por caixa, e ficaram sob cuidados, até atingirem sete semanas de vida, sendo manipulados, visando a adaptação do animal com o pesquisador e a redução do estresse. Inicialmente ao procedimento experimental, os animais foram separados por randomização, em dois grupos, sendo com 12 ratos para o grupo controle Sham e 12 para o grupo OBX. Para realização do experimento, a técnica cirúrgica da Bulbectomia Bilateral Olfatória – OBX, se deu no dia zero, em seguida foi administrado uma dose única de antibiótico e uma de anti-inflamatório, seguida de outras três doses, nos dias subsequentes (1° – 3° dia) de Ketojet, os animais foram mantidos no período pós operatório (1° - 14° dia), em gaiolas, isolados e no 15° dia foram submetidos ao teste comportamental: Splash Test e por fim, no 16° dia, foi feita a eutanásia, com posterior coleta da estrutura cerebral do córtex frontal, conforme ilustra o fluxograma abaixo.



**Figura 1: Fluxograma experimental:** O cronograma experimental consistiu em submeter os animais, no dia zero, a cirurgia da ablação bilateral dos bulbos olfativos no grupo OBX e no grupo SHAM a apenas uma craniotomia nas coordenadas do bulbo olfatório. Após o período de recuperação, que se deu até o 14° dia, os animais foram submetidos, no dia 15, ao teste comportamental: Splash Test, por fim, no dia 16, foi realizada a eutanásia e a região do córtex frontal foi dissecada e armazenada em mini tubos livre de RNA/DNA a -80 °C, para posterior análise bioquímica.

Anterior à eutanásia dos animais, eles foram anestesiados com Cetamina (80 mg/kg, i.p.) e Xilazina (10 mg/kg, i.p.). Em seguida os cérebros foram removidos e as estruturas de córtex frontal foram dissecadas, colocadas separadamente em mini tubos livre de RNA/DNA. Imediatamente após coleta, todas as amostras foram congeladas a  $-80^{\circ}\text{C}$ , para posterior análise bioquímica pela técnica de RT-qPCR.

#### **4.4. Supressão do Bulbo Olfatório – OBX**

Conforme já descrito na literatura e tomando por base o autor (Almeida et al., 2017) a cirurgia para ablação bilateral dos bulbos olfativos foi realizada. Os ratos foram anestesiados com uma aplicação intraperitoneal (i.p.) de xilazina (10 mg/kg) e de cetamina (80 mg/kg), diluída em solução salina (SF 0,9%). Após posicionar o animal no estereotáxico, o crânio foi exposto por uma incisão no couro cabeludo, a localização do perióstio foi raspada, com isso a região do bregma ficou exposta e nas coordenadas de 7mm anterior ao bregma e 2 mm anterolateral, foi feita a craniostomia. Ambos os bulbos olfatórios foram destacados com o auxílio de uma tesoura, e em seguida foram removidos por sucção com uma pipeta *Pasteur*. Os animais SHAM receberam o mesmo tratamento cirúrgico, porém os bulbos olfatórios foram deixados intactos. Após realização da cirurgia, os animais foram suturados e conduzidos até o pós-operatório, por um período de 14 dias. Logo após o procedimento cirúrgico, os animais receberam dose única de antibiótico, Pentabiótico, 22.000 UI/kg, i.m. e quatro doses diárias de anti-inflamatório Ketojet, 5mg/kg, i.m. Todavia, após eutanásia dos animais, constatou que dois animais apresentaram remoção incompleta dos bulbos e por isso, tiveram de ser excluídos do estudo.

#### **4.5. Teste Comportamental**

Assim sendo, no 15º dia após a cirurgia da OBX, os animais foram submetidos ao teste comportamental, visando avaliar os parâmetros de motivação e de anedonia; Dessa forma, o teste comportamental se deu entre 9h e 17h, sendo que a aclimatação dos animais, na sala de experimentos, ocorreu duas horas antes do teste comportamental, com iluminação adequada (100Lux) e somente depois do período de habituação, na mesma sala, é que os animais iniciaram o teste.

##### **4.5.1. Splash Test**

A fim de avaliar parâmetros de anedonia e de motivação nos animais, o teste do Splash Teste foi realizado, de acordo com o autor (Almeida et al., 2017). A saber, esse teste consiste

em “borrifar” uma solução de 10% de sacarose no dorso do animal à medida em que a viscosidade da solução de sacarose entra em contato com o pelo dos animais, isso propulsiona os animais a iniciarem um comportamento de *grooming*, que é relacionado à autolimpeza e ao autocuidado. Diante disso, os animais foram colocados, a cada momento um, em novas caixas de polipropileno (30 × 20 × 13 cm), que após cada teste, era limpa e higienizada com álcool 70%. Nesse protocolo, foi avaliado o tempo de *grooming* de cada animal, o período de latência para o primeiro episódio em um intervalo de tempo de 15 minutos, foram cronometrados por um experimentador treinado e cego aos grupos experimentais.

#### 4.6. Eutanásia

Após a realização do teste comportamental, esperou-se 60 minutos, em seguida os ratos foram anestesiados com xilazina (6 mg/kg) e cetamina (100 mg/kg), seguindo às diretrizes da prática de eutanásia do CONCEA, em seguida foram decapitados, o cérebro foi removido, sendo o córtex frontal dissecado, armazenados em mini tubos livre de RNA/DNA, imediatamente congelados em nitrogênio líquido e em seguida foram encaminhados para o freezer -80°C, para posterior análise bioquímica.

#### 4.7. Expressão Gênica por qRT-PCR

Para avaliação dos parâmetros de expressão gênica do córtex frontal, esse tecido foi descongelado em temperatura ambiente, pesado e mantido em gelo – dando menos de 100g nos tecidos dos diversos animais analisados. Após, o tecido foi macerado usando 1000µl de TRIzol™ Reagente (*Invitrogen™*) e a mistura foi redirecionada para *ependorfs* de 1,5ml RNA/DNA free. Usando o protocolo do fabricante do kit, *SV Total RNA Isolation System*, catálogo: Z3100, a extração de RNA se deu. Em seguida o material foi quantificado em espectrofotômetro, *Espectrofotometro NanoDrop™ Lite Thermo Scientific™*, na absorbância 260/280 e somente os que foram lidos acima de 140ng/µL de RNA, foram considerados para continuidade do experimento. Logo após, a integridade da amostra foi verificada em gel de agarose de 1,2% e avaliada em *Transluminador UV Doc 400i Delpho* em cone. Em seguida, o cDNA foi sintetizado com o Sistema de Transcrição Reversa (*Applied Biosystems-Kit-High Capacity cDNA Reverse Transcriptase* Catálogo:4368814) a partir de 1.5µg de RNA, de acordo com as instruções do fabricante. A reação de RT-PCR foi realizada com o PCR *Master Mix (Energizar™ SYBR™ Green Master Mix(2x))* em um volume final de 10µL. As configurações de ciclos consistiram em 2 min a 95 ° C; 30 s a 95 ° C; 30 s a 60 ° C; e 30s a 72 ° C por 35 ciclos; e 5 minutos finais a 72 ° C e 4 ° C. O gene de referência utilizado

foi GAPDH. O controle negativo foi realizado substituindo as amostras de RNA por água destilada livre de *DNase/RNase* em cada reação de RT-qPCR. A análise de RT-qPCR em tempo real foi realizada no *StepOne™* Instrumento de Sistemas de PCR em Tempo Real (*Biosistemas Aplicados®*, Foster City, CA) usando *PowerUp SYBR™ Green Master Mix* (*Thermo Fischer Scientific™*, CAT A25742), de acordo com as instruções do fabricante e respectivos primer's direto e reverso (7  $\mu$ M). Os valores dos reagentes usados neste experimento foram calculados sob as instruções do fabricante.

#### 4.8. Análise estatística

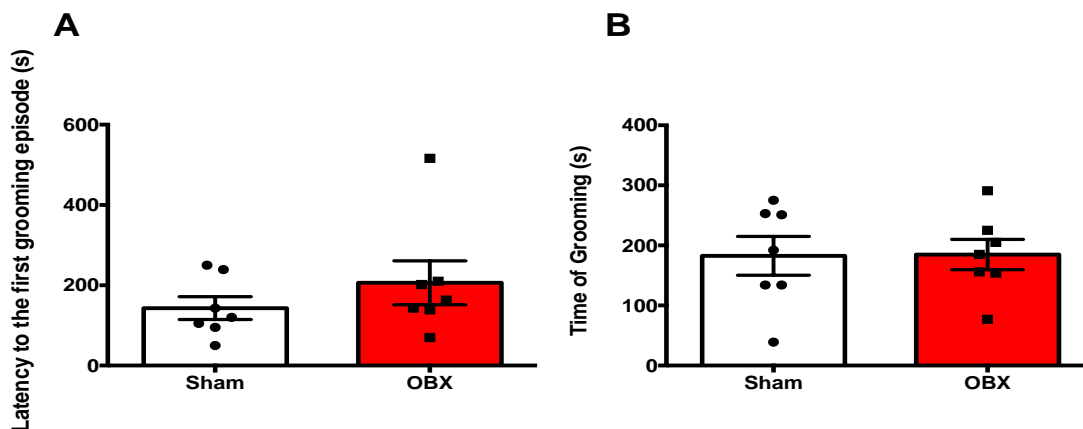
Para a análise comportamental no Splash Test, foi realizado o teste T de *student* não pareado. Para as análises de expressão gênica por qRT-PCR para os diferentes genes analisados foi realizado o teste T de *student* não pareado. Para os tratamentos estatísticos foi utilizado o *software Graph Pad Prism* (*Graph Pad Software*, versão 8, San Diego, CA, EUA). As diferenças foram consideradas estatisticamente significativas em  $p < 0,05$ .

Para os experimentos de qRT-PCR, foi também calculado o tamanho de efeito, para isso foi utilizado o site *Effect Size Calculator for T-Test (Cohen's d)*: <https://www.socscistatistics.com/effectsize/default3.aspx>. Para valor de "d", no intervalo de 0.1 a 0.3, foi considerado um tamanho de efeito 'pequeno'; intervalos entre 0.4 a 0.7 um tamanho de efeito 'médio'; para valores superiores a 0.8, um tamanho de efeito 'grande'. A arte gráfica final foi realizada com o *software Graph Pad Prism* (*Graph Pad Software*, versão 8, San Diego, CA, EUA)

### 5. Resultados

#### 5.1. Resultado teste comportamental - Splash Test

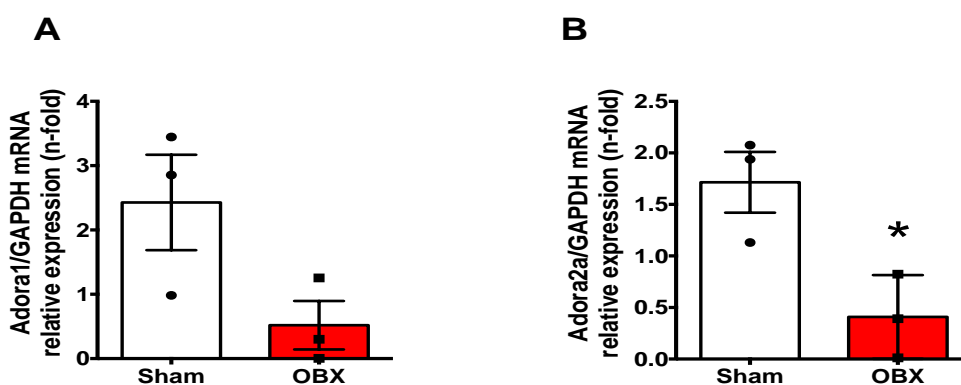
No Splash Test não foi observado nenhuma diferença no parâmetro de latência para o primeiro episódio de *grooming* (autolimpeza) comparando os animais do grupo OBX (Fig 2A; OBX  $206.1 \pm 54.54$ ) com o grupo Sham (Fig 2A Sham  $143.1 \pm 28.28$ ); (Figura 2A,  $p=0.3254$ ). Da mesma forma, no parâmetro de tempo total de *grooming* (autolimpeza), nenhuma diferença foi observada comparando o grupo OBX (Fig 2B OBX  $184.7 \pm 25.21$ ) com o grupo Sham (Fig 2B Sham  $182.6 \pm 32.22$ ) (Figura 2B,  $p=0.5991$ ). Contudo, levando em consideração o tamanho de efeito (cohen's  $d = 1,450$ ), uma grande diferença entre as médias dos dois grupos foi observada.



**Figura 2. Teste Comportamental do Splash Test:** Os dados foram expressos como média +/- desvio padrão da média ( $n=3-4$  animais por grupo). A análise estatística foi realizada por teste *t* de Student não pareado e uma diferença estatística de  $*p < 0.05$  foi considerada significativa comparando os dois grupos experimentais.

## 5.2. Expressão gênica de receptores purinérgicos P1 (ADORA1, ADORA2a) em córtex frontal.

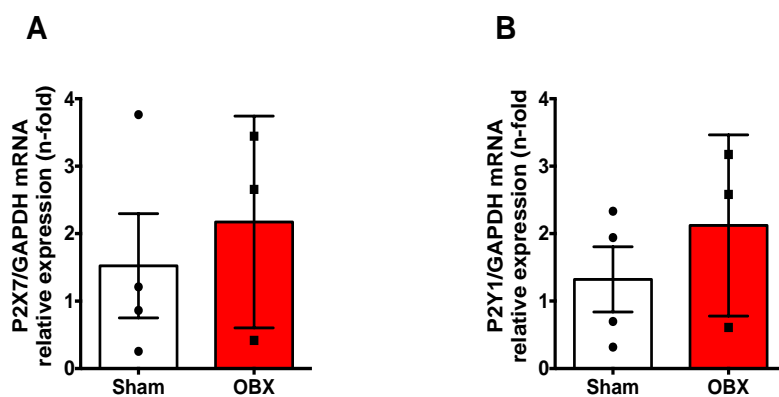
Observamos uma diminuição na expressão relativa de mRNA dos receptores A2a de adenosina no córtex frontal dos animais OBX ( $0.408 \pm 0.23$ ), em comparação com os animais pertencentes ao grupo Sham ( $1.715 \pm 0.29$ ) (Fig. 3B;  $p=0.0256$ ). Com relação aos receptores A1 de adenosina não houve alteração nos níveis de mRNA em córtex frontal comparando os grupos Sham e OBX (Fig. 3A;  $2.427 \pm 0.74$  e  $0.519 \pm 0.37$ , respectivamente)  $p=0.0837$ . E por fim, observamos um efeito grande para os receptores A1 (Cohen's  $d = 3.2614$ ), assim como para os receptores A2a (Cohen's  $d = 4.993$ ).



**Figura 3 - Expressão gênica em P1 (ADORA1, ADORA2a) em córtex frontal:** Os dados foram expressos como média +/- desvio padrão da média ( $n=3-4$  animais por grupo). A análise estatística foi realizada por teste *t* de Student não pareado e uma diferença estatística de  $*p < 0.05$  foi considerada significativa comparando os dois grupos experimentais.

### 5.3. Expressão gênica de receptores purinérgicos P2 (P2X7, P2Y1) em córtex frontal

Considerando os receptores P2 avaliados, nenhuma alteração na expressão relativa dos receptores P2X7 (Fig. 4A; Sham  $1.523 \pm 0.77$  e OBX  $2.173 \pm 0.90$ ), assim como dos receptores P2Y1 (Fig. 4B; Sham  $1.322 \pm 0.48$  e OBX  $2.12 \pm 0.77$ ) foram observados. Considerando o tamanho de efeito para os receptores P2X7 um efeito médio foi observado (Cohen's  $d = 0.776$ ), enquanto um efeito grande para os receptores P2Y1 (Cohen's  $d = 1.243$ ), foi observado.



**Figura 4 - Expressão gênica em P2 (P2X7 e P2Y1) em córtex frontal.** Os dados foram expressos como média +/- desvio padrão da média ( $n=3-4$  animais por grupo). A análise estatística foi realizada por teste *t* de Student não pareado e uma diferença estatística de  $*p < 0.05$  foi considerada significativa comparando os dois grupos experimentais.



## 6. Discussão

Nessa dissertação exploramos às alterações comportamentais em ratos *Wistar*, submetidos ao modelo de TDM da OBX. Dessa forma, demonstramos, pela primeira vez, que os animais submetidos ao modelo de depressão da OBX, apresentaram importantes alterações na expressão de genes do sistema purinérgico, na região do córtex frontal. Comparando às médias entre a latência para o primeiro episódio de *grooming*, observamos um grande tamanho de efeito para início da atividade de autolimpeza (latência de *grooming*) do grupo OBX, em comparação com o grupo controle Sham, demonstrando um possível desenvolvimento de um fenótipo do tipo depressivo no grupo OBX. Concomitantemente, foi possível observar uma diminuição na expressão do receptor A2a, de adenosina, em córtex frontal, além de um grande efeito na redução da expressão do receptor A1 comparando as médias do grupo controle (Sham), com o grupo com o fenótipo do tipo depressivo (OBX). Da mesma forma, notou-se um importante efeito no aumento da média, na expressão dos receptores P2Y1, no grupo com fenótipo do tipo depressivo.

Considerando o conceito de pesquisa exploratória, cunhada por Kimmelman (Kimmelman, 2014), que destaca o objetivo das pesquisas exploratórias em gerar novas teorias sobre a fisiopatologia de diferentes doenças, possibilitando a utilização de abordagens estatísticas mais amplas do que as usualmente utilizadas, nosso estudo se apropria desse conceito experimental, desde a apresentação dos resultados até a discussão que se inicia. Neste contexto, é importante enfatizar que os estudos exploratórios, usualmente, consistem em experimentos com um menor número de amostras e mais flexíveis. Os estudos exploratórios são muitas vezes conduzidos com o objetivo de criar novas hipóteses ao invés de responder perguntas (estudos confirmatórios). Assim, é importante destacarmos que ao calcularmos o tamanho da amostra no projeto de pesquisa que antecedeu a obtenção destes resultados, considerando poder estatístico de 80% e um alfa de 0.05, estipulamos que o número de indivíduos no estudo seria de doze animais por grupo experimental (Kimmelman, 2014).. Com isso, os resultados e a discussão aqui apresentados terão como base a primeira coorte experimental analisada com um “n” de 6 a 7 animais por grupo para a parte comportamental e 3 e 4 para as análises bioquímicas.

Segundo Ramaker (Ramaker, et. al., 2017), a OBX é um modelo que preenche muito dos critérios necessários para o estudo do TDM, por seu alto poder translacional, apresentando validade de constructo, de face e preditivo. Assim, as bases teóricas que sustentam as alterações encefálicas induzidas pela OBX, e que se assemelham às encontradas em pacientes com TDM, predizem que a partir do rompimento das projeções nervosas dos bulbos olfativos ao telencéfalo rostral, que por sua vez faz extensivas conexões eferentes às regiões mesocorticolímbicas e subcorticais, leva a importantes alterações neuroquímicas em diferentes estruturas cerebrais que compreendem estas áreas (Song and Leonard 2005). Como

consequência, há prejuízo direto em componentes comportamentais e emocionais, dentre essas alterações é possível observar a desmotivação e anedonia. (Ramaker, et. al., 2017). Assim, considerando os dados aqui obtidos, demonstramos que os animais do grupo OBX não diferem no grupo Sham nos parâmetros explorados no Splash Test, contudo calculando o tamanho do efeito, foi possível observar que o grupo OBX apresenta apenas um aumento na média para realizar o primeiro episódio de grooming, em comparação ao grupo Sham, sugerindo o desenvolvimento do perfil anedônico nesse grupo.

Na literatura, o efeito do tipo anedônico, observado no modelo do OBX, parece ser altamente reproduzível (Surger et al., 2008). Assim, explorando estes achados, observamos que em apenas um dos estudos (Yafei et al., 2021), que realizaram o *Splash Test*, com ratos Wistar, substancial diferença no protocolo experimental foi diagnosticada, visto que, enquanto que no nosso estudo avaliamos os animais em caixas de acrílico transparente, durante 15 minutos, no estudo de Yafei (Yafei, et. al., 2021), os animais foram observados por 5 minutos na própria “*home cage*”. Considerando que animais OBX apresentam, além do fenótipo do tipo depressivo, um aumento de ansiedade (Song, et. al, 2005), principalmente em ambientes novos (Almeida, R.F., et. al., 2017), um aumento da novidade durante a exposição dos animais utilizados no nosso estudo, durante o *Splash Test*, pode ser o responsável pela ausência de diferença nos parâmetros avaliados em comparação com o grupo Sham, mesmo em um teste com uma duração de tempo superior (15 minutos) quando comparado com outros dados da literatura em que o fenótipo foi avaliado por 5 minutos (Yafei, et. al., 2021).

Explorando os aspectos relacionados com a expressão de genes do sistema purinérgico, nossos dados indicam uma diminuição na expressão de genes relacionados com os receptores P1 (A1 e A2a) de adenosina, em córtex frontal, de animais submetidos ao modelo de TDM da OBX. Levando em consideração que após a ablação bilateral dos bulbos olfativos, há uma atrofia dos axônios que projetam-se para as áreas corticais, principalmente no córtex frontal, pertencente a área mesocortical, como descrito anteriormente (Song and Leonard, 2005), esta diminuição na expressão desses genes, pode ser resultado do impacto induzido pela OBX, no que diz respeito às alterações retrógradas, ainda em curso, após duas semanas da cirurgia OBX. Neste aspecto é importante ressaltarmos que mesmo diante da proximidade do córtex frontal, com os bulbos olfativos, que foram dissecados durante a cirurgia, após eutanásia dos animais, um pesquisador experiente ao modelo, observou minuciosamente, que nenhum dos animais incluídos no estudo, apresentavam quaisquer lesão na estrutura do córtex pré-frontal.

Mesmo que estudos, que buscam entender as alterações neuroquímicas e morfológicas no córtex frontal, induzidas pela OBX, ainda sejam escassos, pesquisas anteriores já evidenciaram que após a OBX, há um aumento da imunoreatividade para GFAP (Norden et. al., 2016), alterações em transportadores de serotonina e na sinalização da adenilil ciclase, em córtex frontal e parietal, de ratos jovens e envelhecidos (Slotkim, et.al., 1999), assim como

aumento dos níveis de receptores NMDA em córtex pré-frontal sem alterações em AMPA e Kainato (Greger, et. al., 2017). Com relação a marcadores inflamatórios Rinwa em 2013 mostrou que após a OBX há aumento de citocinas pró-inflamatórias, além de aumento de apoptose, corroborando com estudos do nosso grupo que também demonstrou aumentos de parâmetros pró-inflamatórias e alterações na homeostase redox que permaneceram em até dois meses após a OBX (Almeida, et. al., 2017). Por outro lado, estudos investigando parâmetros relacionados com a arborização e comprimento de dendritos em córtex pré-frontal, orbitolateral e infralímbico não observaram nenhuma alteração nestes parâmetros passados um mês da cirurgia de OBX (Morales-Medina et al., 2013), o que também corrobora com estudos do nosso grupo que demonstrou não haver alterações do tipo sinaptotoxicidade em preparações sinaptosomais de córtex frontal (Almeida, et. al., 2017). Nesta perspectiva, estes achados sugerem que a OBX pode resultar em modestas alterações anatômicas, mas severas, funcionais nas sub-regiões corticais frontais, o que parece mimetizar muitos dos aspectos neuroquímicos impactados em córtex pré-frontal de pacientes acometidos pelo TDM.

Estudos pré-clínicos, utilizando modelos animais de depressão, em roedores, já demonstraram que o tratamento com cafeína, um antagonista não seletivo dos receptores A1 e A2a de adenosina, produzem um efeito do tipo antidepressivo (Almeida, et. al., 2013) e indivíduos que consome doses moderadas de cafeína têm menor risco para desenvolver TDM (Almeida, et. al., 2013). Com relação aos efeitos exercidos pela cafeína, sugere-se que o antagonismo dos receptores A2a seja o principal mecanismo para explicar os efeitos antidepressivos observados (Borea, et.al., 2018). Sabe-se que os receptores A2a estão localizados pré e pós-sinápticamente, além de estarem presentes nos três diferentes tipos de células da glia (Borea, et. al., 2018), controlando a liberação e o efeito de uma variedade de neurotransmissores. Curiosamente, analisando nossos resultados em conjunto, observamos que um fenótipo do tipo anedônico acompanha uma diminuição na expressão dos receptores P1 em córtex frontal. Infelizmente, até o momento, nesse estudo, não foi possível realizarmos experimentos para quantificarmos os receptores, apenas a expressão, o que dificulta estabelecermos uma hipótese relacionada aos efeitos do impacto da OBX na sinalização dos receptores A1 e A2a em córtex frontal e o impacto das alterações em neurônios ou células gliais. Ao mesmo tempo a diminuição na expressão destes receptores podem estar relacionadas com uma diminuição no metabolismo em córtex frontal induzido por uma hiperativação do eixo HPA (Holsen, et. al., 2013) já que é bem estabelecido que animais OBX possuem altos níveis de corticosterona (Holsen, et. al., 2013). Neste sentido, um experimento que parece interessante, é avaliar o efeito desta modulação em animais submetidos a OBX e tratados com antagonistas de corticosterona.

Por fim, diante do grande impacto da sinalização de receptores do tipo P2 nos mecanismos neuro-inflamatórios (Krugel, 2016), e considerando que no córtex frontal há um

evidente aumento de citocinas pró-inflamatórias (Krugel, 2016), optamos por investigar a expressão do receptor P2X7. Dessa forma, nossos resultados, apontaram para um efeito intermediário comparando o aumento da média do grupo OBX com o grupo Sham, embora sem efeito estatístico. Diante desta constatação, é importante contextualizar que estudos anteriores já demonstraram que a ativação dos receptores P2X7 está envolvida com vias neuro inflamatórias associadas ao TDM (Krugel, 2016), além do mais, já foi demonstrado que a inibição farmacológica ou a manipulação genética de receptores P2X7 pode ser uma estratégia inovadora para o tratamento da TDM (Farooq, et. al. 2018). Nesse sentido, mesmo diante de uma diminuição no metabolismo celular devido ao aumento dos níveis de glicocorticoides, como mencionado anteriormente (Basso, et. al., 2009), ressaltamos que diante de um estresse celular as concentrações de ATP no espaço extracelular aumentam, o que pode ser suficiente para uma ativação dos receptores P2X7, e conseqüentemente gerando um aumento da expressão destes receptores, principalmente em micróglia (Yingbo et al., 2017). Ademais, estudos recentes vêm apontando que dentre os mecanismos envolvidos na fisiopatologia do TDM, está a ativação de micróglia (Huang et al., 2021), mais especificamente, estudos utilizando o modelo de TDM da OBX já demonstraram um aumento dos níveis de IBA-1 em córtex frontal e hipocampo de animais com fenótipo do tipo depressivo (Takahasi et al., 2018). Dessa forma, especulamos que o possível aumento da expressão dos receptores P2X7 pode ser uma das conseqüências funcionais de uma hiperativação deste receptor e está envolvida nas alterações induzidas pelo modelo e que deve ser mais explorados em estudos posteriores.

Além da avaliação dos receptores P2X7, também investigamos a expressão dos receptores P2Y1. Nossos resultados indicam para um efeito grande na expressão dos receptores P2Y1 em córtex frontal, comparando o aumento da média do grupo OBX com o grupo Sham. Curiosamente, estudos recentes conduzidos por Yu, observou que animais submetidos ao modelo de TDM do isolamento social, aumentaram a expressões de P2Y1R, colocalizados em células GFAP-positivos, no córtex frontal e hipocampo (Yu et al., 2022). Sabe-se que a ativação dos receptores P2Y1 está envolvida na plasticidade sináptica e envolvida nos mecanismos cognitivos (Wang et al., 2022), em que o acúmulo de ATP e ADP no espaço extracelular, contribui para um prejuízo no desempenho cognitivo e no controle do comportamento inibitório (Koch et. al., 2015). Neste sentido, nessa dissertação exploramos apenas comportamentos relacionados com desmotivação e anedonia, contudo, considerando o envolvimento dos receptores P2Y1 em parâmetros cognitivos e sua relação com o córtex pré-frontal, estudos posteriores, utilizando este modelo de depressão, podem trazer como perspectiva o aprofundamento das investigações nos mecanismos desta via de sinalização.

## **7. Conclusão:**

Em resumo, nessa dissertação observamos que ratos Wistar submetidos ao modelo de TDM da OBX apresentaram fenótipo do tipo depressivo, seguindo uma importante modulação na expressão gênica de receptores purinérgico em córtex frontal. A partir deste estudo inicial e exploratório, nossos resultados fornecem evidências adicionais sobre as alterações purinérgicas no modelo de TDM com alto potencial translacional. Ao mesmo tempo, nossos estudos trouxeram novas perspectivas, que merecem ser exploradas em novas pesquisas, que busquem entender os mecanismos fisiopatológicos da TDM.

## 8. Referências:

1. Porter, G.A., O'Connor, J.C. *Brain-derived neurotrophic factor and inflammation in depression: pathogenic partners in crime? World Journal of Psychiatry*. Psiquiatria Mundial. Baishideng Publishing Group Inc. J19 de janeiro de 2022; 12(1): 1-203. DOI: 10.5498/wjp.v12.i1.77.
2. Greenberg PE, Fournier AA, GBD. *Collaborators of Incidence and Prevalence of Diseases and Injuries. Global, regional and country incidence, prevalence and years lived with disability for 354 diseases and injuries for 195 countries and territories, 1990-2017: A systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2017*. Lanceta 2018;392: 1789-1858 [PMID:30496104. DOI:10.1016/S0140-6736(18)32279-7
3. Ferrari, A. J., Santomauro, D.F., Herrera, A.M.M., et. al., *Global, regional, and national burden of 12 mental disorders in 204 countries and territories, 1990–2019: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2019*; 137-150. doi.org/10.1016/S2215-0366(21)00395-3. PMID: 35026139
4. Wong, M.L. and J. Licinio, *Research and treatment approaches to depression*. Nat Rev Neurosci, 2001. 2(5): p. 343-51. PMID: 11331918
5. Mitchell AJ, Vaze A, Rao S. *Clinical diagnosis of depression in primary care: a meta-analysis*. Lanceta 2009;374:609-19. PMID: 19640579
6. Karyotaki, E., et al., *Combining pharmacotherapy and psychotherapy or monotherapy for major depression? A meta-analysis on the long-term effects*. J Affect Disord, 2016. 194: p. 144-52. PMID: 26826534
7. Czeh, B., et al., *Animal models of major depression and their clinical implications*. Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry, 2015. 64: p. 293-310. PMID: 25891248
8. Reus, G.Z., et al., *Neurochemical correlation between major depressive disorder and neurodegenerative diseases*. Life Sci, 2016. PMID: 2737093
9. Kessler RC, Bromet EJ. *The epidemiology of depression across cultures*. Annu Rev Public Health. 2013;34:119-38. PMID: 23514317. PMID: 23514317
10. Bromet E, Andrade LH, Hwang I, et al. *Transnational epidemiology of the major depressive episode in DSM-IV*. BMC Med 151.152 2011;9:90. doi: 10.1186/1741-7015-9-90
11. Samantha J Thomas 1, Mirae Shin, Melvin G McInnis, Jolene R.B. *Combination therapy with monoamine oxidase inhibitors and other antidepressants or stimulants: strategies for the management of treatment-resistant depression*. Pharmacotherapy. 2015. PMID: 25884531 DOI: 10.1002/phar.1576
12. Kessler RC, Berglund P, Demler O, Jin R, Merikangas KR, Walters EE. *How common are mental disorders? Evidence that rates of lifetime prevalence are doubled by prospective verification versus hindsight*. Psiquiatria Arch Gen 2005;62:593-602. doi: 10.1001/archpsyc.62.6.593

13. Kuehner C. *Why is depression more common among women than men?* Psychiatry Lancet 2017;4:146-58. PMID: 27856392
14. Monroe SM, Harkness K. *Recurrence in major depression: A conceptual analysis.* - 2011. Psychol Rev 118:655-674. doi: 10.1037/a0025190
15. Deutschenbaur L., Beck J., Kiyhankhadiv A., et. al. *Role of calcium, glutamate and NMDA in major depression and therapeutic application.* Neurofarmacology. 2015; 325-333. doi: 10.1016/j.pnpbp.2015.02.015
16. Goldberg D, Fawcett J. *The importance of anxiety in major depression and bipolar disorder* *Depress Anxiety* 2012; 29:471-78. PMID: 22553107
17. Gaspersz R, Lamers F, Kent JM, et ai. *Longitudinal predictive validity of the DSM-5 anxious distress specifier for clinical outcomes in a large cohort of patients with major depressive disorder.* J Clin Psiquiatry 2017;78:207-13. PMID: 27035515
18. Keller MB, Lavori PW, Mueller TI, et al. *Time to recovery, chronicity and levels of psychopathology in major depression: a follow-up 5-year prospective study of 431 subjects.* Psychiatry Arch Gen 1992; 49: 809-16. PMID: 1417434
19. Steinert C, Hofmann M, Kruse J, Leichsenring F. *The prospective course of long-term treatment of adult depression in general practice and in the community.* One systematic review of the literature. J Afeto Distúrbio 2014; 152:65-75. doi: 10.1016/j.jad.2013.10.01
20. Penninx BWJH, Nolen WA, Lamers F, et al. *Two-year course depressive and anxiety disorders: Study results Dutch Depression and Anxiety Disorder (NESDA).* J Affect Disorder 2011; 133:76-85. PMID: 21496929
21. Burcusa SL, Iacono WG. *Risk of recurrence in depression.* Clin Psychol Rev 2007;27:959-85. PMID: 17448579
22. Angst J, Gamma A, Rössler W, Ajdacic V, Klein D.N.D. *Long expression term versus episodic major depression: study results Zurich prospective of a sample of the community.* J Affection Disturbance 2009;115:112-21. doi: 10.1016/j.jad.2008.09.023
23. Patel V, Chisholm D, Parikh R, et al. *Addressing the burden of mental, neurological, and substance use disorders: key messages from Disease Control Priorities, 3rd edition.* Lancet 2016; 387: 1672–85. PMID: 26454360
24. Jorm AF, Patten SB, Brugha TS, Mojtabai R. *Has increased provision of treatment reduced the prevalence of common mental disorders?* Review of the evidence from four countries. World Psychiatry 2017; 16: 90–99. PMID: 28127925.
25. Malhi GS, Coulston CM, Fritz K, et al. *Unlocking the diagnosis of depression in primary care: what key symptoms family doctors are using to determine diagnosis and severity.* Aust NZ J Psiquiatri 2014; 48:542-47. doi: 10.1177/0004867413513342.

26. Hasin D.S., PhD; Sarvet A. L.; Meyers J. L.; et. al. *Adult Epidemiology DSM-5 Major Depressive Disorder and Your Specifiers in the United States*. JAMA Psychiatry 2018; 1-11. doi:10.1001/jamapsiquiatra.2017.4602. PMID: 29450462.
27. Moller, H.J., et al., *The relevance of 'mixed anxiety and depression' as a diagnostic category in clinical practice*. Eur Arch Psychiatry Clin Neurosci, 2016. doi: 10.1007/s00406-016-0684-7.
28. Kessler, R.C., et al., *Sex and depression in the National Comorbidity Survey. II: Cohort effects*. J Affect Disord, 1994. 30(1): p. 15-26. PMID: 8151045.
29. Yin, Lijun, et al., *Inflammation and decreased functional connectivity in a widely-distributed network in depression: Centralized effects in the ventral medial prefrontal cortex*. Brain, Behavior, and Immunity, 2019: p. 1-9. DOI: 10.1016/j.bbi.2019.05.011.
30. Sisitsky J. C., T; Pike C.T, Kessler R.C. *The economic burden of adults with major depressive disorder in the United States (2005 and 2010)*. Psiquiatria 2015;76: 155-162. PMID: 2574220.
31. Santomauro D, Mantilla Herrera A, Shadid J, et al. *Global prevalence and burden of depressive and anxiety disorders in 204 countries and territories in 2020 due to the COVID-19 pandemic*. Lancet 2021; 398: 1700–12. DOI: 10.1016/S0140-6736(21)02143-7.
32. Belleau, E. L., Treadway, M.T., Pizzagalli, D. A., *The Impact of Stress and Major Depressive Disorder on Hippocampal and Medial Prefrontal Cortex Morphology*. Biological Psychiatry, 2018: p. 1-7. DOI: 10.1016/j.biopsych.2018.09.031.
33. Nestler EJ, Hyman SE. *Animal models of neuropsychiatric disorders* .Nat Neurosci. 2010;13:1161-69. doi: 10.1038/nm.2647.
34. Delgado PL, Charney DS, Price LH, Aghajanian GK, Landis H, Heninger GR. *Serotonin function and antidepressant mechanism of action: reversal of antidepressant-induced remission by rapid Plasma tryptophan depletion*. Psiquiatry Arch Gen 1990; 47: 411-18. DOI: 10.1001/archpsyc.1990.01810170011002.
35. Willner P, Scheel-Krüger J, Belzung C. *The neurobiology of depression and antidepressant action*. Neurosci Biobehav Rev 2013; 37:2331-71. PMID: 23261405.
36. Stetler C, Miller GE. *Depression and hypothalamic-pituitary-adrenal activation: a quantitative summary of four decades of research*. Psicossom Med. 2011;73:114-26. DOI: 10.1097/PSY.0b013e31820ad12b.
37. Setiawan E, Wilson AA, Mizrahi R, et al. *Role of Protein Density translocator, a marker of neuroinflammation, in the brain during major depressive episodes*. JAMA Psiquiatry 2015;72:268-75. DOI: 10.1001/jamapsychiatry.2014.2427.
38. Aitchison K. J., Craig IW, Anacker C, Zunsztain PA, McGuffin P, Pariante CM. *Gene expression profile candidates associated with antidepressant response in the GENDEP trial:*



*differentiating between predictors' baselines and longitudinal*. *Neuropsychopharmacologia* 2013; 38: 377-385. PMID:22990943. DOI:10.1038/npp.2012.191.

**39.** Hannestad J, DellaGioia N, Bloch M. *The effect of antidepressant drug treatment on serum levels of inflammatory cytokines: a meta-analysis*. *Neuropsychopharmacologia*-2011;36: 2452-2459 . PMID:21796103 DOI:10.1038/npp.2011.132.

**40.** Egeland M, Zunszain PA, Pariante CM. Molecular mechanisms in regulation of adult neurogenesis during stress. *Nat Rev Neurosci* 2015;16:189-200. PMID: 25790864.

**41.** Duman RS. *Stress, depression and neuroplasticity: a convergence of mechanisms*. *Neuropsychopharmacologia* 2007;33:88–109. PMID: 1785153.

**42.** Sanacora G, Treccani G, Popoli M. Toward a glutamate depression hypothesis: a neuropsychopharmacology frontier for mood disorders. *Neurofarmacologia* 2012;62: 63–77. DOI: 10.1016/j.neuropharm.2011.07.036.

**43.** Keller S, Sarchiapone M, Zarrilli F, Videtic A, et. al. *Increased BDNF promoter methylation in Wernicke's area of suicidal individuals*. *Psychiatry Arch Gen* 2010;67: 258- PMID:20194826. DOI: 10.1001/archgenpsychiatry.2010.9.

**44.** Benedetti, F. and E. Smeraldi. *Neuroimaging and genetics of antidepressant response to sleep deprivation: implications for drug development*. *Curr Pharm Des*, 2009. 15(22): p. 2637-49. DOI: 10.2174/138161209788957447.

**45.** Moylan S, Maes M, Wray NR, Berk M (2013): *The neuroprogressive nature of major depressive disorder: Pathways to disease evolution and resistance and therapeutic implications*- 013 of *Psychiatria* 8: 95-606 PubMed: 2525486. DOI: 10.1038/mp.2012.33.

**46.** Belleau E. L., Treadway M.T, Pizzagalli D.A., et. al. *The impact of stress and major depressive disorder on morphology of the hippocampus and medial prefrontal cortex*. *Biol Psychiatria* 2019; 1-23. doi:10.1016/j.biopsych.2018.09.031.

**47.** Song, C. and B.E. Leonard, *The olfactory bulbectomized rat as a model of depression*. *Neurosci Biobehav Rev*, 2005. 29(4-5): p. 627-47. PMID: 15925697.

**48.** Hendriksen, H., et al., *The olfactory bulbectomy model in mice and rat: one story or two tails?* *Eur J Pharmacol*, 2015. 753: p. 105-13. PMID: 25446558.

**49.** Almeida, R.F., et al., *Olfactory bulbectomy in mice triggers transient and long-lasting behavioral impairments and biochemical hippocampal disturbances*. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* 2017. 76:p. DOI: 10.1016/j.pnpbp.2017.02.013.

**50.** Nagy C, Suderman M, Yang J, Szyf M, Mechawar N, Ernst C, et al. *Astrocytic abnormalities and global DNA methylation patterns in depression and suicide*. *Mol Psychiatry* 2014. DOI: 10.1038/mp.2014.21.

**51.** Abbracchio, Maria P., Geoffrey Burnstock, Alexei Verkhratsky, and Herbert Zimmermann. 2009. *Purinergic Signalling in the Nervous System: An Overview*. *Trends in Neurosciences* 32(1):19–29. PMID: 19008000.

- 52.** Santos T.G., Souza D.O., Tasca C.I. (2006). *GTP uptake into rat brain synaptic vesicles*. Brain Res 1070: 71–76. PMID: 1640592.
- 53.** Kenneth A. Jacobson, Adriaan P. IJzerman, Christa E. Müller. *Medicinal chemistry of P2 receptors and adenosine: adapted common scaffolds to multiple targets-2020*. Biochemical Pharmacology. doi.org/10.1016/j.bcp.2020.114311.
- 54.** Levine, J., et al., *Increased cerebrospinal fluid glutamine levels in depressed patients*. Biological Psychiatry, 2000. 47(7): p. 586-593. DOI: 10.1016/s0006-3223(99)00284-x.
- 55.** Ciccarelli R.A, Franklyo G.Y. Nygrump S.M. et al., *Glutamatergic neurotransmission antidepressant-like action of adenosine*. Neurosciences 278(46):67–72.1999.
- 56.** Grimm S, Luborzewski A., Schubert F, Merkyl A, Kronenberg G, Colla M, et al. *Alterations of region-specific glutamate in patients with unipolar depression - 2012: A J Psychiatr Res 46:1059–1065*. [PubMed: 22595871]. DOI: 10.1016/j.jpsychires.2012.04.018.
- 57.** Ruggiero R.N., Bueno-Júnior L.S., Ross J.B., et al., *Glutamatergic neurotransmission and synaptic plasticity: molecular, clinical, and phylogenetic aspects*. Departamento de Biologia Celular e Molecular e Bioagentes Patogênicos - FMRP/USP 2011;44(2): 143-56.
- 58.** Kaster, M.P., et al., *Involvement of NMDA receptors in the antidepressant-like action of adenosine*. Pharmacological Reports, 2012. 64(3): p. 706-713. doi: 10.1016/s1734-1140(12)70865-4.
- 59.** Khodoruth M.A.S., Guerra M.A.E., Ouanes S., et al., *Glutamatergic System in Depression and Its Role in Neuromodulatory Techniques Optimization*. Molecular Psychiatry. 2022
- 60.** Hasler G; Veen J.W.; Tuminis T.; et al.; *Reduced Prefrontal Glutamate Glutamine and Alfa Aminobutyric Acid Levels in Major Depression Determined Using Proton Magnetic Resonance Spectroscopy*. Arch Gen Psychiatry. 2007;64:193-200.
- 61.** Sanacora G.; Gueorguieva R.; Epperson N.; et al., *Suptype- Specific Alterations of Alfa-Aminobutyric Acid and Glutamate in Patients With Major Depression*. Arch Gen Psychiatry. 2004; 61:705-713.
- 62.** Feyissa A.M., Chandran A., Craig A. S., et al., *Reduced levels of NR2A and NR2B subunits of NMDA receptor and PSD-95 in the pré-frontal córtex in major depression*. Elsevier. 2008. 70-75.
- 63.** Sanacora G., Mason G.F., Rothman D.L., et al., *Reduced Cortical Alfa Aminobutyric Acid Levels in Depressed Patients Determined by Proton Magnétic Resonance Spectroscopy*. Arch Gen Psychiatry. 1999, 56:1043-1047.
- 64.** Yuen E.Y., Wei J., Liu W., et al., *Repeated Stress Causes Cognitive Impairment by Suppressing Glutamate Receptor Expression and Function in pré-frontal Cortex*. Neuron Article. 2011, 73 (5), 0-977

65. Gray A. L., Hyde T. M., Deep-Soboslay A. et al., *Sex differences in glutamate receptor gene expression. In major depression and suicide*. Molecular Psychiatry, 2015.
66. Rajkowska G., Hidalgo J.J.M., Dubey P., et al., *Prominent Reduction in Pyramidal Neurons Density in the Orbitofrontal Cortex of Elderly Depressed Patients*. Biol Psychiatry. 2005, 58 (4), 297-306.
67. Walter, M., et al., *The relationship between aberrant neuronal activation in the pregenual anterior cingulate, altered glutamatergic metabolism, and anhedonia in major depression*. Arch Gen Psychiatry, 2009. 66(5): p. 478-86.
68. Andrejew R., Paim, M., Moritz, C.E.J., *Post-weaning social isolation impairs purinergic signaling in rat brain*. Neurochemistry Int., 2021. 1-11. doi.org/10.1016/j.neuint.2021.105111
69. Almeida R.F.; Cereser V.H.Jr., Faraco R.B. et al. *Sistemic administration of GMP induces anxiolytic-like behavior in rats*. 2010. Pharmacol Biochem Behav 96 (3): 306-311.
70. Abbracchio, Maria P., Geoffrey Burnstock, Alexei Verkhratsky, and Herbert Zimmermann. *Purinergic Signalling in the Nervous System: An Overview*. Trends in Neurosciences- 2009- 32(1):19–29. PMID: 19008000.
71. Yegutkin, Gennady G. *Enzymes Involved in Metabolism of Extracellular Nucleotides and Nucleosides: Functional Implications and Measurement of Activities*. Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology- 2014- 49(6):473–97. PMID: 25418535.
72. Menzies R.I., Tam F.W., Unwin R.J., Bailey M.A. (2017). *Purinergic signaling in kidney disease*. Kidney Int. 91(2):315-323. PMID: 27780585.
73. Almeida, R.F., Comasseto, D.D., Ramos, D.B., et al. *Guanosine Anxiolytic Like Effect Involves Adenosinergic and Glutamatergic Neurotransmitter Systems*. Mol Neurobiol, 2016. DOI: 10.1007/s12035-015-9660-x.
74. Burnstock, Geoffrey. *Historical Review: ATP as a Neurotransmitter*. Trends in Pharmacological Sciences 2006. 27(3 SPEC. ISS.):166–76. DOI: 10.1016/j.tips.2006.01.005.
75. Koizumi, Schuichi, Keiko Ohsawa, Kazuhide Inoue, and Shinichi Kohsaka. *Purinergic Receptors in Microglia: Functional Modal Shifts of Microglia Mediated by P2 and P1 Receptors*. 2013. Glia 61(1):47–54. DOI: 10.1002/glia.22358.
76. Kovács, Zsolt, Árpád Dobolyi, Katalin Kékesi, and Gábor Juhász. *Nucleotidases, Nucleosides and Their Distribution in the Brain: 2013. Pathological and Therapeutic Implications*. Current Medicinal Chemistry. 2013. 20(34):4217–40. PMID: 2399231.
77. Zimmermann, Herbert and Norbert Braun. *Ecto-Nucleotidases—molecular Structures, Catalytic Properties, and Functional Roles in the Nervous System*. Progress in Brain Research 120:371–85. PMID: 10551012.

**78.** Craig C.G., White T.D. *N-methyl-D-aspartate- and non-N-methyl-D-aspartate- evoked adenosine release from rat cortical slices: distinct purinergic sources and mechanisms of release.* J Neurochem 60: 1073–80. 1993. PMID: 7679722.

**79.** Ciruela F., Escriche M., Burgueno J., Angulo E., Casado V., Soloviev M.M., Canela E.I., Mallol J., Chan W.Y., Lluís C., McIlhinney R.A., Franco R. *Metabotropic glutamate 1alpha and adenosine A1 receptors assemble into functionally interacting complexes.* J Biol Chem-2001- 25;276(21):18345-51. DOI: 10.1074/jbc.M006960200.

**80.** Cunha, Rodrigo A . *Neuroprotection by adenosine in the brain: From A1 receptor activation to A2A receptor blockade.* Purinergic Signalling - 2005- 111–34. DOI: 10.1007/s11302-005-0649-1.

**81.** Dias, R.B., et al., *Adenosine: setting the stage for plasticity.* Trends Neurosci, 2013. 36(4): p. 248-57. doi: 10.1016/j.tins.2012.12.003.

**82.** Coelho, J.E., et al., *Overexpression of Adenosine A2A Receptors in Rats: Effects on Depression, Locomotion, and Anxiety.* Front Psychiatry, 2014. 5: p. 67. doi: 10.3389/fpsy.2014.00067.

**83.** Kenneth A. Jacobson, Adriaan P. IJzerman, Christa E. Müller. *Medicinal chemistry of P2 receptors and adenosine: adapted common scaffolds to multiple targets.* Biochemical Pharmacology. 2020. doi.org/10.1016/j.bcp.2020.114311.

**84.** Basso, A.M., et al., *Behavioral profile of P2X7 receptor knockout mice in animal models of depression and anxiety: relevance for neuropsychiatric disorders.* Behav Brain Res, 2009. 198(1): p. 83-90. DOI: 10.1016/j.bbr.2008.10.018.

**85.** Csölle, C., et al., *Neurochemical Changes in the Mouse Hippocampus Underlying the Antidepressant Effect of Genetic Deletion of P2X7 Receptors.* PLoS One, 2013. 8(6): p. e66547. DOI: 10.1371/journal.pone.0066547.

**86.** Kimmelman, Jonathan Mogil, Jeffrey S. Dirnagl, Ulrich. *Distinguishing between Exploratory and Confirmatory Preclinical Research Will Improve Translation.* PLoS Biology. 2014. Doi: 10.1371/journal.pbio.1001863. DOI: 10.1371/journal.pbio.1001863.

**87.** Loeb, J. *2020 sees reduction in animal experiments.* Veterinary Record. 2021- 189(4), 135–135. doi:10.1002/vetr.844.

**88.** Kendall L. V., Owiny, J.R., Dohm, E.D., et. al., *Replacement, Refinement, and Reduction in Animal Studies With Biohazardous Agents.* Oxford Academic. 2018. Doi: 10.1093/ilar/ily021.

**89.** Song,C., Brian, L.E. *The olfactory bulbectomised rat as a model of depression.* Neurosci Biobehav Rev. 2005. DOI: 10.1016/j.neubiorev.2005.03.010.

**90.** Ramaker M.J., Dulawa, S.C. *Identifying fast-onset antidepressants using rodent models.* Mol Psychiatry-2017. doi: 10.1038/mp.2017.36. DOI: 10.1038/mp.2017.36.

**91.** Surget, A., Saxe, M., Leman, S, et. al. *Drug-Dependent Requirement of Hippocampal Neurogenesis in a Model of Depression and of Antidepressant Reversal*. Biol Psychiatry-2008. DOI: 10.1016/j.biopsych.2008.02.022.

**92.** Yafei, J, Jie, L., Jiuseng Z., et. al., *Xiaoyao Pills Ameliorate Depression-like Behaviors and Oxidative Stress Induced by Olfactory Bulbectomy in Rats via the Activation of the PIK3CA-AKT1-NFE2L2/BDNF Signaling Pathway*. Pharmacology- 2021. doi: 10.3389/fphar.2021.643456.

**93.** Santarelli L, Saxe M, Gross C, et al. Requirement of hippocampal neurogenesis for the behavioral effects of antidepressants. Science. 2003- 301:805– 809. doi 10.1126/science.1083328.

**94.** Ho, Y.-J., et al., *Striatal glutamate release during novelty exposure-induced hyperactivity in olfactory bulbectomized rats*. Neuroscience Letters, 2000. 287(2): p. 117-120. doi: 10.1016/s0304-3940(00)01152-6.

**95.** Almeida, R.F., et al., *Antidepressant-Like Effects of Chronic Guanosine in the Olfactory Bulbectomy Mouse Model*. Front Psychiatry, 2021. 12: p. 701408.doi: 10.3389/fpsyt.2021.701408.

**96.** Kaster, M.P., et al., *Caffeine acts through neuronal adenosine A2A receptors to prevent mood and memory dysfunction triggered by chronic stress*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2015. 112(25): p. 7833-8. doi: 10.1073/pnas.1423088112.

**97.** Padilla, K.M., et al., *Behavioral changes induced through adenosine A2A receptor ligands in a rat depression model induced by olfactory bulbectomy*. Brain Behav, 2018. 8(5): p. e00952. doi: 10.1002/brb3.95.

**98.** Krugel, U., *Purinergic receptors in psychiatric disorders*. Neuropharmacology, 2016. 104: p. 212-25. doi: 10.1016/j.neuropharm.2015.10.032.

**99.** Farooq, R.K., et al., *A P2X7 receptor antagonist reverses behavioural alterations, microglial activation and neuroendocrine dysregulation in an unpredictable chronic mild stress (UCMS) model of depression in mice*. Psychoneuroendocrinology, 2018. 97: p. 120 - 130. doi: 10.1016/j.psyneuen.2018.07.016.

**100.** Almeida, R.F., et al., *Olfactory bulbectomy in mice triggers transient and long- lasting behavioral impairments and biochemical hippocampal disturbances*. Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry, 2017. 76: p. 1-11. doi: 10.1016/j.pnpbp.2017.02.013.

**101.** Boff T. C., Soares S.J.B., Ignácio Z.M., et al., *The role of glutamate in anxiety disorders and obsessive compulsive disorder*. Clinical Experimental Neurociene. 2021.v2n2.

**102.** Norden, M. D., Trojanowski, J.P., Villanueva, E., *Sequential activation of microglia and astrocyte cytokine expression precedes increased Iba-1 or GFAP immunoreactivity following systemic immune challenge* - Free PMC-2016- DOI: 10,1002/glia.22930.

**103.**Slotkin, T. A., Miller, D. B., Fumagalli, F., et al., *Modeling geriatric depression in animals: biochemical and behavioral effects of olfactory bulbectomy in young versus aged rats.* J Pharmacol Exp Ther- 1999. PMID: 10087022.

**104.**Greger, H. I., Watson, F. J., Cull-Candy, G.S., *Structural and Functional Architecture of AMPA-Type Glutamate Receptors and Their Auxiliary Proteins.* Affiliations expand. 2017- PMID: 28521126 DOI: 10.1016/j.neuron,2017,04,009.

**105.**Morales-Medina, J.C., Juarez, I., Iannitti, T., *Olfactory bulbectomy induces neuronal rearrangement in the entorhinal cortex in the rat.* Elsevier – 2013-DOI: 10.1016/j.chemneu.2013.07.001.

**106.**Borea, A. P., Gessi, S., Merigh, S., *Pharmacology of Adenosine Receptors: The State of the Art.* Physiol Rev.- 2018- DOI: 10.1152/physrev,00049,2017.

**107.**Holsen, E.M., Lancaster, K., Klibanski, A. et al., *HPA-axis hormone modulation of stress response circuitry activity in women with remitted major depression.* Neuroscience – 2013-doi: 10.1016/j.neuroscience.2013.07.042.

**108.**Yingbo H., Taylor N., Fourgeaud L., et al., *The role of microglial P2X7: modulation of cell death and cytokine release* – 2017. DOI: 10.1186/s12974-017-0904-8

**109.**Huang Z., Tan, S. *P2X7 Receptor as a Potential Target for Major Depressive Disorder.* Curr Drug Targets. 2021- doi: 10.2174/1389450122666210120141908.

**110.**Takahash K., Nakagawasa O., Nemoto W., et al., *Memantine ameliorates depressive-like behaviors by regulating hippocampal cell proliferation and neuroprotection in olfactory bulbectomized mice.* Neuropharmacology – 2018- doi: 10.1016/j.neuropharm.2018.04.013.

**111.**Yu L., Wang Y., Zhang H., et al., *Involvement of purinergic P2Y1R in antidepressant-like effects of electroacupuncture treatment on social isolation stress mice- Purinergic Signal* – 2022. doi: 10.1007/s11302-021-09827-1.

**112.**Wang M., Pan W., Xu Y., et al., *Microglia-Mediated Neuroinflammation: A Potential Target for the Treatment of Cardiovascular Diseases.* J Inflamm Res – 2022. doi: 10.2147/JIR.S350109.

**113.**Koch H., Bepalov A., Drescher K., et al., *Impaired cognition after stimulation of P2Y1 receptors in the rat medial prefrontal cortex.* Neuropsychopharmacology – 2015. doi: 10.1038/npp.

