

Filipe Marques Gonçalves

**MECANISMOS NEUROQUÍMICOS ASSOCIADOS AOS EFEITOS  
TIPO-ANTIDEPRESSIVO E NEUROPROTETOR DE INOSINA**

Tese submetida ao Programa de Pós-  
Graduação em Bioquímica da  
Universidade Federal de Santa Catarina  
para a obtenção do Grau de Doutor em  
Bioquímica

Orientador: Prof. Dr. Rodrigo Bainy  
Leal

Coorientadora: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup> Manuella  
Pinto Kaster

Florianópolis  
2017

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor,  
através do Programa de Geração Automática da Biblioteca Universitária da UFSC.

Gonçalves, Filipe Marques  
MECANISMOS NEUROQUÍMICOS ASSOCIADOS AOS EFEITOS  
TIPO-ANTIDEPRESSIVO E NEUROPROTETOR DE INOSINA /  
Filipe Marques Gonçalves ; orientador, Rodrigo Bainy  
Leal; coorientadora, Manuella Pinto Kaster - SC,  
2017.  
190 p.

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Santa  
Catarina, Centro de Ciências Biológicas, Programa de  
Pós-Graduação em Bioquímica, Florianópolis, 2017.

Inclui referências.

1. Bioquímica. 2. Inosina. 3. vias de sinalização.  
4. depressão. 5. neuroproteção. I. Leal, Rodrigo  
Bainy. II. Kaster, Manuella Pinto. III.  
Universidade Federal de Santa Catarina. Programa de  
Pós-Graduação em Bioquímica. IV. Título.

**"Mecanismos neuroquímicos associados aos efeitos tipo-antidepressivo e neuroprotetor de inosina"**

Por

**Filipe Marques Gonçalves**

Tese julgada e aprovada em sua forma final pelos membros titulares da Banca Examinadora (10/PPGBQA/2017) do Programa de Pós-Graduação em Bioquímica - UFSC.

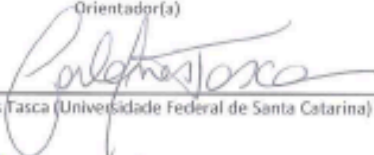


Prof(a). Dr(a). Ariane Zamoner Pacheco de Souza  
Coordenador(a) do Programa de Pós-Graduação em Bioquímica


Banca examinadora:



Dr(a) Rodrigo Bairy Leif (Universidade Federal de Santa Catarina)  
Orientador(a)



Dr(a) Carla Inês Tasca (Universidade Federal de Santa Catarina)



Dr(a) Morgana Moretti (Universidade Federal de Santa Catarina)



Dr(a) Patricia Souza Brocardo (Universidade Federal de Santa Catarina)



Dr(a) Josiane Budni (Universidade do Extremo Sul Catarinense)



Dr(a) Gabriele Ghisleni (Universidade Católica de Pelotas)

Florianópolis, 09 de março de 2017.



## AGRADECIMENTOS

*No fim dessa jornada fica evidente o importante papel de várias pessoas ao meu redor, que de forma direta ou indireta contribuíram de alguma maneira na minha caminhada. Certamente não vou conseguir expressar plenamente a gratidão que sinto por todo o apoio que recebi!*

*Tenho que agradecer principalmente a minha família, por me ajudarem a manter o foco na minha vida, sempre lembrando das coisas que são mais importantes. Aos meus Pais: Vilson e Elane, por me darem todo o apoio que eu precisei, mesmo sem entender os aspectos relacionados a vida acadêmica, ou as escolhas que fiz nesse sentido ao longo desses 6 anos de pós-graduação. As minhas irmãs Viviane e Juliana, por estarem sempre ao meu lado, me incentivando e apoiando. Aos meus tios, primos, meu cunhado e minhas avós, com quem sempre tive o privilégio de conviver e de desfrutar de muitos bons momentos!*

*Aos meus amigos fora da vida acadêmica, pela parceria, pelas risadas e festas!*

*A todos que já passaram pelo lab de neuroquímica 3, que de alguma maneira ajudaram no desenvolvimento dessa Tese. Em especial à Ana Paula, Débora, Mark, Isabella pela parceria de longa data e pela ajuda direta nos experimentos.*

*Ao professor Rodrigo, pela orientação ao longo desses 7 anos! Por ter aberto as portas do seu laboratório, aonde eu realizei meu estágio de IC, mestrado e doutorado. Por ter possibilitado o meu desenvolvimento científico e sempre incentivar o meu crescimento profissional. Muito obrigado Professor!*

*A minha co-orientadora Manuella Kaster, que foi fundamental para o desenvolvimento dessa tese. Muito obrigado pela ajuda em todos os aspectos do meu doutorado, não só corrigindo os meus trabalhos ou discutindo os meus resultados, mas por sempre se mostrar disponível para me ajudar, ou pelo menos escutar as minhas angústias!*

*A professora Ana Lúcia que desde o meu mestrado abriu as portas do seu laboratório para realização dos testes comportamentais. Muito obrigado por todas as discussões sobre os meus projetos e resultados, pela ajuda nos meus artigos e também pelas excelentes possibilidades de colaboração que eu pude participar. A todos os alunos do laboratório de neurobiologia da depressão, pelas conversas científicas (ou não). Ao Luís, Priscila, Luana e Andiará pela ajuda ao longo do meu doutorado. Em especial a Vivian, por toda a ajuda desde o início do doutorado. Pela parceria nos meus experimentos, na escrita dos meus artigos e projetos, e por todas as vezes que dividimos as angústias da vida de pós-graduando (rs). Eu não tenho palavras para agradecer a tua ajuda ao longo desses 4 anos!*

*Aos Professores do departamento de Bioquímica que sempre estiveram dispostos em ajudar quando eu precisei. E a todo o pessoal que pude conhecer ao longo desse período, especialmente aqueles que entraram no doutorado comigo: Heloisa Cinara, Ariana!*

*Aos técnicos do LAMEB pelo auxílio nos experimentos.*

*Ao Professor Michael Aschner, por ter me aceito no seu laboratório, e pela orientação durante o período de doutorado sanduíche. A todos os membros do laboratório, especialmente o pessoal do lab de cultura celular: Megan, Bea, Zhyan e Chris pela ajuda nos experimentos e pela convivência! Alessandra pela ajuda diária no lab, e por ter me ajudado em todos os aspectos da vida em New York! A Tanara, pela ajuda tanto no lab na UFSC quanto no Einstein, por ter me recebido quando eu cheguei em New York, e por toda a ajuda desde a minha iniciação científica!*

*À congregação de Português em Astória por me receberem tão bem quando cheguei em New York, e por terem feito eu me sentir em casa, mesmo estando tão longe!*

*A secretaria do PPGBQA pela ajuda com todas as burocracias relacionadas ao doutorado e ao doutorado sanduíche.*

*A CAPES pelas bolsas de doutorado e doutorado sanduíche.*

*Principalmente a Jeová Deus! Por ter me proporcionado a vida e pelo privilégio de lhe conhecer e servir.*

## RESUMO

Inosina é um nucleosídeo purinérgico endógeno, formada a partir da adenosina, em uma reação catalisada pela enzima adenosina deaminase. Já foram descritos efeitos antinociceptivos, anti-inflamatórios, neuroprotetores e antidepressivos para inosina, que podem estar associados à ativação de receptores de adenosina. Contudo, existem poucas evidências na literatura relacionando às vias de sinalização intracelular envolvidas nesses efeitos, bem como de outros mecanismos neuroquímicos associados aos efeitos dessa purina. Baseado nisso, o presente trabalho investigou alguns dos mecanismos associados aos efeitos tipo-antidepressivo de inosina em camundongos e no efeito neuroprotetor da inosina *in vitro*. Primariamente, um dos objetivos desse trabalho foi investigar a modulação de vias de sinalização intracelular e de receptores glutamatérgicos no efeito tipo-antidepressivo de inosina, através do teste da suspensão pela cauda (TSC), e na atividade locomotora, através do teste do campo aberto (TCA). Adicionalmente, foi verificado o efeito da administração de inosina sobre o imunocontéudo e fosforilação (ser-133) do fator de transcrição CREB, imunocontéudo das proteínas sinápticas PSD95 e sinapsina I, bem como da subunidade GluA1 do receptor glutamatérgico AMPA e A<sub>1</sub> e A<sub>2A</sub> dos receptores de adenosina. Nenhum dos tratamentos alterou a locomoção dos animais no TCA. Inosina administrada pela via intraperitoneal (i.p.) induziu um efeito anti-imobilidade no TSC nas doses de 1 mg/kg e 10 mg/kg. O efeito tipo-antidepressivo de inosina foi abolido pelo pré-tratamento dos animais com U0126 [inibidor de MEK, 5µg/sítio administrado pela via intracerebroventricular (i.c.v.)], KN-62 (inibidor de CaMKII, 1µg/sítio, i.c.v.), H-89 (inibidor de PKA, 1µg/sítio, i.c.v.), wortmanina (inibidor de PI3K, 0,1µg/sítio, i.c.v.), rapamicina (inibidor de mTORC1, 0,2nmol/sítio, i.c.v.), NMDA [agonista dos receptores glutamatérgicos do tipo NMDA (NMDAR) 0,1pmol/sítio, i.c.v.] e D-serina (co-agonista de NMDAR, 30µg/sítio, i.c.v.). Também foi observado um efeito tipo-antidepressivo sinérgico entre doses sub-efetivas de inosina (0,1 mg/kg, i.p.) e AR-A014418 (inibidor de GSK-3β, 0,001µg/sítio, i.c.v.), cetamina (antagonista NMDAR, 0,1 mg/kg, i.p.) ou MK-801 (antagonista NMDAR, 0,001 mg/kg, administrado por gavagem). Contudo, o pré-tratamento com DNQX (antagonista dos receptores AMPA, 2,5 µg/sítio, i.c.v.), não alterou o efeito anti-imobilidade de inosina (10 mg/kg, i.p.). No período de 24 h após a administração de inosina (10 mg/kg, i.p.) foi verificado um aumento de fosforilação de CREB no hipocampo dos animais, sem alterações no imunocontéudo de CREB nessa estrutura, ou na fosforilação e imunocontéudo no córtex pré-frontal (CPF). Também não foram verificadas alterações na fosforilação e imunocontéudo de CREB no CPF e hipocampo 30 minutos após a administração de inosina. Adicionalmente, não foram encontradas alterações no imunocontéudo de PSD95, GluA1, sinapsina I e dos receptores A<sub>1</sub> e A<sub>2A</sub> de adenosina no hipocampo e CPF 30 min e 24 horas após a administração de inosina. Esses resultados demonstram o envolvimento da inibição de NMDAR e GSK-3β e da ativação de MEK/ERK

1/2, CaMKII, PKA, PI3K/AKT e mTORC1 no efeito tipo-antidepressivo de inosina. Notavelmente, uma única dose de inosina foi capaz de induzir um aumento na fosforilação de CREB no hipocampo. Outro objetivo desse trabalho envolveu o estudo do potencial neuroprotetor da inosina contra a morte celular induzida por metilmercúrio (MeHg) em cultura primária de astrócitos corticais provenientes de ratos neonatos. O co-tratamento com inosina (50-1000 $\mu$ M) e MeHg (5  $\mu$ M) por 6 h preveniu a redução na viabilidade celular induzido por esse toxicante, avaliada pelo método de redução do MTT. Não foram verificados efeitos protetores após o co-tratamento por 24 h, mas foi observado um efeito protetor após o pré-tratamento com inosina (50-1000 $\mu$ M) por 24 h seguido do co-tratamento com inosina nas mesmas concentrações e MeHg (5  $\mu$ M) por 24 h adicionais. O tratamento das culturas celulares com inosina (500  $\mu$ M) por 6 h, também preveniu o aumento na geração de espécies reativas de oxigênio induzidos por MeHg (5  $\mu$ M) avaliado pela sonda H<sub>2</sub>DCFDA. Contudo, não foram verificadas alterações nos níveis de glutatona total e reduzida induzidos pelos tratamentos com inosina e/ou MeHg. O tratamento com inosina estimulou a expressão do RNAm para NQO-1, Nrf2 e BDNF além de aumentar o imunoconteúdo de Nrf2 no núcleo celular. Também foi verificado um aumento transitório na fosforilação de AKT (ser-473) por inosina (500  $\mu$ M), e o pré-tratamento com wortmanina (1  $\mu$ M) preveniu o efeito neuroprotetor de inosina (500  $\mu$ M) frente à neurotoxicidade do MeHg (5  $\mu$ M). Não foram verificadas alterações na fosforilação de ERK1/2 após o tratamento com inosina e o pré-tratamento com U0126 (10  $\mu$ M) não preveniu o efeito neuroprotetor dessa purina. Adicionalmente, o efeito neuroprotetor de inosina (500  $\mu$ M) foi prevenido pelo pré-tratamento com MRS1523 (antagonista dos receptores A<sub>3</sub> de adenosina, 1 $\mu$ M), mas não foram verificadas alterações pelo pré-tratamento com PSB36, (antagonista dos receptores A<sub>1</sub> de adenosina, 10 nM) ou pelo pré-tratamento com SCH58261, (antagonista dos receptores A<sub>2A</sub> de adenosina, 100 nM). Assim, esses resultados indicam que inosina pode exercer um efeito protetor contra a toxicidade induzida por MeHg em astrócitos, possivelmente ativando o receptor A<sub>3</sub> de adenosina e a sinalização de PI3K/AKT, além da ativação do fator de transcrição Nrf2. Em conjunto, os resultados desse trabalho demonstram novos mecanismos moleculares referentes aos efeitos antidepressivos e neuroprotetores de inosina, ressaltando a participação do sistema purinérgico em diferentes processos no sistema nervoso central.

**Palavras-chaves: Inosina, vias de sinalização, antidepressivo, neuroproteção, metilmercúrio, astrócitos.**



## ABSTRACT

Inosine is an endogenous purinergic nucleoside formed by the adenosine breakdown in a reaction catalyzed by the enzyme adenosine deaminase. It has been reported antinociceptive, anti-inflammatory, neuroprotective, and antidepressant effects for inosine that may occur through adenosine receptors activation. However, there is little evidence regarding the signaling pathways and others neurochemical mechanisms associated to the effects elicited by this purine. The present study investigated the neurochemical mechanisms associated to inosine antidepressant-like and neuroprotective effects. First, it was investigated, in adult mice, the participation of intracellular signaling pathways and glutamatergic receptors on the inosine antidepressant-like effect, evaluated by tail suspension test (TST) and the locomotor activity was evaluated by the open field test (OPT). Moreover, the effect of inosine administration in the phosphorylation levels and immuncontent of the transcription factor CREB and the immuncontent of synaptic proteins PSD95 and synapsin-I, as well as GluA1 subunit of AMPA receptor and A<sub>1</sub> and A<sub>2A</sub> adenosine receptors was also evaluated. None of the treatments changed the locomotor activity in the OPT. Inosine administered by the intraperitoneal route (i.p.) in the doses of 1 and 10 mg/kg induced an antidepressant-like effect in the TST. The anti-immobility effect of inosine was prevented by pre-treatment of mice with U0126 [MEK inhibitor, 5µg/site administered by intracerebroventricular route (i.c.v.)], KN-62 (CaMKII inhibitor, 1µg/site, i.c.v.), H-89 (PKA inhibitor, 1µg/site, i.c.v.), wortmanin (PI3K inhibitor, 0.1µg/site, i.c.v.), rapamycin (mTORC1 inhibitor, 0.2 nmol/site, i.c.v.), NMDA [agonist of NMDA glutamatergic receptors (NMDAR) 0.1 pmol/site, i.c.v.] and D-serine (NMDAR co-agonist, 30µg/site, i.c.v.). It was also observed a synergic antidepressant-like effect elicited by sub-effective doses of inosine (0.1mg/kg, i.p.) and AR-A014418 (GSK-3β inhibitor, 0.001µg/site, i.c.v.), ketamine (NMDAR antagonist, 0.1 mg/kg, i.p.), MK-801 (NMDAR antagonist, 0.001 mg/kg, administered by gavage). However, the pre-treatment with DNQX (AMPA receptors antagonist, 2.5 µg/site, i.c.v.), did not changed inosine antidepressant-like effect (10 mg/kg, i.p.). 24 h after inosine administration (10 mg/kg, i.p.) an increase in CREB phosphorylation without alterations in CREB immuncontent was found in mice hippocampus. No alterations in CREB immuncontent and phosphorylation were found 30 minutes after the administration of inosine. Furthermore, the immuncontent of synaptic proteins (PSD95, GluA1 and synapsin-I), as well as A<sub>1</sub> and A<sub>2A</sub> adenosine receptors, was not altered 30 min and 24 h after inosine administration. These results suggest the participation of NMDAR and GSK-3β inhibition, and MEK/ERK 1/2, CaMKII, PKA, PI3K/AKT and mTORC1 activation in the antidepressant-like effect of inosine in the TST. Moreover, a single administration of inosine was able to induce an increase in CREB phosphorylation in the hippocampus. Another aim of the study was to determine the neuroprotective effect of inosine against methylmercury (MeHg) toxicity in

cortical astrocyte primary culture from newborn rats. The co-treatment with inosine (50-1000 $\mu$ M) and MeHg (5  $\mu$ M) for 6 h prevented the decrease in cell viability induced by MeHg. No protection was observed after the co-treatment with inosine (50-1000 $\mu$ M) and MeHg (5  $\mu$ M) for 24 h, but a neuroprotective effect, assessed by MTT reduction method, was observed after inosine pre-treatment (50-1000 $\mu$ M) for 24 h followed by co-treatment with inosine (in the same concentrations) and MeHg (5  $\mu$ M) for additional 24 h. Inosine (500  $\mu$ M) prevented the increase in the oxygen reactive species generation (evaluated by H<sub>2</sub>DCFDA probe) induced by MeHg (5  $\mu$ M) for 6 hours, but no changes in the reduced and total glutathione levels were observed. Inosine treatment (500  $\mu$ M) also induced an increase in NQO-1, Nrf2, BDNF mRNA expression and Nrf2 immunocontent in cell nucleus. It was also observed a transient increase in AKT (ser-473) phosphorylation induced by this purine, and wortmanin pre-treatment (1  $\mu$ M) prevented the inosine neuroprotective effect. No alterations were observed in ERK 1/2 phosphorylation after the treatment with inosine and the neuroprotective effect of this purine was not prevented by the pre-treatment with U0126 (10  $\mu$ M). Additionally, the neuroprotection elicited by inosine was prevented by MRS1523 (A<sub>3</sub> adenosine receptor antagonist, 1 $\mu$ M), but no changes were observed after the pre-treatment with PSB36 (A<sub>1</sub> adenosine receptor antagonist, 10 nM) nor SCH58261 (A<sub>2A</sub> adenosine receptor antagonist). These results indicated that inosine induced a neuroprotective effect against MeHg in astrocytes that may occur by A<sub>3</sub> adenosine receptor and PI3K/AKT activation, and this purine can also activate Nrf2. Taken together, our results showed new mechanisms for inosine antidepressant and neuroprotective effects, reinforcing the participation of the purinergic system in various processes in the central nervous system.

**Keywords: Inosine, signaling pathways, antidepressant, neuroprotection, methylmercury, astrocytes**

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 Metabolismo de inosina.....	27
Figura 2. Sinalização desencadeada pela ativação do receptor A <sub>1</sub> (A <sub>1</sub> R). .....	31
Figura 3. Sinalização desencadeada pela ativação do receptor A <sub>2A</sub> (A <sub>2A</sub> R) .....	33
Figura 4 .Sinalização desencadeada pela ativação do receptor A <sub>3</sub> (A <sub>3</sub> R).....	35
Figura 5 Hipótese monoaminérgica da depressão. ....	43
Figura 6. Hipótese neurotrófica da depressão .....	45
Figura 7. Convergência de cascatas de sinalização intracelular envolvidas na resposta de compostos antidepressivos.....	50
Figura 8. Representação esquemática da neurotransmissão glutamatérgica. ....	52
Figura 9 Mecanismos neuroquímicos associados ao efeito tipo antidepressivo da cetamina .....	57
Figura 10. Protocolo experimental utilizado para avaliar o efeito de diferentes inibidores de cinases no efeito tipo-antidepressivo da inosina. ....	63
Figura 11. Protocolo experimental utilizado para avaliar o efeito do inibidor de GSK-3 $\beta$ no efeito tipo-antidepressivo da inosina.....	64
Figura 12. Protocolo experimental utilizado para avaliar o efeito do tratamento com antagonista de receptores AMPA no efeito tipo-antidepressivo da inosina. A.....	64
Figura 13. Protocolo experimental utilizado para avaliar o efeito do tratamento com agonistas de NMDAR no efeito tipo-antidepressivo da inosina. ....	65
Figura 14. Protocolo experimental utilizado para avaliar o efeito do tratamento com cetamina (antagonista NMDAR) no efeito tipo-antidepressivo da inosina.....	65
Figura 15 Protocolo experimental utilizado para avaliar o efeito do tratamento com MK-801 (antagonista NMDAR) no efeito tipo-antidepressivo de inosina. ....	66
Figura 16 Eletroforese, eletrotransferência e imunodeteção.....	68
Figura 17 Efeito do tratamento com inosina no tempo de imobilidade no TSC e no número de cruzamentos no TCA. ....	70
Figura 18. Influência da inibição da MEK1/2 nos efeitos de inosina no TSC e TCA.....	71
Figura 19. Influência da inibição de CAMKII nos efeitos de inosina no TSC e TCA.....	72
Figura 20. Influência da inibição de PKA (usando H-89) nos efeitos de inosina no TSC e TCA .....	73
Figura 21. Influência da inibição de PI3K nos efeitos de inosina no TSC e TCA.....	74
Figura 22. Influência da inibição de GSK-3 $\beta$ nos efeitos de inosina no TSC e TCA.....	75
Figura 23. Efeito do tratamento com inosina na fosforilação (ser-133) e imunoconteúdo de CREB. ....	76
Figura 24. Influência do tratamento com agonistas dos receptores NMDA nos efeitos de inosina no TSC e TCA .....	78
Figura 25. Influência do tratamento com antagonistas dos receptores NMDA nos efeitos de inosina no TSC e TCA.....	80

Figura 26. Influência do tratamento com antagonista dos receptores AMPA nos efeitos de inosina no TSC e TCA. ....	81
Figura 27. Influência da inibição de mTORC1 (usando rapamicina) nos efeitos de inosina no TSC e TCA .....	82
Figura 28. Imunoconteúdo de GluA1, PSD95 e sinapsina 30 min após a administração i.p. de inosina.....	84
Figura 29. Imunoconteúdo de GluA1, PSD95 e sinapsina 24 horas após a administração i.p. de inosina.....	85
Figura 30. Imunoconteúdo de receptores A <sub>1</sub> (A1R) e A <sub>2A</sub> (A2AR) 30 minutos após a administração i.p. de inosina.....	87
Figura 31. Imunoconteúdo de receptores A <sub>1</sub> (A1R) e A <sub>2A</sub> (A2AR) 24 horas após a administração i.p. de inosina.....	88
Figura 32. Estruturas químicas do metilmercúrio (MeHg) cisteína, complexo L-cisteína / metilmercúrio e metionina.....	103
Figura 33. Efeito do tratamento com Inosina na redução da viabilidade celular induzido por MeHg.....	120
Figura 34. Efeito do tratamento com inosina na liberação da enzima lactato desidrogenase (LDH) induzido por MeHg.....	121
Figura 35. Efeito do tratamento com inosina e/ou MeHg na produção de ERO (floreescência de H <sub>2</sub> DCFDA) e nos níveis de GSH total e reduzida.....	123
Figura 36. Efeito do tratamento com inosina na expressão relativa de NQO-1 (A), Nrf2 (B) e HO-1 (C).....	124
Figura 37. Efeito do tratamento com inosina na imunoconteúdo de Nrf2 no núcleo celular.....	126
Figura 38. Efeito do tratamento com inosina no imunoconteúdo de Nrf2.....	127
Figura 39. Efeito do tratamento com inosina na atividade de ARE.....	128
Figura 40. Efeito do pré-tratamento com antagonistas para os receptores de adenosina (A <sub>1</sub> , A <sub>2A</sub> e A <sub>3</sub> ), no efeito neuroprotetor de inosina frente a queda da redução do MTT induzido por MeHg.....	130
Figura 41. Efeito do pré-tratamento com antagonista para os receptor de adenosina A <sub>3</sub> , no aumento da expressão de Nrf2 induzido por inosina.....	131
Figura 42. Efeito do tratamento com inosina na fosforilação de ERK 1,2.....	132
Figura 43. Efeito do pré-tratamento com U0126 no efeito neuroprotetor de inosina frente a redução da viabilidade celular induzida por MeHg.....	133
Figura 44. Efeito do tratamento com inosina na fosforilação de AKT.....	134
Figura 45. Efeito do pré-tratamento com wortmanina (inibidor seletivo de PI3K), no efeito neuroprotetor de inosina frente a queda da redução do MTT induzido por MeHg.....	135
Figura 46. Efeito do tratamento com inosina na expressão relativa de BDNF.....	136
Figura 47. Mecanismos moleculares associados ao efeito tipo-antidepressivo da inosina.....	150

Figura 48. Mecanismos moleculares associados ao efeito neuroprotetor *in vitro* da inosina em cultura de astrócitos.....151

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Sintomas para diagnóstico de depressão maior.....41  
Tabela 2. Listagem de anticorpos utilizados para análises de Wester Blotting. 68  
Tabela 3 Valores de significância para as análises de Western Blotting no imunoconteúdo de GluaA1, PSD95 e Sinapsina I, 30 minutos e 24 horas após a administração de inosina (10 mg/kg i.p.)..... 83  
Tabela 4 Valores de significância para as análises de Western Blotting no imunoconteúdo dos receptores  $A_1$  e  $A_{2A}$  de adenosina 30 minutos e 24 após a administração de inosina (10 mg/kg i.p.).....86  
Tabela 5 Sondas TaqMan utilizadas ..... 114  
Tabela 6. Lista de anticorpos utilizados..... 117



## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

A1R - Receptor de adenosina A<sub>1</sub>  
A2AR - Receptor de adenosina A<sub>2A</sub>  
A3R - Receptor de adenosina A<sub>3</sub>  
ADP – Difosfato de adenosina  
ATP – Monofosfato de adenosina  
AMPA –Ácido alfa-amino-3-hidroxi-metil-5-4-isoxazolpropiónico  
AMPc – Adenosina 3',5'-monofosfato cíclico  
ATP – Trifosfato de adenosina  
ANOVA – Análise de variância  
ARE – Elemento de resposta antioxidante  
BDNF – Fator neurotrófico derivado do cérebro  
BHE – Barreira hemato-encefálico  
CNT - Transportadores unidirecionais de nucleosídeos concentrativos  
CREB – Elemento de resposta ao AMPc  
CaMKII – Cálcio/calmodulina cinase  
CPF Córtex pré-frontal  
DMPS - 2,3-dimercapto-1-propanosulfonato  
DMSA - Ácido meso-2,3-dimercaptosuccínico  
DMSO – Dimetil sulfoxido  
DNQX – 6,7-dinitroquinoxaline-2,3-diona  
DO – Densidade óptica  
DSM 5 – Manual Diagnóstico e Estatístico de Transtornos Mentais 5<sup>a</sup> Edição  
EAAT – Transportador de aminoácidos excitatórios  
EPM – Erro padrão da média  
ENT - Transportadores bidirecionais de nucleosídeos equilibrativos  
ERK – Proteína cinase regulada por sinal extracelular  
ERO – Espécies reativas de oxigênio  
GABA – Ácido gama aminobutírico  
GFAP - Proteína glial fibrilar ácida  
GSH - Glutationa  
GSK-3β – Glicogênio sintase cinase 3β  
GSSG - Glutationa oxidada  
HO-1 - Heme-oxigenase 1  
i.c.v. – Intracerebroventricular  
Keap1 - *Kelch-like-ECH-associated protein 1*  
IP3 - Inositol 1,4,5 trifosfato  
LAT-1 - Sistema transportador de aminoácidos neutros do tipo 1  
LDH – Lactato Desidrogenase  
MAO – Monoamina oxidase  
MeHg - Metilmercúrio  
mTOR – Proteína alvo da rapamicina em mamíferos  
MTT - 3-[4,5-dimetiltiazol-2-il]-2,5- difeniltetrazólio  
NQO-1 - NAD(P)H: quinona oxidoreductase 1

NMDA – *N*-metil-D-aspartato  
NTPDases - Nucleosídeo trifosfato difosfohidrolases  
Nrf2 – Fator nuclear eritróide 2 relacionado ao fator 2  
NO - Óxido nítrico  
PI3K – Fosfatidilinositol 3 cinase  
PLC - Fosfolipase C  
PLD - Fosfolipase D  
PLA2 - Fosfolipase A2  
PKA – Proteína cinase A  
p.o. - *Per os*  
PSD-95 – Proteína de densidade pós-sináptica de 95kDa  
p70S6K – Proteína ribossomal S6 cinase  
RIPA Tampão para radiomunensaio  
RNA – Ácido Ribonucleico  
RNAm - RNA mensageiro  
RSK - Ribossomal 6 cinase  
SDS-PAGE - Eletroforese em gel de poliacrilamida contendo dodecil sulfato de sódio  
SNC – Sistema nervoso central  
TCA – Teste do campo aberto  
TCS – Teste de consumo de sacarose  
TNF – Teste do nado forçado  
TrkB – Receptor tropomiosina cinase B  
TSC – Teste de suspensão pela cauda  
TWI- *Tolerable weekly intake*



## LISTA DE PUBLICAÇÕES REFERENTES AO PERÍODO DE DOUTORADO (2013-2017)

GONÇALVES, FILIPE MARQUES; NEIS, VIVIAN BINDER; RIEGER, DÉBORA KURRLE; LOPES, MARK WILLIAM; HEINRICH, ISABELLA A.; COSTA, ANA PAULA; RODRIGUES, ANA LÚCIA S.; KASTER, MANUELLA P.; LEAL, RODRIGO BAINY. Signaling pathways underlying the antidepressant-like effect of inosine in mice. **Purinergic Signalling**, 2016, doi:10.1007/s11302-016-9551-2.

GONÇALVES, FILIPE MARQUES; NEIS, VIVIAN BINDER; RIEGER, DÉBORA KURRLE; PERES, TANARA VIEIRA; LOPES, MARK WILLIAM; HEINRICH, ISABELLA A.; COSTA, ANA PAULA; RODRIGUES, ANA LÚCIA S.; KASTER, MANUELLA P.; LEAL, RODRIGO BAINY. Glutamatergic system and mtor-signaling pathway participate in the antidepressant-like effect of inosine in the tail suspension test. Submetido para publicação em **Journal of Neural Transmission**, 2017.

NEIS, VIVIAN BINDER; MORETTI, MORGANA; BETTIO, LUIS EDUARDO B.; RIBEIRO, CAMILLE M.; ROSA, PRISCILA BATISTA; GONÇALVES, FILIPE MARQUES; LOPES, MARK WILLIAM; LEAL, RODRIGO BAINY; RODRIGUES, ANA LÚCIA S. Agmatine produces antidepressant-like effects by activating AMPA receptors and mTOR signaling. **European Neuropsychopharmacology**, v. 26, p. 959-971, 2016.

NEIS, VIVIAN B.; BETTIO, LUIS EDUARDO.B.; MORETTI, MORGANA; ROSA, PRISCILA BATISTA.; RIBEIRO, CAMILLE M.; FREITAS, ANDIARA E.; GONÇALVES, FILIPE MARQUES.; LEAL, Rodrigo B.; RODRIGUES, ANA LÚCIA S. Acute agmatine administration, similar to ketamine, reverses depressive-like behavior induced by chronic unpredictable stress in mice. **Pharmacology, Biochemistry and Behavior**, v. 150-151, p. 108-114, 2016.

VIEIRA PERES, TANARA; ONG, LIN KOOI ; COSTA, ANA PAULA; EYNG, HELENA; VENSKE, DÉBORA KURRLE RIEGER; COLLE, DIRLEISE; GONÇALVES, FILIPE MARQUES; LOPES, MARK WILLIAM; FARINA, MARCELO; Aschner, Michael; DICKSON, PHIL; DUNKLEY, PETER; LEAL, RODRIGO BAINY. Tyrosine Hydroxylase Regulation in Adult Rat Striatum following Short-term Neonatal Exposure to Manganese. **Metallomics** v.8, p.597-604, 2016.

LOPES, MARK WILLIAM; LOPES, SAMANTHA CRISTIANE; SANTOS, DANÚBIA BONFANTI; COSTA, ANA PAULA; GONÇALVES, FILIPE MARQUES; DE MELLO, NELSON; PREDIGER, RUI DANIEL; FARINA, MARCELO; WALZ, ROGER; LEAL, RODRIGO BAINY. Time course

evaluation of behavioral impairments in the pilocarpine model of epilepsy. **Epilepsy & Behavior**, v. 55, p. 92-100, 2016.

MANOSSO, LUANA M.; MORETTI, MORGANA; RIBEIRO, CAMILLE M.; **GONÇALVES, FILIPE MARQUES**; LEAL, Rodrigo B.; RODRIGUES, ANA LÚCIA S. Antidepressant-like effect of zinc is dependent on signaling pathways implicated in BDNF modulation. **Progress in Neuro-Psychopharmacology & Biological Psychiatry**, v. 59, p. 59-67, 2015.

LOPES, MARK W.; LOPES, SAMANTHA C.; COSTA, ANA PAULA; **GONÇALVES, FILIPE MARQUES**; RIEGER, DÉBORA KURRLE; PERES, TANARA V.; EYNG, H.; PREDIGER, R. D. S.; DIAZ, ALEXANDRE PAIM; NUNES, JEAN C.; WALZ, ROGER ; LEAL, RODRIGO B. . Region-specific alterations of AMPA receptor phosphorylation and signaling pathways in the pilocarpine model of epilepsy. **Neurochemistry International**, v. 87, p. 22-33, 2015.

COSTA, ANA PAULA; LOPES, MARK WILLIAM; RIEGER, DÉBORA K.; BARBOSA, SABRINA GIOVANA ROCHA; **GONÇALVES, FILIPE MARQUES**; XIKOTA, JOÃO CARLOS; WALZ, ROGER; LEAL, RODRIGO B. Differential Activation of Mitogen-Activated Protein Kinases, ERK 1/2, p38MAPK and JNK p54/p46 During Postnatal Development of Rat Hippocampus. **Neurochemical Research**, v.41, p1160-1169, 2015.

PERES, TANARA V.; EYNG, HELENA; LOPES, SAMANTHA C.; COLLE, DIRLEISE; **GONÇALVES, FILIPE MARQUES**; VENSKE, DÉBORA K.R.; LOPES, MARK W.; BEN, JULIANA; BORNHORST, JULIA; SCHWERDTLE, TANJA; ASCHNER, MICHAEL; FARINA, MARCELO; PREDIGER, RUI D.; LEAL, RODRIGO B. Developmental exposure to manganese induces lasting motor and cognitive impairment in rats. **Neurotoxicology** (Park Forest South), v. 50, p. 28-37, 2015.

BEN, JULIANA; DE OLIVEIRA, PAULO ALEXANDRE; **GONÇALVES, FILIPE MARQUES**; PERES, TANARA VIEIRA; MATHEUS, FILIPE CARVALHO; HOELLER, ALEXANDRE ADEMAR; LEAL, RODRIGO BAINY; WALZ, ROGER; PREDIGER, RUI DANIEL. Effects of Pentylentetrazole Kindling on Mitogen-Activated Protein Kinases Levels in Neocortex and Hippocampus of Mice. **Neurochemical Research**, v. 39, p. 2492-2500, 2014.

**GONÇALVES, FILIPE MARQUES**; FREITAS; ANDIARA ESPÍNDOLA; PERES, TANARA VIEIRA; RIEGER, DÉBORA KURRLE; BEN, JULIANA; MAESTRI, MARIANA; COSTA, ANA PAULA; TRAMONTINA, ANA CAROLINA; GONÇALVES, CARLOS ALBERTO; RODRIGUES, ANA LÚCIA SEVERO; NAGANO, CELSO SHINITI; TEIXEIRA, EDSON

HOLANDA; NASCIMENTO, KYRIA S.; CAVADA, BENILDO SOUSA; LEAL, RODRIGO BAINY. Vatairea macrocarpa Lectin (VML) Induces Depressive-like Behavior and Expression of Neuroinflammatory Markers in Mice. **Neurochemical Research**, v. 38, p. 2375-2384, 2013.

BEN, JULIANA; GONÇALVES, FILIPE MARQUES; ALEXANDRE OLIVEIRA, PAULO; VIEIRA PERES, TANARA; HOHL, ALEXANDRE; BAINY LEAL, RODRIGO; ABRÃO CAVALHEIRO, ESPER; DANIEL SCHRODER PREDIGER, RUI; WALZ, ROGER . Brain MAPKs Levels are Differentially Associated with Seizures Threshold and Severity Progression in Pentylentetrazole-Kindled Mice. **CNS Neuroscience & Therapeutics (Print)**, v. 19, p. 726-729, 2013.



## Sumário

1	Introdução.....	25
1.1	Sistema Purinérgico.....	25
1.2	Inosina.....	26
1.3	Efeitos biológicos da inosina.....	27
1.4	Inosina como agonista dos receptores de adenosina.....	29
1.4.1	Receptor A <sub>1</sub> .....	29
1.4.2	Receptor A <sub>2A</sub> .....	32
1.4.3	Receptor A <sub>3</sub> .....	34
2	Justificativa.....	3
6		
3	Objetivos.....	38
3.1	Objetivo geral.....	38
4	Capítulo I – Mecanismos neuroquímicos associados ao efeito tipo-antidepressivo de inosina.....	39
4.1	Introdução.....	40
4.1.1	Depressão: Aspectos gerais.....	40
4.1.2	Hipótese monoaminérgica.....	43
4.1.3	Hipótese neurotrófica.....	44
4.1.4	Sinalização celular e depressão.....	47
4.1.5	Sistema glutamatérgico e depressão.....	50
4.1.6	Depressão e sistema purinérgico.....	57
4.2	Objetivos específicos:.....	60
4.3	Metodologia.....	61
4.3.1	Animais.....	61
4.3.2	Tratamento farmacológico.....	61
4.3.3	Teste de suspensão pela cauda (TSC).....	61
4.3.4	Teste do Campo Aberto (TCA).....	62
4.3.5	Protocolo experimental.....	62
4.3.6	Western Blotting.....	66
4.3.7	Análise Estatística.....	69
4.4	Resultados.....	70
4.4.1	Efeito tipo-antidepressivo de inosina no TSC.....	70
4.4.2	Envolvimento da ativação de MEK/ERK, CAMKII, PKA e PI3K/AKT no efeito tipo antidepressivo de inosina.....	70
4.4.3	Envolvimento de GSK-3 $\beta$ no efeito tipo antidepressivo de inosina.....	74
4.4.4	Efeito da administração de inosina na fosforilação e imunoconteúdo de CREB.....	75

4.4.5	Envolvimento dos receptores NMDA e AMPA no efeito tipo-antidepressivo de inosina .....	77
4.4.6	Envolvimento da mTORC1 no efeito tipo antidepressivo de inosina .....	81
4.4.7	Avaliação da expressão dos receptores de adenosina A <sub>1</sub> e A <sub>2A</sub> após a administração de inosina .....	86
4.5	Discussão .....	89
5	Capítulo 2 – Efeito protetor de inosina contra o dano celular induzido pela exposição ao MeHg em cultura primária de astrócitos .....	101
5.1	Introdução .....	102
5.1.1	Mercúrio e MeHg: aspectos gerais .....	102
5.1.2	Absorção e distribuição .....	103
5.1.3	Efeitos decorrentes da exposição ao MeHg .....	104
5.1.4	Mecanismos Moleculares da toxicidade do MeHg .....	106
5.1.5	Tratamento da intoxicação .....	107
5.2	Objetivos específicos .....	109
5.3	Metodologia .....	110
5.3.1	Animais .....	110
5.3.2	Cultura Primária de Astrócitos e Tratamento com MeHg .....	11
0		
5.3.3	Teste da redução do MTT .....	111
5.3.4	Liberação de lactato desidrogenase (LDH) .....	112
5.3.5	Produção de ERO .....	112
5.3.6	RT-qPCR .....	112
5.3.7	Dosagem de Glutationa (GSH) .....	114
5.3.8	Imunocitoquímica .....	114
5.3.9	Ativação de ARE – transfecção com plasmídeo ARE – Luciferase .....	115
5.3.10	Western-Blotting .....	115
5.3.11	Dosagem de proteínas .....	117
5.3.12	Análise Estatística .....	117
5.4	Resultados .....	118
5.4.1	Efeito neuroprotetor de inosina frente a toxicidade induzida por MeHg .....	118
5.4.2	Efeito dos tratamentos com Inosina e/ou MeHg na produção de ERO e na concentração de GSH total e reduzida .....	122
5.4.3	Efeito do tratamento com inosina na expressão de genes relacionados a resposta antioxidante .....	123

5.4.4	Efeito do tratamento com inosina no imunoconteúdo, ativação e translocação de Nrf2 para o núcleo .....	124
5.4.5	Efeito dos antagonistas para receptores de adenosina no efeito neuroprotetor de inosina frente a toxicidade induzida por MeHg	128
5.4.6	Efeito do tratamento com MRS1523 no aumento da expressão de Nrf2 por inosina .....	131
5.4.7	Participação da modulação de PI3K/AKT e MEK/ERK no efeito neuroprotetor de inosina.....	131
5.4.8	Efeito do tratamento com inosina na expressão de BDNF.	135
5.5	Discussão .....	137
6	Considerações finais .....	148
7	Conclusões.....	151
8	Perspectivas.....	152
9	Referências Bibliográficas.....	153





## 1 Introdução

### 1.1 Sistema Purinérgico

O sistema purinérgico compreende um complexo sistema envolvendo os nucleotídeos e nucleosídeos derivados da adenina e guanina, seus transportadores, receptores de membrana e proteínas envolvidas no seu metabolismo e interconversão (SCHMIDT, LARA e SOUZA, 2007; DI LIBERTO et al., 2016). Este sistema está envolvido na modulação de diversas funções fisiológicas como a regulação do sono, comportamento locomotor, memória, cognição, neuroproteção, dor e humor, o que representa um potencial alvo terapêutico para a modulação farmacológica (SAWYNOK e REID, 1997; RALEVIC e BURNSTOCK, 1998; DUNWIDDIE e MASINO, 2001; RIBEIRO, SEBASTIAO e DE MENDONCA, 2002; BLUM et al., 2003; CUNHA, R. A. et al., 2008; TAKAHASHI, PAMPLONA e PREDIGER, 2008; POPOLI e PEPPONI, 2012; KASTER et al., 2013; NOGUCHI et al., 2013).

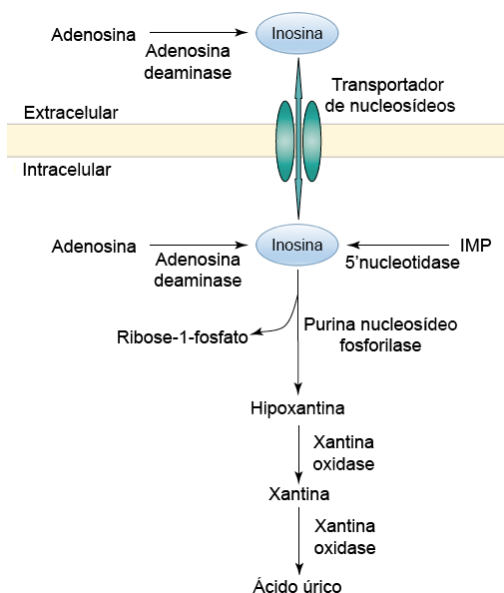
Atualmente, os efetores mais estudados do sistema purinérgico são o trifosfato de adenosina (ATP) e a adenosina, que se interconvertem na dependência de diferentes enzimas. As NTPDases (nucleosídeo trifosfato difosfohidrolases) são capazes de promover a hidrólise de nucleotídeos trifosfatados e difosfatados em nucleotídeos monofosfatado, enquanto a adenilato cinase é responsável pela conversão de AMP em ATP. Adicionalmente, o ADP pode ser hidrolisado pela enzima ecto-ADPase. Por sua vez, a hidrólise de nucleotídeos monofosfatados, como no caso do monofosfato de adenosina (AMP) formando adenosina, é catalisada pela enzima 5'-nucleotidase, enquanto a conversão de adenosina em AMP é catalisada pela enzima adenosina cinase. O ATP no espaço extracelular também pode ser decorrente da liberação por exocitose de vesículas contendo esse nucleotídeo, ou através de transportadores e canais na membrana celular, podendo ativar os receptores purinérgicos do tipo P2 (subtipos: P2X e P2Y) (HAYDON, 2012; ZIMMERMANN, ZEBISCH e STRATER, 2012; DIAS et al., 2013).

Como mencionado anteriormente, a formação de adenosina pode ocorrer pela ação da enzima 5'-nucleotidase sendo esta via dependente das concentrações de AMP, que por sua vez está intimamente relacionado ao nível energético da célula (HAYDON, 2012; DIAS *et al.*, 2013). A adenosina também pode ser formada no espaço intracelular por uma via alternativa relacionada à clivagem da S-adenosilhomocisteína pela enzima S-adenosilhomocisteína hidrolase, sendo o equilíbrio dessa reação dependente das concentrações de S-adenosilhomocisteína, adenosina e

homocisteína (LLOYD e SCHRADER, 1993). Adicionalmente, o transporte de adenosina (e outros nucleosídeos) entre os espaços intracelular e extracelular pode ocorrer principalmente por meio dos transportadores bidirecionais de nucleosídeos equilibrativos (ENTs, que transportam adenosina de acordo com o gradiente de concentração dessa purina) ou dos transportadores unidirecionais concentrativos (CNTs que utilizam o gradiente de sódio como força motriz para o importe de adenosina), contribuindo na modulação dos níveis de adenosina entre os espaços extra e intracelular (PARKINSON *et al.*, 2011). No espaço extracelular, adenosina pode se ligar e ativar os receptores purinérgicos do tipo P1, denominados receptores  $A_1$ ,  $A_{2A}$ ,  $A_{2B}$  e  $A_3$  (DIAS *et al.*, 2013; CHEN, LEE e CHERN, 2014). Por fim, adenosina pode ser convertida em inosina sob ação da enzima adenosina deaminase (ADA). O valor de  $K_m$  para a enzima ADA no cérebro é estimado entre 17-45  $\mu\text{M}$ , enquanto o  $K_m$  para a enzima adenina cinase é em torno de 2  $\mu\text{M}$ . Uma vez que a concentração basal de adenosina é em torno de 10-50 nM, em situações fisiológicas o principal destino metabólico da adenosina envolve a sua fosforilação e formação de AMP (LATINI e PEDATA, 2001).

## 1.2 Inosina

A inosina é um nucleosídeo do sistema purinérgico, originado a partir da adenosina numa reação catalisada pela enzima ADA, tanto no meio intracelular quanto no extracelular. Adicionalmente, a inosina também pode ser formada a partir de inosina-monofosfato (IMP), através da reação catalisada pela enzima 5'nucleotidase. Em situações como hipóxia e isquemia, os níveis de adenosina podem aumentar drasticamente no espaço intracelular (até 50 vezes), favorecendo a conversão de adenosina para inosina. O transporte de inosina entre o meio extracelular e o meio intracelular ocorre através dos transportadores bidirecionais equilibrativos de nucleosídeos ENT1, ENT2 e ENT3 (com  $K_m$  de 0,005 mM), e dos transportadores concentrativos CNT2 (com  $K_m$  de 0,005 mM) e CNT3 (com  $K_m$  de 0,053 mM) (PARKINSON *et al.*, 2011). No espaço intracelular, inosina sob ação da enzima purina nucleosídeo fosforilase forma ribose-1-fosfato e hipoxantina. Hipoxantina por sua vez é metabolizada em xantina e ácido úrico sob ação da enzima xantina oxidase, sendo o ácido úrico o produto final da via e direcionado para excreção do organismo através da urina. A figura 1 representa de maneira esquemática as principais reações envolvidas no metabolismo de inosina (BARANKIEWICZ e COHEN, 1985; HASKO, SITKOVSKY e SZABO, 2004; HAYDON, 2012).



**Figura 1. Metabolismo de inosina.** A enzima adenosina deaminase converte adenosina para inosina tanto no espaço extracelular quanto no intracelular. Adenosina ou inosina são transportadas entre os espaços extra e intracelular através dos transportadores de nucleosídeos. No espaço intracelular, inosina pode ser metabolizada levando a formação de ácido úrico. Adaptado de HASKO, SITKOVSKY e SZABO, (2004).

A concentração basal plasmática de inosina é estimada em torno de  $5,07 \mu\text{M}$  (ALI-SISTO *et al.*, 2016), enquanto no cérebro a concentração média de inosina é  $75 \text{ pmol/mg}$  de tecido (KOVACS *et al.*, 2009). Em situações de dano celular como hipóxia, a concentração de inosina pode aumentar drasticamente, chegando a níveis superiores a  $1\text{mM}$  (JUHASNAGY e AVIADO, 1977; JABS, NEGLEN e EKLOF, 1995; HASKO *et al.*, 2000).

### 1.3 Efeitos biológicos da inosina

Originalmente acreditava-se que a inosina representava apenas um metabólito da adenosina incapaz de exercer algum efeito biológico. Contudo, a partir década de 1960 foi demonstrado que essa purina pode exercer efeitos biológicos no tecido hepático e sistema cardiovascular

(CARMINATI, 1963; TINCANI e TRALDI, 1963; CORSINI, GRAZIA e MEI, 1964; JUHASZ-NAGY e AVIADO, 1977; AVIADO, 1978).

Atualmente diversos estudos na literatura demonstram que inosina apresenta um importante efeito anti-inflamatório via ativação de receptores de adenosina e inibição da produção de citocinas pró-inflamatórias como o fator de necrose tumoral alfa, interleucinas, interferon gama e redução da ativação de neutrófilos (HASKO *et al.*, 2000; MARTON *et al.*, 2001; GOMEZ e SITKOVSKY, 2003).

No sistema nervoso central (SNC), inosina emerge como uma molécula com potencialidade de exercer atividade neuroprotetora. Estudos clínicos sugerem que ela pode ser útil no tratamento da esclerose múltipla e doença de Parkinson, além do tratamento crônico com inosina não apresentar efeitos colaterais significativos (MARKOWITZ *et al.*, 2009; SCHWARZSCHILD *et al.*, 2013; CIPRIANI, BAKSHI e SCHWARZSCHILD, 2014). Foi demonstrado ainda que inosina induz respostas neuroprotetoras e tróficas em neurônios e astrócitos submetidos à hipóxia e privação de oxigênio e glicose (HAUN *et al.*, 1996) além de promover o crescimento axonal *in vitro* e *in vivo* (HAUN *et al.*, 1996; BENOWITZ *et al.*, 1999; BENOWITZ, GOLDBERG e IRWIN, 2002; MUTO *et al.*, 2014). Adicionalmente foi verificado que inosina protegeu as células contra a morte celular *in vitro*, além de atenuar o dano oxidativo causado pelo tratamento com peróxido de hidrogênio (CIPRIANI, BAKSHI e SCHWARZSCHILD, 2014). A administração crônica de inosina preveniu as alterações comportamentais e bioquímicas induzidos por um modelo animal de esclerose múltipla (JUNQUEIRA *et al.*, 2016), além do efeito antinociceptivo de inosina também já ter sido demonstrado (NASCIMENTO *et al.*, 2010; MACEDO-JUNIOR *et al.*, 2012; NASCIMENTO *et al.*, 2014). Inosina também foi capaz de exercer um efeito tipo-antidepressivo em modelos de desespero comportamental e em modelos de estresse crônico em camundongos (KASTER *et al.*, 2013; MUTO *et al.*, 2014). A administração intracerebroventricular (i.c.v.) de inosina preveniu os danos causados pela isquemia cerebral em ratos, diminuiu respostas eletrofisiológicas glutamatérgicas pós-sinápticas (SHEN *et al.*, 2005), além de exibir atividade anticonvulsivante em camundongos (GANZELLA *et al.*, 2011).

Os mecanismos moleculares associados aos efeitos de inosina ainda não estão totalmente elucidados. O tratamento com inosina em seres humanos foi responsável por causar um aumento na concentração plasmática de ácido úrico, o que poderia estar relacionado com os efeitos protetores dessa purina no tratamento da doença de Parkinson (SCHWARZSCHILD *et al.*, 2013; BHATTACHARYYA *et al.*, 2016).

Adicionalmente, alguns estudos sugerem que inosina pode promover o crescimento de axônios através da ativação da proteína intracelular GAP-43 (BENOWITZ *et al.*, 1999; BENOWITZ, GOLDBERG e IRWIN, 2002), ou interagir com receptores GABA (YAROM *et al.*, 1998). Até o momento não foi descrito um receptor específico para inosina ou possível interação dessa purina com receptores purinérgicos do tipo P2, contudo, um conjunto significativo de evidências tem indicado o papel dos receptores purinérgicos do tipo P1 (receptores de adenosina), nos efeitos biológicos dessa purina. Estes receptores quando ativados podem desencadear a ativação de vias de sinalização celular relacionadas a diferentes processos celulares como, neuroproteção e neuroplasticidade (CHEN, LEE e CHERN, 2014).

#### 1.4 Inosina como agonista dos receptores de adenosina.

Uma série de evidências na literatura indicam uma interação e ativação de receptores de adenosina pela inosina, principalmente os receptores  $A_1$ ,  $A_{2A}$  e  $A_3$ . Até o momento não existem dados sólidos relacionando a ativação de receptores  $A_{2B}$  por inosina, sendo que alguns trabalhos sugerem que essa purina não é capaz de modular esses receptores (FREDHOLM *et al.*, 2001; DA ROCHA LAPA *et al.*, 2013).

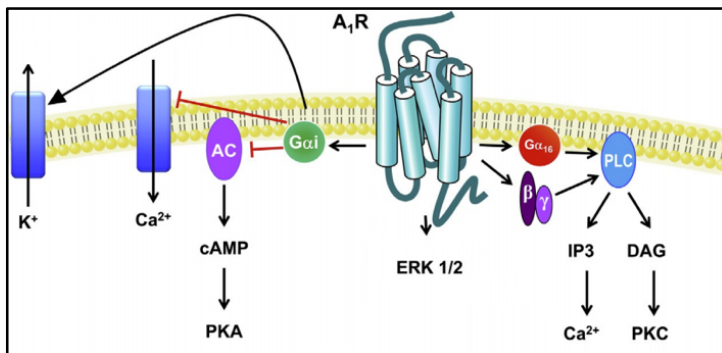
A inosina pode ser considerada um agonista dos receptores  $A_1$  e  $A_3$  com valores de EC50 de 290  $\mu\text{M}$  e 0,25  $\mu\text{M}$  respectivamente. Também já foi demonstrado que inosina pode exercer uma atividade agonista em receptores  $A_{2A}$  (WELIHINDA *et al.*, 2016). Neste sentido, uma série de trabalhos tem demonstrado que a ativação de receptores de adenosina por inosina é essencial para os efeitos dessa purina (JIN *et al.*, 1997; GAO *et al.*, 2001; GOMEZ e SITKOVSKY, 2003; SHEN *et al.*, 2005; NASCIMENTO *et al.*, 2010; KASTER *et al.*, 2013; KURICOVA *et al.*, 2014; NASCIMENTO *et al.*, 2014; WELIHINDA *et al.*, 2016). Contudo, existem poucas evidências na literatura entre a relação dos efeitos biológicos de inosina e a modulação de diferentes sinais intracelulares decorrentes da ativação desses receptores por essa purina.

##### 1.4.1 Receptor $A_1$

O receptor  $A_1$  é amplamente distribuído no SNC, em regiões como o cerebelo, córtex cerebral, hipocampo, tálamo, medula espinhal, tronco encefálico e bulbo olfatório (DIXON *et al.*, 1996; CARRUTHERS *et al.*, 2001; SAWYNOK e LIU, 2003; SCHULTE e FREDHOLM, 2003).

Os receptores  $A_1$  são classicamente associados à sua atividade inibitória. A ativação pré-sináptica desses receptores inibe a liberação de neurotransmissores, enquanto a ativação pós-sináptica hiperpolariza a célula (GESSI *et al.*, 2011; CHEN, LEE e CHERN, 2014). A ativação desses receptores é responsável pelos efeitos ansiolítico, anticonvulsivante, sedativo e analgésico de adenosina. A ativação de  $A_1$  também pode modular a neurotransmissão glutamatérgica, uma vez que a ativação pré e pós-sináptica desses receptores diminui a liberação de glutamato e hiperpolariza a membrana celular, inibindo os receptores NMDA. (DE MENDONCA e RIBEIRO, 2000; DE MENDONCA, SEBASTIAO e RIBEIRO, 2000; RIBEIRO, SEBASTIAO e DE MENDONCA, 2002).

A sinalização desencadeada pela ativação do receptor  $A_1$  está representada de maneira esquemática na figura 2. Esse receptor é acoplado à família das proteínas Gi/o, sendo que alguns de seus efeitos biológicos se devem à inibição da formação de AMP-cíclico (AMPC) (SAWYNOK e LIU, 2003; BURNSTOCK, FREDHOLM e VERKHRATSKY, 2011). As subunidades beta e gama da proteína G acoplada ao  $A_1$ , quando ativadas induzem ativação da fosfolipase C (PLC), levando a formação de diacilglicerol (DAG) e inositol 1,4,5 trifosfato (IP3), induzindo um aumento dos níveis intracelulares de  $Ca^{2+}$ . O aumento da concentração intracelular de  $Ca^{2+}$  facilita a ativação de algumas enzimas como PKC, fosfolipase D (PLD), fosfolipase A2 (PLA2) entre outras. A ativação de  $A_1$  também causa ativação da proteína cinase ativada por mitógeno (MAPK), especificamente ERK1/ERK2 (SCHULTE e FREDHOLM, 2003; BOISON, CHEN e FREDHOLM, 2009). As proteínas ERK1/2 exercem ações regulatórias sobre mecanismos de proliferação e diferenciação celular (THOMAS e HUGANIR, 2004), e também participam de processos de memória hipocampal e da plasticidade sináptica (SWEATT, 2004; THOMAS e HUGANIR, 2004). ERK1/2 são translocadas do citosol para o núcleo, onde via RSK (ribossomal 6 cinase) ativam fatores de transcrição como CREB (elemento de resposta ao AMPC) regulando a transcrição gênica. Alguns estudos também indicam que a ativação do receptor  $A_1$  pode desencadear uma sinalização envolvendo PI3K/AKT (CHENG *et al.*, 2010; NAYAK, PRENTICE e MILTON, 2010; UMAPATHY *et al.*, 2013).



**Figura 2. Sinalização desencadeada pela ativação do receptor A1 (A<sub>1</sub>R).** A ativação desses receptores leva inibição de adenilato ciclase (AC), diminuindo os níveis de AMPc e atividade de PKA. Adicionalmente esses receptores podem ativar a fosfolipase C (PLC) levando a produção de inositol-3-fosfato (IP<sub>3</sub>) e diacilglicerol (DAG) que podem mobilizar as reservas intracelulares de cálcio e ativar a proteína cinase C (PKC). A ativação de A<sub>1</sub>R também pode regular a atividade de ERK 1/2 e modular canais de cálcio de potássio. Adaptado de CHEN, LEEN e CHERN (2014)

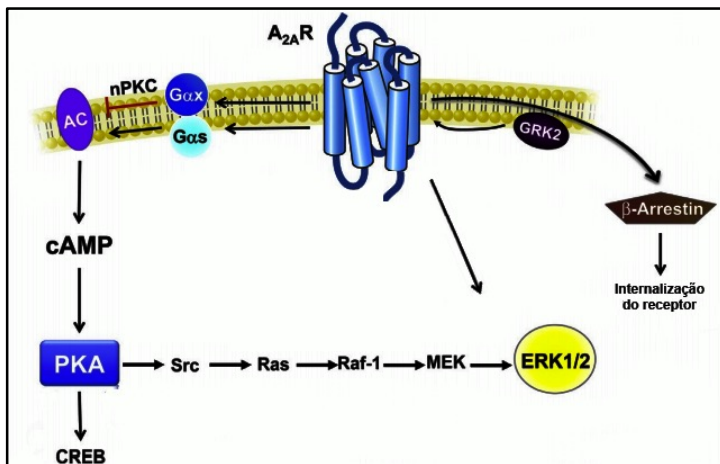
Já foi descrito o envolvimento dos receptores A<sub>1</sub> no efeito antinociceptivo de inosina (NASCIMENTO *et al.*, 2014). O efeito antinociceptivo de inosina em camundongos observado através do teste da formalina foi abolido pelo tratamento com DPCPX (antagonista seletivo de receptores A<sub>1</sub>), indicando a ativação desse receptor nesses efeitos. O tratamento com inosina não induziu antinocicepção tanto em animais *knockout* para os receptores A<sub>1</sub> ou em animais que tiveram a expressão reduzida desse receptor (através do tratamento com oligonucleotídeos antisense). Adicionalmente, resultados do teste de ligação competitiva usando o antagonista de receptores A<sub>1</sub> marcado radiotivamente (<sup>3</sup>H-DPCPX), demonstraram que inosina se liga com receptores de adenosina com alta afinidade. Inosina foi capaz de deslocar a ligação de <sup>3</sup>H-DPCPX nos receptores de adenosina em amostra de cérebro de camundongos de maneira similar a adenosina [valor de K<sub>i</sub> para inosina: 5,9 nM (1,5-23,7); valor de K<sub>i</sub> para adenosina 18,9 nM (2,8-127,2)] (NASCIMENTO *et al.*, 2014). De maneira conjunta esses resultados indicam que inosina é capaz de se ligar e ativar receptores A<sub>1</sub>.

#### 1.4.2 Receptor A<sub>2A</sub>

A expressão do receptor A<sub>2A</sub> de adenosina no sistema nervoso, ocorre principalmente em regiões como o putamen, núcleo acumbens, ou em neurônios sensoriais primários. Este receptor também pode ser expresso em outras regiões cerebrais como o córtex e o hipocampo (DIXON *et al.*, 1996; RALEVIC e BURNSTOCK, 1998; CARRUTHERS *et al.*, 2001). A ativação dos receptores A<sub>2A</sub> pode modular a transmissão glutamatérgica de maneira diversa, causando um aumento na liberação de glutamato e ativação de receptores NMDA. (DE MENDONCA e RIBEIRO, 2000; DE MENDONCA, SEBASTIAO e RIBEIRO, 2000; RIBEIRO, SEBASTIAO e DE MENDONCA, 2002). Porém, já foi demonstrado que esse receptor pode causar efeitos inibitórios relacionados a inativação de receptores NMDA em neurônios estriatais (GEREVICH, WIRKNER e ILLES, 2002).

A<sub>2A</sub> é acoplado a proteínas Gs levando a ativação da adenilato ciclase e conseqüentemente o aumento da produção de AMPc que pode induzir a ativação da proteína cinase A (PKA). Então, a PKA se torna capaz de alvos intracelulares como por exemplo os canais de Ca<sup>2+</sup>, canais e K<sup>+</sup> (FREDHOLM, CUNHA e SVENNINGSSON, 2003; CUNHA, R. A. *et al.*, 2008; BURNSTOCK, FREDHOLM e VERKHRATSKY, 2011). A ativação de PKA também é capaz de fosforilar e ativar CREB. A ativação de CREB por sua vez leva a transcrição de vários genes, muitos deles associados à neuroproteção, à neuroplasticidade e a ação antidepressiva, como o BDNF (CASTREN e RANTAMAKI, 2010). A ativação de PKA também pode conduzir à ativação de ERK/1,2 (SCHULTE e FREDHOLM, 2003). Adicionalmente, foi demonstrado em células PC12 que a ativação do receptor A<sub>2A</sub> pode levar a ativação de uma isoforma de PKC (nPKC) que regula negativamente adenilato ciclase. Esse efeito inibitório está relacionado com a terminação da produção de AMPc, proporcionando um controle estrito na produção desse segundo mensageiro pelo receptor A<sub>2A</sub> (LAI *et al.*, 1997). Por fim a ativação de proteína cinase 2 de GPCRs (GRK2) promove a fosforilação e recrutamento por β-arrestina, que conduzem à internalização deste receptor (CHEN, LEE e CHERN, 2014). A figura 3 exemplifica de maneira esquemática os mecanismos de sinalização celular desencadeados pela ativação do receptor A<sub>2A</sub> de adenosina.



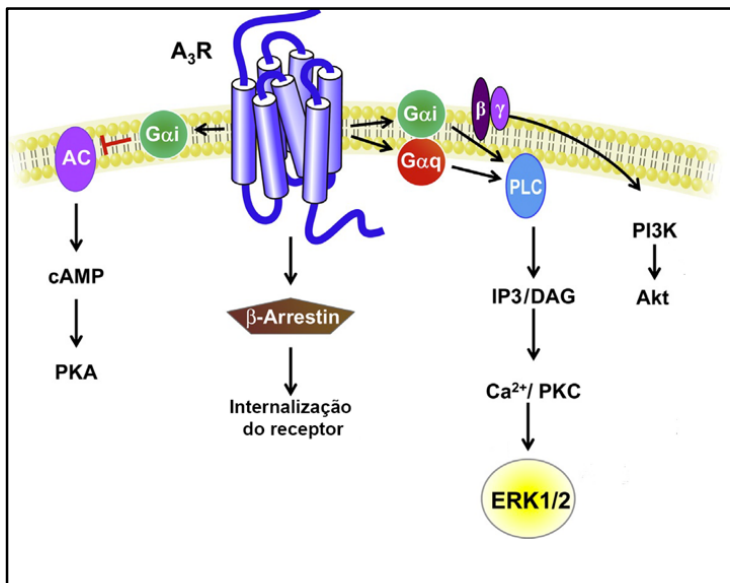


**Figura 3. Sinalização desencadeada pela ativação do receptor A<sub>2A</sub> (A<sub>2A</sub>R).** A ativação desses receptores leva a ativação de adenilato ciclase (AC), aumentando os níveis de AMPc e atividade de PKA, levando a fosforilação de CREB. Esses receptores também podem regular a atividade de ERK 1/2. A fosforilação desses receptores pela proteína cinase 2 de GPCR (GRK-2) leva ao recrutamento por β-arrestin e internalização do receptor. Adaptado de CHEN, LEEN e CHERN (2014).

Também foi demonstrado por Welihinda et al (2016) que inosina pode atuar como agonista dos receptores A<sub>2A</sub>. A ativação desses receptores por inosina em células CHO-K1 pode levar à formação de AMPc ( $EC_{50} = 300,7\mu M$ ) e aumentar a fosforilação de ERK 1/2 ( $EC_{50} = 89,38\mu M$ ). Resultados de ensaios de ligação em equilíbrio indicaram a habilidade de inosina de reduzir a ligação de um agonista A<sub>2A</sub> marcado radiotivamente (<sup>3</sup>H-CGGS 21680). Através de estudos com mutação sítio-dirigida e predição da estrutura cristalográfica do receptor A<sub>2A</sub> em humanos, foi concluído que o resíduo Asn<sup>253</sup> é essencial para ativação desse receptor (LEBON *et al.*, 2011), o que permitiu especular que inosina pode interagir com o receptor A<sub>2A</sub> através de uma ligação de hidrogênio entre o N<sup>7</sup> do anel de adenina de inosina com o resíduo Asn<sup>253</sup> na região agonista do receptor (WELIHINDA *et al.*, 2016).

### 1.4.3 Receptor A<sub>3</sub>

Os receptores A<sub>3</sub> são expressos de maneira difusa no SNC e possuem uma afinidade por adenosina semelhante aos receptores A<sub>1</sub>, porém são expressos em baixa quantidade no SNC (ARMSTRONG e GANOTE, 1994). Contudo, a deleção genética desse receptor indicou o envolvimento de A<sub>3</sub> em diferentes processos como função motora, sobrevivência celular e processamento da dor (FEDOROVA *et al.*, 2003; CHEN, LEE e CHERN, 2014). A sinalização desencadeada pela ativação do receptor A<sub>3</sub> está representada de maneira esquemática na figura 4. A ativação desse receptor leva a inibição da adenilato ciclase e ativação da PLC, IP3, DAG, PKC. Além disso, assim como outros receptores adenosinérgicos, o receptor A<sub>3</sub> pode ativar a via das MAPK (JUHASNAGY e AVIADO, 1977; AVIADO, 1978), principalmente ERK1/2 (ARMSTRONG e GANOTE, 1994; ABBRACCHIO *et al.*, 1995; PALMER, BENOVIC e STILES, 1995). O receptor A<sub>3</sub> também está envolvido na ativação da via da PI3K/AKT, que está implicada em sobrevivência neuronal, uma vez que proteínas pró-apoptóticas como BAD e membros da família dos fatores de transcrição “forkhead” como FOXO são inibidos pela fosforilação AKT-dependente. AKT também pode fosforilar e inativar GSK-3 $\beta$ , sendo essa inibição associada a respostas neuroprotetoras e antidepressivas (KAIDANOVICH-BEILIN *et al.*, 2012). Assim como os outros receptores, o recrutamento do receptor A<sub>3</sub> por  $\beta$ -arrestina promove a sua internalização.



**Figura 4 .Sinalização desencadeada pela ativação do receptor A<sub>3</sub> (A<sub>3</sub>R).** A ativação desses receptores leva à inibição de adenilato ciclase (AC), diminuindo os níveis de AMPc e atividade de PKA. Adicionalmente, esses receptores podem ativar a fosfolipase C (PLC) levando a produção de inositol-3-fosfato (IP<sub>3</sub>) e diacilglicerol (DAG) que podem mobilizar as reservas intracelulares de cálcio e ativar a proteína cinase C (PKC). A<sub>3</sub>R também podem modular a ativação de PI3K/AKT. Adaptado de CHEN, LEEN e CHERN (2014).

Algumas evidências na literatura suportam a hipótese de que inosina pode ativar os receptores A<sub>3</sub>. O efeito neuroprotetor da inosina *in vivo* contra a isquemia cerebral foi abolido pelo tratamento com MRS1191, antagonista seletivo dos receptores A<sub>3</sub> (SHEN *et al.*, 2005). Inosina compete com o agonista A<sub>3</sub> ([<sup>125</sup>I]N<sup>6</sup>-aminobenziladenosina) para a ligação com esse receptor (IC<sub>50</sub> 25±6 μM), além de o tratamento com inosina (10-50 μM) ser capaz de ativar esses receptores em diferentes tipos celulares (JIN *et al.*, 1997).

## 2 Justificativa

A modulação do sistema purinérgico pode estar envolvida em diversos processos no SNC, sendo a sua modulação um importante alvo para o tratamento de doenças neurodegenerativas e transtornos psiquiátricos (ORTIZ *et al.*, 2014; BURNSTOCK, 2016). Os receptores de adenosina que podem ser ativados por inosina são capazes de modular uma complexa sinalização intracelular que pode conduzir a respostas neuroprotetoras, neurotróficas e de plasticidade sináptica, além de estarem envolvidos na modulação de outros sistemas de neurotransmissão, como o sistema glutamatérgico (GESSI *et al.*, 2011; CHEN, LEE e CHERN, 2014). A inosina é um nucleosídeo endógeno formada a partir da adenosina, que foi considerada por muito tempo um metabólito sem função biológica. Contudo, nos últimos anos um crescente conjunto de evidências vem indicando o papel biológico dessa purina, destacando que inosina pode ativar receptores de adenosina e desencadear uma série de respostas como efeitos neuroprotetores, antidepressivos e anticonvulsivantes (HASKO, SITKOVSKY e SZABO, 2004; SHEN *et al.*, 2005; KASTER *et al.*, 2013). Adicionalmente, estudos clínicos têm mostrado o potencial terapêutico dessa purina no tratamento de doenças neurodegenerativas, sem a ocorrência de efeitos colaterais significativos (MARKOWITZ *et al.*, 2009; SCHWARZSCHILD *et al.*, 2013; CIPRIANI, BAKSHI e SCHWARZSCHILD, 2014).

Apesar de um considerável número de trabalhos destacarem o potencial da inosina na ativação de receptores adenosinérgicos, existem poucas evidências das vias de sinalização que podem ser desencadeadas por essa ativação, e a relação desses eventos com os efeitos biológicos de inosina. Já foi demonstrado que a inosina pode exercer um efeito tipo-antidepressivo em camundongos, sendo esse efeito dependente da ativação de receptores  $A_1$  e  $A_{2A}$  de adenosina (KASTER *et al.*, 2013). Contudo, os mecanismos de sinalização intracelular envolvidos no efeito antidepressivo da inosina ainda não foram demonstrados na literatura. Além disso, alguns trabalhos sugerem uma possível atividade inibitória da inosina em relação ao sistema glutamatérgico (SHEN *et al.*, 2005; GANZELLA *et al.*, 2011), sendo que o sistema glutamatérgico é um importante alvo na busca de novos fármacos com ação antidepressiva. Dessa forma, o estudo dos mecanismos neuroquímicos envolvidos no efeito antidepressivo da inosina contribuem para o entendimento do envolvimento do sistema purinérgico na etiologia da depressão e

futuramente no desenvolvimento de novas alternativas terapêuticas para o tratamento dessa doença.

Neste contexto, alguns trabalhos também sugerem que inosina pode exercer um efeito neuroprotetor *in vitro* (HASKO, SITKOVSKY e SZABO, 2004). Dessa maneira o estudo dos mecanismos envolvidos nesses efeitos pode fornecer novos dados relacionados aos mecanismos da ação dessa purina na modulação do sistema purinérgico e vias de sinalização intracelular. Nesse sentido, o estudo do papel protetor de inosina contra a neurotoxicidade do MeHg, um toxicante que induz um marcante dano oxidativo, pode fornecer uma nova estratégia no tratamento dessas intoxicações, além de indicar o potencial terapêutico de inosina no tratamento de outras neuropatologias com base fisiopatológica similar.

### 3 Objetivos

#### 3.1 Objetivo geral

O presente trabalho teve como objetivo geral identificar os mecanismos neuroquímicos relacionados ao efeito tipo-antidepressivo da inosina, incluindo a participação do sistema glutamatérgico e a modulação de diferentes enzimas de sinalização intracelular. Além disso, buscou avaliar o potencial neuroprotetor de inosina contra a neurotoxicidade induzida pelo metilmercúrio (MeHg) e os principais mecanismos associados a este efeito.

Neste sentido, o presente trabalho foi dividido em dois capítulos: um primeiro destinado aos estudos referentes aos mecanismos relacionados ao efeito tipo-antidepressivo de inosina em camundongos; um segundo relacionado ao potencial efeito neuroprotetor de inosina *in vitro* frente à toxicidade induzida pelo MeHg em cultura primária de astrócitos. Cada capítulo contém uma breve introdução, objetivos específicos, bem como os resultados e discussão pertinentes. Por fim, foi apresentada uma breve conclusão conjunta de ambos os capítulos, bem como as principais perspectivas relacionadas a esse trabalho.

**4 Capítulo I – Mecanismos neuroquímicos associados ao efeito tipo-antidepressivo de inosina.**

## 4.1 Introdução

### 4.1.1 Depressão: Aspectos gerais

Dentre todos os transtornos de humor descritos até o momento, o transtorno depressivo maior (que será denominado depressão nesse trabalho) é apontado como o mais comum. A prevalência mundial deste transtorno de humor é estimada entre 14 -17%, e cerca de 20% da população mundial pode apresentar pelo menos um episódio dessa doença ao longo da vida (SATTLER e ROTHSTEIN, 2007; GUSTAVSSON *et al.*, 2011; OLESEN *et al.*, 2012; VIGO, THORNICROFT e ATUN, 2016). Além disso, estimativas da Organização Mundial de Saúde apontam que em 2030 a depressão será a principal causa de incapacitação laboral (REDDY, 2010).

A depressão pode ser considerada uma doença crônica, recorrente e debilitante que diminui de maneira drástica a qualidade de vida do indivíduo além de apresentar um considerável risco de mortalidade devido à possibilidade de suicídio (NESTLER *et al.*, 2002; KRISHNAN e NESTLER, 2008; ISOMETSA *et al.*, 2015). Adicionalmente, a depressão pode ser considerada um fator de risco para outras doenças ou apresentar comorbidade com doenças crônicas como diabetes do tipo 2, doenças cardiovasculares e neurodegenerativas, epilepsia, transtornos de ansiedade, entre outras (GREEN *et al.*, 2003; KESSLER *et al.*, 2003; BROWN, VARGHESE e MCEWEN, 2004; RUSH *et al.*, 2005; MENZA *et al.*, 2009; KIM, SHIN e SONG, 2015).

Os principais sintomas da depressão são o humor deprimido e anedonia (prejuízo na capacidade de sentir prazer). Além desses sintomas, normalmente são visualizadas outras alterações no paciente, como mudanças no sono e apetite, déficits cognitivos, dificuldade de concentração e até mesmo pensamentos de morte ou suicídio. Devido à ausência de biomarcadores para esses transtornos de humor, o diagnóstico é realizado após uma avaliação clínica do paciente por um profissional qualificado. Atualmente, o diagnóstico da depressão é realizado de acordo com critérios clínicos presentes no Manual de Diagnóstico e Estatístico dos Distúrbios Mentais (DSM-5) (Associação Americana de Psiquiatria, 2013). Para que o indivíduo seja diagnosticado com depressão, deve ser verificado que na maior parte de tempo durante um período de duas semanas o paciente apresente humor deprimido ou anedonia, juntamente com mais 4 dos sintomas listados na Tabela 1.



### Sintomas para diagnóstico de depressão maior

Humor deprimido  
 Anedonia (perda de interesse ou prazer)  
 Perda ou ganho de peso  
 Insônia ou hipersonia  
 Retardo ou agitação psicomotora  
 Fadiga ou perda de energia  
 Sentimentos de culpa ou baixa autoestima  
 Diminuição da capacidade de concentração  
 Pensamentos recorrentes de morte ou suicídio

**Tabela 1. Sintomas para diagnóstico de depressão maior.** Fonte: Manual de Diagnóstico e Estatístico dos Distúrbios Mentais (Associação Americana de Psiquiatria, 2013).

Uma série de evidências obtidas através de estudos de imagem ou através de amostras pós-morte de pacientes diagnosticados com depressão, tem sugerido a presença de alterações em diferentes circuitos neurais em variadas estruturas encefálicas como o córtex pré-frontal (CPF), córtex cingulado, núcleo accumbens, gânglios da base, amígdala, hipocampo, estriado e tálamo. (DREVETS, PRICE e FUREY, 2008; KRISHNAN e NESTLER, 2008; SAVITZ e DREVETS, 2009; RUSSO e NESTLER, 2013). Essas alterações podem modular uma grande quantidade de circuitarias neurais envolvidas com as diferentes alterações comportamentais associadas a esse transtorno de humor, o que pode ser responsável pela grande variedade de sintomas observados em diferentes pacientes (SHELIN, 2000; DREVETS, 2001). Alguns autores sugerem que a depressão pode ser considerada uma doença neurodegenerativa leve, uma vez que é observada uma atrofia neuronal e glial principalmente no CPF e hipocampo de pacientes diagnosticados com esse transtorno (DUMAN e VOLETI, 2012).

O CPF tem um papel importante no controle dos sistemas cognitivo, de recompensa e experiência hedônica, além de estar associado com a capacidade de orquestrar o pensamento e ação (MILLER e COHEN, 2001; KRINGELBACH, 2005). Vários estudos têm demonstrado a associação entre alterações no CPF em pacientes deprimidos. Através de estudos de imagem, foi verificada uma diminuição no fluxo sanguíneo e no metabolismo da glicose no CPF de indivíduos deprimidos (DREVETS, 2001; DREVETS, PRICE e FUREY, 2008). Adicionalmente, já foi observado que em pacientes deprimidos

pode ocorrer uma diminuição do volume da matéria cinzenta e da conectividade global funcional nessa região do cérebro (SHELIN, 2003; MURROUGH *et al.*, 2016). Esses achados levam a concluir que uma diminuição de função do CPF pode estar associada à depressão (HASLER e NORTHOFF, 2011). Desta forma, estas alterações observadas podem ser responsáveis por alguns sintomas observados em pacientes deprimidos, tais como a responsividade exacerbada ao estresse e diminuição na resposta hedônica (DREVETS, 2001; HASLER *et al.*, 2004; DREVETS, PRICE e FUREY, 2008). Além do CPF, o hipocampo é uma das estruturas mais estudadas com relação aos transtornos de humor, incluindo a depressão. O hipocampo é uma região encefálica associada à neurogênese no cérebro adulto, está envolvido com aprendizado e consolidação da memória e é uma das regiões encefálicas com maior neuroplasticidade (BANNERMAN *et al.*, 2004; DENG, AIMONE e GAGE, 2010). O papel da neurogênese hipocampal na resposta antidepressiva também tem sido destacado, principalmente no efeito prolongado dos antidepressivos convencionais (NESTLER *et al.*, 2002). Adicionalmente, é observada uma diminuição no volume total e da matéria cinzenta no hipocampo de pacientes deprimidos, o que pode ser revertido através do tratamento com antidepressivos (SHELIN, 2011; ARNONE *et al.*, 2013).

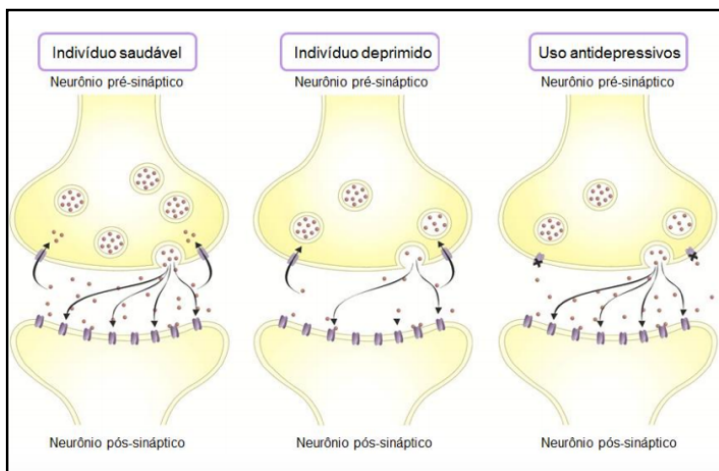
Por outro lado, outras regiões cerebrais como a amígdala podem apresentar hipertrofia (NESTLER *et al.*, 2002). Dessa maneira, é válido mencionar que os resultados obtidos através dos estudos de imagem encontram limitações técnicas e metodológicas, visto que normalmente são feitos em grupos reduzidos de pacientes, o que dificulta as conclusões destes estudos.

Devido ao grande problema de saúde pública que a depressão representa, um grande esforço tem sido realizado para elucidar quais são as bases biológicas associadas a esse transtorno, bem como para a busca de novos tratamentos. Contudo, atualmente os mecanismos neuroquímicos e as alterações morfofuncionais responsáveis por esse transtorno de humor ainda não estão totalmente elucidados. A depressão pode ser considerada uma doença multifatorial, uma vez que alterações celulares e moleculares podem interagir com fatores ambientais e fatores genéticos, contribuindo na etiologia e progressão da doença. Cerca de 40-50% dos casos parece ter a participação de algum componente genético na fisiopatologia da doença, e sabe-se que a ocorrência de eventos estressantes está associada a esse transtorno (HENN e VOLLMAYR, 2005; MANN e CURRIER, 2010). Entretanto, outros fatores como trauma na infância, doença física, e infecções virais podem também estar

relacionados com o surgimento da depressão (BERTON e NESTLER, 2006).

#### 4.1.2 Hipótese monoaminérgica

A primeira hipótese para explicar a etiologia da depressão foi postulada na década de 1960, baseada principalmente nas seguintes observações clínicas: (i) pacientes que utilizavam o anti-hipertensivo reserpina - capaz de diminuir os níveis de monoaminas na fenda sináptica – apresentavam sintomas depressivos; (ii) o tratamento com iproniazida [inibidores da enzima monoamino-oxidase (MAO)] ou com inibidores da recaptação de monoaminas (imipramina) eram capazes de promover um efeito antidepressivo nos pacientes. Essas observações deram fundamento para o surgimento da hipótese monoaminérgica da depressão (ilustrada de maneira esquemática na figura 5), que postula que a depressão é causada por uma deficiência de monoaminas (serotonina, dopamina, norepinefrina e epinefrina) na fenda sináptica (SCHILDKRAUT, 1965; CASTREN, 2005).



**Figura 5. Hipótese monoaminérgica da depressão.** (A): No encéfalo de indivíduos saudáveis os neurotransmissores monoaminérgicos são liberados e se ligam a seus receptores específicos no neurônio pós-sináptico. (B): Segundo a hipótese monoaminérgica da depressão, no encéfalo de indivíduos deprimidos a concentração de monoaminas na fenda sináptica está diminuída, desencadeando o transtorno. (C): O tratamento com fármacos antidepressivos monoaminérgicos restabelece a concentração de monoaminas disponíveis na fenda sináptica, levando a uma melhora clínica do paciente. Fonte: Adaptado de Castrén (2005).

Outro fator que tem reforçado a hipótese monoaminérgica é o fato de que grande parte dos medicamentos disponíveis para o tratamento da depressão são moduladores desse sistema. Esses fármacos incluem os inibidores seletivos da recaptação de serotonina (ex: fluoxetina), inibidores da recaptação de serotonina e norepinefrina (ex: venlafaxina), inibidores da recaptação de norepinefrina e dopamina ex: bupropiona), antidepressivos tricíclicos, que inibem a recaptação de serotonina, norepinefrina e dopamina (ex: imipramina) e inibidores da enzima MAO (ex: iproniazida). (HILLHOUSE e PORTER, 2015). Apesar de amplamente utilizados, a resposta terapêutica a estes medicamentos está longe da ideal. Estima-se que cerca de 60% dos pacientes não respondem a primeira droga escolhida para o tratamento. Além disso, estes medicamentos estão associados a uma série de efeitos colaterais como dores de cabeça, ganho de peso, disfunção sexual, entre outros (NEMEROFF e OWENS, 2002; RUHE *et al.*, 2011).

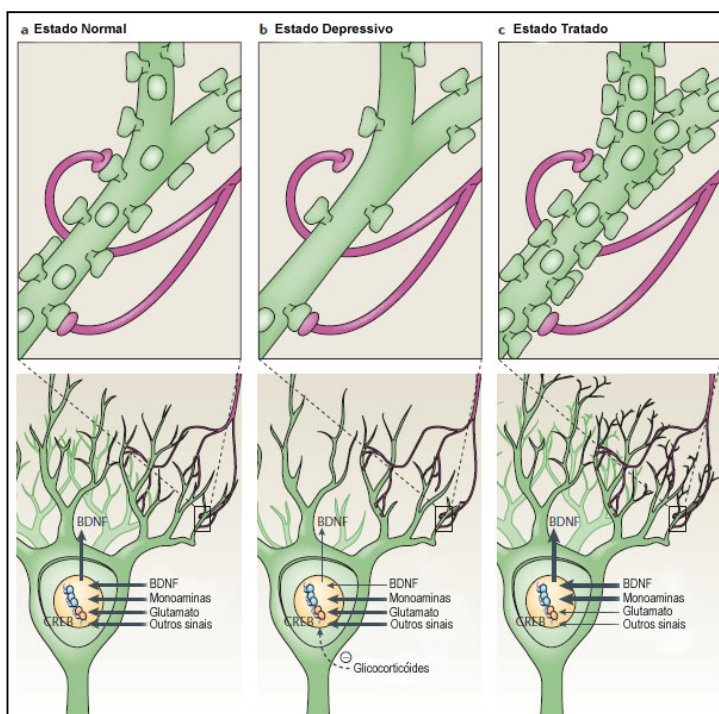
Ao longo dos anos alguns estudos trouxeram evidências que poderiam contradizer a hipótese monoaminérgica na neurobiologia da depressão. Enquanto antidepressivos são capazes de estimular a neurotransmissão monoaminérgica de maneira aguda, a melhora clínica somente é observada semanas após o início do tratamento (MANJI *et al.*, 2003). Alguns autores relatam que a simples depleção de monoaminas em indivíduos saudáveis não é suficiente para induzir os sintomas associados a depressão. (SALOMON *et al.*, 1997). Adicionalmente, anfetaminas ou drogas de abuso como a cocaína (drogas que são capazes de aumentar a disponibilidade sináptica de monoaminas) - não tem efeito antidepressivo (HINDMARCH, 2001). Estes fatos indicam que outros sistemas neurais e mecanismos bioquímicos estejam envolvidos na etiologia da depressão e na resposta ao tratamento farmacológico com antidepressivos.

#### 4.1.3 Hipótese neurotrófica

Devido às limitações da hipótese monoaminérgica, vários estudos têm buscado elucidar outros mecanismos que podem estar relacionados com a neurobiologia da depressão. Como já mencionado, vários estudos relacionam a depressão com mudanças estruturais no encéfalo, como por exemplo, uma redução no volume do hipocampo (SHELIN, 2003; ARNONE *et al.*, 2013). Essa diminuição do volume hipocampal pode estar relacionada em parte com aumento na morte de neurônios, retração de dendritos, ou pela diminuição da neurogênese (CZECH e LUCASSEN, 2007). Além disso, essas alterações hipocampais observadas em pacientes depressivos são revertidas pelo tratamento

crônico com antidepressivos monoaminérgicos (CZEH e LUCASSEN, 2007; SHELINE, 2011).

A hipótese neurotrófica da depressão postula que o tratamento crônico com antidepressivos induz alterações na neuroplasticidade celular envolvendo modificações transcricionais e traducionais que regulam a plasticidade molecular e celular, conforme ilustrado na figura 6 (PITTENGER *et al.*, 2008; CASTREN e RANTAMAKI, 2010). Dessa maneira, ocorre uma reorganização da sinalização intracelular que irá convergir para alterações estruturais no tecido cerebral envolvendo a reestruturação dendrítica, aumento da neurogênese hipocampal e aumento da sobrevivência celular (KEMPERMANN e KRONENBERG, 2003). Nesse sentido, já foi relatado que alterações hipocampais como a redução da arborização dendrítica, induzidas pelo estresse podem ser revertidas pelo tratamento farmacológico com antidepressivos (DUMAN, 2009).



**Figura 6. Hipótese neurotrófica da depressão.** (A) Representação esquemática de um neurônio piramidal hipocampal de um indivíduo sadio, sofrendo regulação por diferentes tipos neuronais e pelo fator neurotrófico derivado do cérebro

(BDNF). (B) Representação esquemática de um neurônio piramidal hipocampal de um indivíduo deprimido, com redução nos níveis de BDNF e ocorrência de atrofia dendrítica. Essa redução na expressão de BDNF pode ocorrer pelo aumento de glicocorticóides durante uma situação de estresse, o que pode interferir nos mecanismos transcripcionais mediados pelo elemento de resposta ao AMPc (CREB). (C) Representação esquemática de um neurônio piramidal hipocampal de um indivíduo deprimido após o tratamento crônico com antidepressivos que leva a uma redução na excitotoxicidade glutamatérgica, aumento na atividade monoaminérgica, expressão de BDNF e arborização dendrítica dos neurônios hipocampais. Adaptado de Nestler *et al.* (2002).

De acordo com a hipótese neurotrófica da depressão, a neurogênese hipocampal é um dos fatores chaves para resposta antidepressiva (SANTARELLI *et al.*, 2003). O prejuízo na neurogênese hipocampal, possivelmente relacionado com a depressão, pode ser atribuído a queda no suporte trófico, estimulado principalmente por neurotrofinas. Esses fatores neurotróficos e de crescimento possuem um papel crítico na regulação da diferenciação, funcionamento e a sobrevivência de novos neurônios no hipocampo (HUANG e REICHARDT, 2001; CASTREN e RANTAMAKI, 2010).

As neurotrofinas, especialmente o BDNF, têm sido apontadas como uma das principais moléculas envolvidas na resposta antidepressiva, além de apresentarem um papel fundamental na modulação de diversas funções sinápticas como o estímulo à maturação, nutrição, crescimento e integridade neuronal (PARK e POO, 2012). É bem estabelecida na literatura a existência de uma relação direta entre o BDNF e a neurobiologia da depressão. Já foi demonstrada uma diminuição na concentração sérica de BDNF em pacientes deprimidos (KAREGE *et al.*, 2002). Análises pós-morte de pacientes previamente diagnosticados com depressão indicam uma diminuição na expressão dessa proteína no hipocampo e CPF quando comparado com indivíduos sem transtornos de humor (KAREGE *et al.*, 2005). Também já foi demonstrado através de análises pós-morte um aumento de BDNF no hipocampo de pacientes deprimidos tratados com antidepressivos em relação a pacientes deprimidos que não receberam tratamento (CHEN *et al.*, 2001). Adicionalmente, o tratamento com antidepressivos (venlafexina, fluoxetina, imipramina) ou eletroconvulsoterapia em roedores pode aumentar a expressão de BDNF em diferentes regiões cerebrais como hipocampo, CPF e amígdala (CHEN *et al.*, 2001; BALU *et al.*, 2008; LARSEN *et al.*, 2008; LARSEN *et al.*, 2010).

É importante ressaltar que a transcrição gênica e tradução para BDNF gera uma proteína precursora denominada pré-pró-BDNF que no

retículo de Golgi, é clivada gerando uma proteína denominada pró-BDNF. O pró-BDNF pode ser clivado gerando o BDNF maduro (aproximadamente 14 kDa) ou secretado para o espaço extracelular e ser alvo de proteases extracelulares que irão clivá-lo formando o BDNF maduro (LESSMANN, GOTTMANN e MALCANGIO, 2003; ADACHI *et al.*, 2014). Quando o BDNF maduro é sintetizado e/ou liberado, ele pode se ligar ao seu receptor do tipo tirosina cinase, denominado TrkB (MALBERG, 2004). A sinalização desencadeada por este receptor envolve principalmente a ativação de Ras-Raf-ERK, PI3K/AKT, bem como PLC e PKC (REICHARDT, 2006; CHEN *et al.*, 2007; CUNHA, BRAMBILLA e THOMAS, 2010; NUMAKAWA *et al.*, 2010). A ativação dessas cinases pode convergir para a fosforilação e consequentemente ativação do fator de transcrição CREB que aumenta a transcrição de vários genes, incluindo o do próprio BDNF (HASHIMOTO, SHIMIZU e IYO, 2004; MALBERG, 2004; TARDITO *et al.*, 2006; SCHMIDT e DUMAN, 2007; RACAGNI e POPOLI, 2008; CUNHA, BRAMBILLA e THOMAS, 2010).

#### 4.1.4 Sinalização celular e depressão

O avanço dos estudos relativos à neurobiologia da depressão e aos mecanismos associados à resposta antidepressiva vem indicando o envolvimento de uma complexa modulação da sinalização intracelular nestes eventos. Tem sido sugerido que alterações nas cascatas de sinalização celular poderiam ser mediadores da vulnerabilidade a depressão (D'SA e DUMAN, 2002). Neste sentido, a sinalização celular envolvendo a transcrição de BDNF e o efeito da ligação dessa neurotrofina com seu receptor específico TrkB, tem se destacado como importantes mediadores neuroquímicos na neurobiologia da depressão (CASTREN e RANTAMAKI, 2010; AUTRY e MONTEGGIA, 2012). As proteínas cinases são reguladoras chaves da transdução sinal intracelular, incluindo modulação de receptores e alterações na expressão gênica. Já foi demonstrado alterações na ativação e expressão de enzimas de sinalização celular como ERK, AKT, PKA, CaMKII, e GSK-3 $\beta$  em modelos animais de depressão e em pacientes diagnosticados com essa patologia (D'SA e DUMAN, 2002; ALMEIDA *et al.*, 2006). Além disso, a utilização de inibidores dessas enzimas é capaz de abolir o efeito tipo-antidepressivo induzido pela administração de alguns compostos dotados de atividade antidepressiva em modelos animais como cloreto de zinco, memantina e creatina (ALMEIDA *et al.*, 2006; CUNHA *et al.*, 2014; MANOSSO *et al.*, 2015).

As MAPKs são um grupo de serina/treonina cinases ativadas por fosforilação envolvidas na transdução de sinal de uma série de estímulos extracelulares como fatores de crescimento, toxinas, citocinas e estresse ambiental (TIBBLES e WOODGETT, 1999). A transdução de sinal mediada por MAPK pode culminar em uma variedade de respostas celulares como proliferação, diferenciação celular ou inflamação e apoptose (CHEN e COBB, 2001; THOMAS e HUGANIR, 2004). Dentre as MAPKs, pode-se destacar a participação de ERK1/2 nos mecanismos neuroquímicos da depressão. A ativação de ERK1/2 ocorre através da via de sinalização Ras-Raf-MEK, podendo regular processos celulares como: reorganização do citoesqueleto celular, proliferação, expressão gênica e morte celular. No SNC, a ativação de ERK 1/2 está envolvida em processos de plasticidade sináptica como a indução de potenciação de longo prazo (LTP) e depressão de longo prazo (LTD), aprendizado e memória (CHANG e KARIN, 2001; THOMAS e HUGANIR, 2004). Análises pós-morte do hipocampo e CPF de pacientes diagnosticados com depressão indicaram uma diminuição no conteúdo de ERK 1/2 e aumento da MAPK fosfatase I (um regulador negativo dessa via) nestes pacientes (DWIVEDI *et al.*, 2001; DURIC *et al.*, 2010). Em modelos animais de depressão induzidos pela administração sub-crônica de corticosterona, as alterações comportamentais associadas ao fenótipo depressivo estão acompanhadas da redução da fosforilação de ERK 1/2 (GOURLEY *et al.*, 2008). A inibição da cascata de MEK/ERK pode induzir um comportamento do tipo-depressivo, além de prevenir a ação de alguns antidepressivos como desipramina, sertralina e cetamina (DUMAN *et al.*, 2007; REUS *et al.*, 2014).

A ativação de diferentes receptores acoplados à proteína G estimulatória (ex: receptores serotoninérgicos, noradrenérgicos, purinérgicos, entre outros) causa uma alteração conformacional na subunidade alfa, fazendo com que esta se dissocie do dímero beta/gama e ative a enzima adenilato ciclase. A ativação de adenilato ciclase leva a formação de AMPc e consequente ativação de PKA. A ativação de PKA pode estar envolvida no efeito de outros compostos com ação antidepressiva como memantina e zinco (ALMEIDA *et al.*, 2006; MANOSSO *et al.*, 2015).

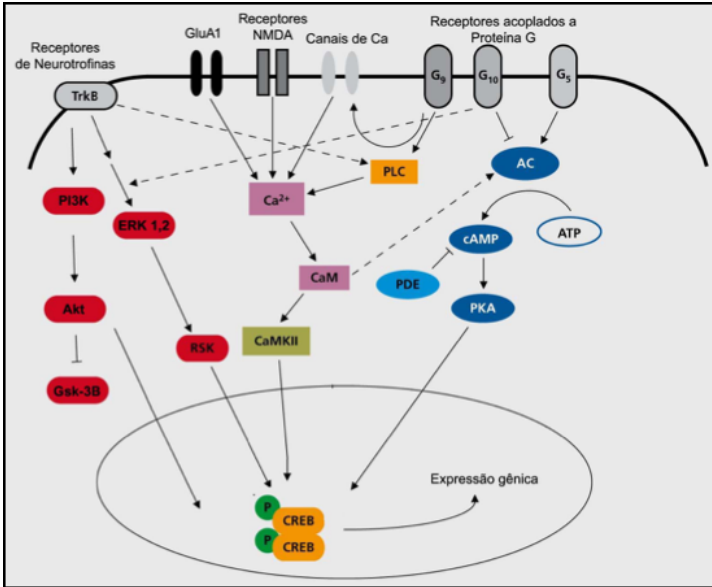
Além da ativação de PKA, pode-se destacar a ativação da cálcio-calmodulina cinase II (CaMKII) na neurobiologia da depressão. Tem sido demonstrado o importante papel da modulação de CaMKII na regulação de vários eventos envolvendo a neuroplasticidade e fisiopatologia desse transtorno de humor (DU *et al.*, 2004). O tratamento com antidepressivos estimula a fosforilação de CaMKII, além de inibidores dessa enzima



prevenirem os efeitos de drogas antidepressivas (D'SA e DUMAN, 2002; TIRABOSCHI *et al.*, 2004).

A ativação da via da fosfatidilinositol-3-cinase (PI3K)/AKT (ou PKB) está associada à regulação de vários processos celulares relacionados ao metabolismo, apoptose, proliferação e neuroplasticidade. As alterações em vias de sinalização que regulam neuroplasticidade e sobrevivência celular como PI3K/AKT, podem estar implicadas nos mecanismos de várias doenças neuropsiquiátricas como a depressão, além de fazer parte do mecanismo de ação de compostos com ação antidepressiva. (BEAULIEU, 2012; MARSDEN, 2013; MANOSSO *et al.*, 2015; NEIS *et al.*, 2016b). A ativação de AKT conduz à fosforilação de vários alvos intracelulares, como por exemplo, a fosforilação no resíduo ser-9 e consequente inativação da enzima glicogênio-cinase-3 $\beta$  (GSK-3 $\beta$ ). A GSK-3 $\beta$  é uma serina/treonina cinase multifuncional capaz de regular a síntese de glicogênio, transcrição de genes, plasticidade sináptica e morte celular apoptótica (JOPE, 2003; LI e JOPE, 2010; KAIDANOVICH-BEILIN *et al.*, 2012). Além disso, GSK-3 tem um papel importante no controle do comportamento, através da modulação de diferentes alvos celulares como o fator de transcrição  $\beta$ -catenina, receptores glutamatérgicos, e neurotransmissão serotoninérgica (BEAULIEU, GAINETDINOV e CARON, 2009). Antidepressivos como fluoxetina e imipramina aumentam a fosforilação e consequente inativação de GSK-3 $\beta$  (KAIDANOVICH-BEILIN *et al.*, 2012). Além disso, inibidores dessa enzima podem apresentar efeito tipo-antidepressivo sinérgico com outros compostos antidepressivos como ácido fólico, zinco, agmatina creatina e ácido ascórbico (BUDNI *et al.*, 2012; MORETTI *et al.*, 2013; CUNHA *et al.*, 2015a; MANOSSO *et al.*, 2015; NEIS *et al.*, 2016b).

Como demonstrado na figura 7 os sinais intracelulares envolvendo a ativação de PKA, CaMKII, ERK1/2, AKT e inibição de GSK-3 $\beta$  podem convergir para o aumento da fosforilação de CREB no resíduo ser-133, conduzindo à sua ativação e aumento na transcrição de diferentes proteínas relacionadas a neuroplasticidade, como o BDNF (HASHIMOTO, SHIMIZU e IYO, 2004). Uma diminuição da atividade de CREB pode ser observada em modelos animais de depressão bem como em pacientes diagnosticados com esse transtorno (YUAN *et al.*, 2009; DURIC *et al.*, 2012), além de o tratamento com antidepressivos aumentarem a expressão e ativação de CREB (SCHMIDT e DUMAN, 2007; MARSDEN, 2012)



**Figura 7. Convergência de cascatas de sinalização intracelular envolvidas na resposta de compostos antidepressivos.** Ativação de fatores neurotróficos como o BDNF, a modulação de receptores acoplados a proteína G ou receptores para glutamato pode levar à ativação de vias de sinalização intracelular mediadas por fosfolipase C, MAPK, PI3K/Akt e inibição de GSK-3 $\beta$  que convergem para a ativação de CREB por fosforilação do resíduo ser-133. A ativação de CREB aumenta a expressão de neurotrofinas, como o BDNF que podem aumentar a plasticidade neural, neurogênese e arborização dendrítica. Adaptado de Racagani *et al.* (2008).

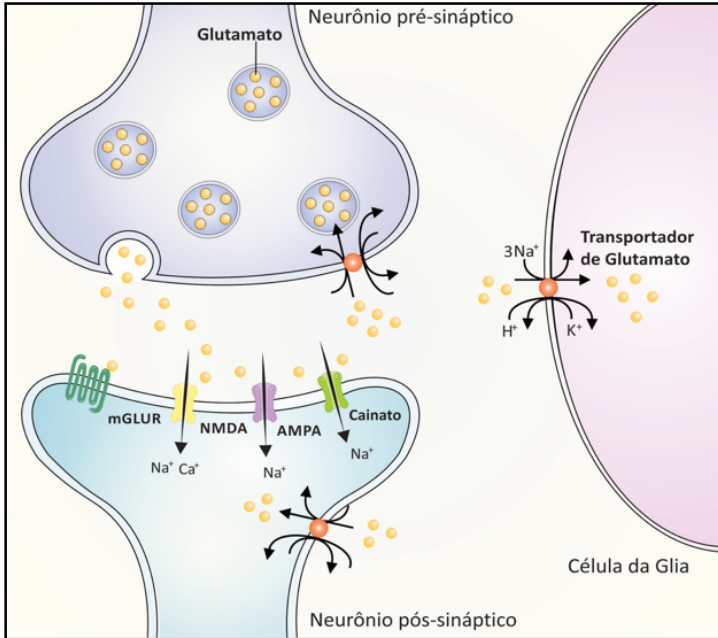
#### 4.1.5 Sistema glutamatérgico e depressão

O aminoácido glutamato é o principal neurotransmissor excitatório no SNC de adultos, desempenhando um papel fundamental em processos como aprendizado e memória, neuroplasticidade e cognição (COLLINGRIDGE e LESTER, 1989; IZQUIERDO, 1994; DINGLEDINE *et al.*, 1999). Neurônios glutamatérgicos podem ser encontrados em diferentes regiões do encéfalo como o córtex cerebral, hipocampo, núcleos caudado e talâmico e cerebelo (RAJKOWSKA, 2000; PAUL e SKOLNICK, 2003). Por outro lado, quando a transmissão glutamatérgica está exacerbada ocorre um fenômeno denominado excitotoxicidade, que pode levar a prejuízo da função neural ou a morte celular (OLNEY, 1990). A excitotoxicidade está associada a diferentes

patologias do SNC, como isquemia, epilepsia, transtornos de humor e processos neurodegenerativos como a doença de Huntington (OLNEY, 1990; LIPTON e ROSENBERG, 1994; GHASEMI *et al.*, 2014; REUS *et al.*, 2016).

Diferente da maioria nos neurotransmissores, o glutamato não é degradado no espaço extra-sináptico, mas sim transportado para os astrócitos através dos transportadores para aminoácidos excitatórios (EAATs) (LAPIDUS, SOLEIMANI e MURROUGH, 2013). Dessa maneira, a transmissão glutamatérgica não envolve apenas a participação dos neurônios pré e pós-sinápticos, mas envolve também os astrócitos. Tal fato levou a formação do conceito de sinapse tripartite, que considera o papel importante dos astrócitos na regulação dos níveis sinápticos e extra-sinápticos de glutamato (PARPURA *et al.*, 1994).

O aminoácido glutamato pode ser sintetizado a partir da glicose, utilizando o intermediário do ciclo do ácido cítrico  $\alpha$ -cetoglutarato como precursor (MUSAZZI *et al.*, 2013). Outra forma que contribui para a manutenção dos níveis de glutamato no SNC é o ciclo do glutamato-glutamina. Neste processo, o glutamato presente na fenda sináptica é captado pelos astrócitos e convertido em glutamina. A glutamina, que não é um neurotransmissor excitatório, é transferida para os neurônios onde é convertida novamente para glutamato. O glutamato presente no neurônio pré-sináptico é transferido através do transportador vesicular de glutamato para dentro das vesículas sinápticas cuja liberação é dependente de cálcio (MELONI *et al.*, 1993; LESCH e SCHMITT, 2002; SERAFINI *et al.*, 2013). A figura 8 exemplifica de maneira esquemática os principais eventos relacionados a neurotransmissão glutamatérgica.



**Figura 8. Representação esquemática da neurotransmissão glutamatérgica.** O glutamato pode ser liberado pelo neurônio pré-sináptico ativando os receptores glutamatérgicos metabotrópicos (mGLUR) ou ionotrópicos (NMDA, AMPA, cainato) no neurônio pós-sináptico. O glutamato na fenda sináptica pode ser captado pelos astrócitos ou pelos neurônios através de transportadores de glutamato (EAAT) presentes nessas células. Adaptado de ATTWELL e GIBB (2005).

Uma vez liberado na fenda sináptica o glutamato pode se ligar nos seus receptores específicos. Os receptores glutamatérgicos podem ser divididos em duas categorias: (i) receptores metabotrópicos (mGLURs); (ii) receptores ionotrópicos (iGLURs) (ATTWELL e GIBB, 2005; KEW e KEMP, 2005).

Os mGLURs são receptores acoplados a proteínas G e relacionados à resposta sináptica lenta e podem ser divididos três subgrupos: a) Grupo I (composto pelos receptores mGLUR1 e mGLUR5); b) Grupo II (composto pelos receptores mGLUR2 e mGLUR3); Grupo III (composto pelos receptores mGLUR4, mGLUR6 mGLUR7 e mGLUR8). Os receptores do grupo I levam a ativação de PLC, enquanto os receptores dos grupos II e III são acoplados com

proteínas G inibitórias levando a inibição da adenilato ciclase (KEW e KEMP, 2005; REUS *et al.*, 2016).

Por outro lado, os iGLURs são canais iônicos que quando ativados permitem o influxo de  $\text{Ca}^{2+}$  e  $\text{Na}^+$ . Os iGLURs podem ser divididos em três principais categorias: NMDA, AMPA e cainato. Os receptores AMPA (AMPA) e cainato são envolvidos na resposta celular sináptica rápida sendo que a ativação destes por glutamato gera uma mudança conformacional no receptor que permite o influxo de  $\text{Na}^+$  (DINGLELINE *et al.*, 1999; KARAKAS, REGAN e FURUKAWA, 2015).

Os receptores NMDA (NMDAR) se encontram em um estado de “repouso” quando bloqueados por  $\text{Mg}^{2+}$  presente no poro do canal. Uma vez que ocorre ativação dos receptores AMPA ou cainato, um influxo de  $\text{Na}^+$  causa a despolarização da membrana levando a liberação do  $\text{Mg}^{2+}$  dos NMDAR. Nesta situação a ativação de NMDAR é possível desde que ocorra a ligação do agonista glutamato e de um co-agonista (glicina ou D-serina). A ativação desse receptor permite um influxo de  $\text{Ca}^{2+}$  para o espaço intracelular. O aumento de  $\text{Ca}^{2+}$  ativa uma cascata de sinalização intracelular que pode estar associada a fenômenos como a potenciação sináptica de longo termo, podendo participar de processos como memória e aprendizado (LAUBE *et al.*, 1997; HENNEBERGER *et al.*, 2010; REUS *et al.*, 2016). Contudo, a ativação excessiva desse receptor leva ao aumento excessivo de  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular, iniciando uma série de eventos moleculares que podem culminar com a morte celular (excitotoxicidade) (OLNEY, 1990; PAPPAS *et al.*, 1994). Este excessivo influxo de  $\text{Ca}^{2+}$  se deve parte pela ativação de receptores glutamatérgicos extrasinápticos, que podem ser ativados pelo aumento da neurotransmissão glutamatérgica, ou por cascatas de sinalização envolvidas na morte celular (PARSONS e RAYMOND, 2014).

NMDAR são estruturas heteroméricas constituídas por três subtipos de subunidades: NR1, NR2 e NR3. A subunidade NR1 forma o canal iônico desse receptor, enquanto as outras subunidades estão relacionadas a propriedades regulatórias (LAU e ZUKIN, 2007). A composição das subunidades dos receptores pode alterar suas propriedades farmacológicas e regulatórias (HARDINGHAM, 2009). A subunidade NR1 pode ser regulada por fosforilação através de PKA e PKC. Já as subunidades NR2 podem ser reguladas por uma série de cinases como: PKA, PKC, CaMKII, CK-2 e CK-5 (proteínas cinases depende de ciclina) (WANG *et al.*, 2014) Alterações nesses mecanismos de fosforilação podem estar associados a diferentes doenças psiquiátricas, incluindo a depressão (REUS *et al.*, 2016).

Nos últimos 20 anos, vários estudos têm demonstrado o envolvimento do sistema glutamatérgico na depressão (SKOLNICK, 1999; REUS *et al.*, 2016). Já foi demonstrado um aumento nos níveis de glutamato no CPF de indivíduos depressivos e alterações funcionais do NMDAR foram encontradas em pacientes que cometeram suicídio (NOWAK, ORDWAY e PAUL, 1995; HASHIMOTO, SAWA e IYO, 2007). Dados obtidos através de estudos clínicos e pré-clínicos têm reforçado a hipótese da participação do sistema glutamatérgico na neurobiologia da depressão. Compostos com a capacidade de reduzir a neurotransmissão glutamatérgica têm efeito antidepressivo, e alguns antidepressivos convencionais podem ter um efeito inibitório sobre NMDAR (CHATURVEDI, BAPNA e CHANDRA, 2001; ALMEIDA *et al.*, 2006; CUNHA, M. P. *et al.*, 2008; ZOMKOWSKI *et al.*, 2010; ZOMKOWSKI *et al.*, 2012). Dessa maneira, alguns autores já postularam que fármacos capazes de inibir o NMDAR podem constituir uma nova classe de medicamentos antidepressivos (SKOLNICK, 1999).

#### 4.1.5.1 Antagonistas NMDAR e ação antidepressiva

Como já mencionado, compostos capazes de inibir o NMDAR podem exercer um efeito antidepressivo. Já foi demonstrado o papel antidepressivo de antagonistas NMDAR como: MK-801, memantina e amantadina (DIETRICH *et al.*, 2000; FERGUSON e SHINGLETON, 2007; PRUUS *et al.*, 2010; NEIS *et al.*, 2015; REUS *et al.*, 2016). Contudo, o potencial antidepressivo de cetamina foi capaz de revolucionar o tratamento farmacológico da depressão (DUMAN, 2014).

A cetamina é um antagonista dos NMDAR comumente utilizado na prática clínica como anestésico (JANSEN, 2000). Diferente dos antidepressivos convencionais, a administração de baixas doses de cetamina pode induzir um efeito antidepressivo em apenas algumas horas após sua administração. Já foi relatado que uma administração endovenosa de cetamina induziu um efeito antidepressivo cerca de 110 minutos após a administração, e esse efeito perdurou por até 7 dias (ZARATE *et al.*, 2006; LIEBRENZ, STOHLER e BORGEAT, 2009). Dessa maneira, o estudo dos eventos neuroquímicos associados ao efeito antidepressivo de cetamina pode contribuir para a compreensão dos mecanismos associados ao efeito antidepressivo rápido, proporcionando o desenvolvimento de medicamentos mais rápidos e eficazes, principalmente em pacientes refratários aos antidepressivos convencionais.

Estudos mais recentes têm apontado que o efeito rápido da cetamina ocorre através do antagonismo de NMDAR em interneurônios GABAérgicos, que estão tonicamente ativos. Em situações fisiológicas, estes interneurônios emitem projeções para os neurônios glutamatérgicos, regulando negativamente a transmissão glutamatérgica por meio da liberação de GABA. A cetamina inibe a atividade desses interneurônios GABAérgicos, que por sua vez não vão mais inibir os neurônios glutamatérgicos, aumentando consequentemente a exocitose de vesículas contendo neurotransmissores (como o glutamato) na fenda sináptica. Dessa forma, o efeito inicial da cetamina é um aumento da atividade glutamatérgica, com aumento dos níveis de glutamato na fenda sináptica (MACHADO-VIEIRA *et al.*, 2009; LI *et al.*, 2010; LI *et al.*, 2011; DUMAN e LI, 2012; DUMAN e VOLETI, 2012; DUMAN, 2014). A cetamina ainda exerce efeitos nos neurônios pós-sinápticos, também por meio do antagonismo dos receptores NMDA. Esse antagonismo impede a ação do glutamato previamente liberado na fenda sináptica, levando à ativação preferencial dos AMPAR, causando um influxo de íons  $\text{Na}^+$  e uma despolarização transitória na membrana associada à ativação dos canais de  $\text{Ca}^{2+}$  voltagem dependente (CCVD). O influxo de  $\text{Ca}^{2+}$  resultante desse processo pode favorecer a exocitose de vesículas contendo fatores neurotróficos como BDNF (MACHADO-VIEIRA *et al.*, 2009). O aumento da liberação de BDNF em função dos efeitos desencadeados pela cetamina leva à ativação das vias de sinalização PI3K/AKT e ERK1/2, que tem sido indicada como essencial para o efeito antidepressivo rápido desse composto (KELLY e LYNCH, 2000; DWIVEDI *et al.*, 2008; YANG *et al.*, 2008). Como já mencionado anteriormente, a via da PI3K/AKT é responsável por regular negativamente a atividade da enzima GSK-3 $\beta$  via fosforilação da serina-9, posicionada na região N-terminal (BEAULIEU, GAINETDINOV e CARON, 2009)

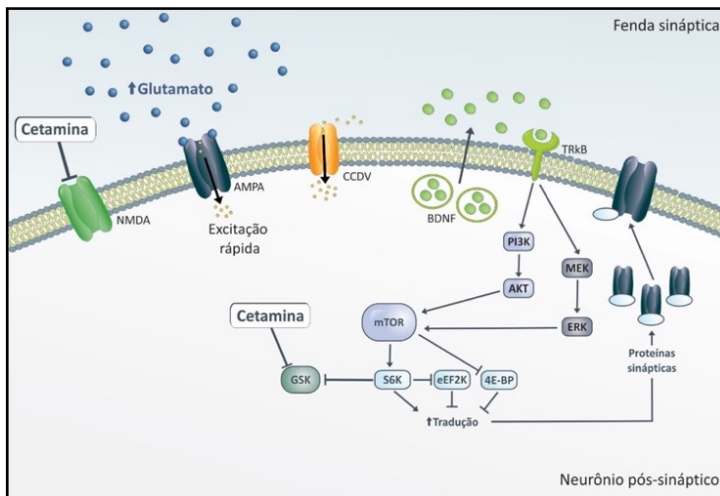
A ativação das enzimas AKT e ERK pode levar à ativação do complexo 1 das proteínas alvo de rapamicina (mTORC1). Este complexo é formado por um conjunto de proteínas que quando associadas podem regular a síntese proteica (LI *et al.*, 2010; DUMAN e LI, 2012; DUMAN e VOLETI, 2012; DUMAN, 2014). A mTOR é a principal proteína do complexo com atividade serina-treonina cinase, além de outras proteínas como PRAS40, SEC13, DEPTOR e RAPTOR estarem envolvidas na formação desse complexo (LOEWITH *et al.*, 2002).

O efeito antidepressivo rápido produzido por antagonistas de NMDAR (cetamina e Ro 25–6981) é mediado por uma rápida ativação da via de mTORC1 (LI *et al.*, 2010; DUMAN e VOLETI, 2012). Uma única

dose desses antagonistas rapidamente reverte déficits comportamentais, morfológicos e fisiológicos induzidos por um protocolo de estresse crônico através da regulação da via da mTOR (LI *et al.*, 2011). O efeito antidepressivo rápido de cetamina pode sugerir que não somente alterações na neurogênese e na estrutura cerebral estão envolvidas na fisiopatologia da depressão e na resposta antidepressiva. Dessa forma, modificações mais imediatas, que ocorrem em um menor período de tempo, na plasticidade sináptica e sinaptogênese podem ser importantes nesse processo.

A mTOR é uma serina-treonina cinase que regula a iniciação da tradução proteica, sendo que nos processos dendríticos é responsável pela regulação da síntese de novas proteínas necessárias para a sinaptogênese. Ela pode sofrer ativação ou inibição por meio de fosforilação por outras cinases. Como mencionado anteriormente, um ativador do complexo é AKT, e essa ativação desencadeia a fosforilação da cinase S6 (S6K) (um membro da família de cinases ribossomais S6 de 70 kDa) que fosforila e consequentemente inibe a cinase de fator de alongamento eucariótico 2 (eEF2K) levando ao aumento de tradução de proteínas. Adicionalmente, mTOR ativada também pode fosforilar a proteína ligante de 4E (4E-BP) inativando-a e permitindo a liberação da proteína 4E para atuar no aumento da tradução de proteínas sinápticas e promovendo sinaptogênese. A ativação de mTORC1 leva a transcrição e tradução de proteínas como as subunidades de receptores glutamatérgicos AMPA (subunidade GluA1) e proteínas de ancoragem, como as proteínas de densidade pós-sináptica de 95 kDa (PSD95) e a proteína pré-sináptica sinapsina I (DUMAN e VOLETI, 2012). A figura 9 ilustra os principais mecanismos neuroquímicos que podem estar associados ao efeito antidepressivo da cetamina através da modulação de mTORC1. Uma vez que vários efeitos colaterais (efeitos psicomiméticos, neurotóxicos e potencial de uso como droga de abuso) estão associados à administração de cetamina (BEHRENS *et al.*, 2007), a busca de novos compostos que atuem em um mecanismo molecular semelhante ao da cetamina pode constituir um importante avanço nos estudos relacionados à neurobiologia e tratamento da depressão.





**Figura 9 Mecanismos neuroquímicos associados ao efeito tipo antidepressivo da cetamina.** Em baixas doses, a cetamina pode exercer uma atividade inibitória sobre os receptores NMDA em interneurônios GABAérgicos e estimular a transmissão glutamatérgica por meio de receptores AMPA pós-sinápticos, que pode induzir a liberação de BDNF que estava armazenado em vesículas no neurônio pós-sináptico. Uma sinalização intracelular dependente da ativação de PI3K/AKT e MEK/ERK pode fosforilar e ativar o complexo mTORC1 que modula outros alvos intracelulares como as cinases p70S6K e 4E-BP, que por sua vez regulam a síntese de proteínas sinápticas como GluA1, sinapsina e PSD95 (Adaptado de DUMAN et al., 2012).

#### 4.1.6 Depressão e sistema purinérgico

Várias evidências têm reforçado a existência de um papel relevante do sistema purinérgico, especificamente da adenosina e dos seus receptores na neurobiologia da depressão. A eletroconvulsoterapia, um tratamento não farmacológico efetivo em reduzir os sintomas depressivos, aumenta a liberação de adenosina e a ativação de receptores  $A_1$  (VAN CALKER e BIBER, 2005). Além disso, antidepressivos tricíclicos aumentam a liberação de adenosina em neurônios corticais (PHILLIS e WU, 1982; PHILLIS, 1984). Também foi demonstrado que as NTPDases e a 5'- nucleotidase têm sua atividade modulada por diferentes fármacos antidepressivos (PEDRAZZA *et al.*, 2008). Ainda, o bloqueio de receptores  $A_{2A}$  pode prevenir alterações comportamentais e bioquímicas em modelos pré-clínicos de depressão induzida pelo estresse crônico imprevisível ou em animais geneticamente selecionados para

apresentarem um comportamento tipo-depressivo (KASTER *et al.*, 2015; MACHADO *et al.*, 2016).

Já foi demonstrado que a administração intraperitoneal de adenosina é capaz de induzir um efeito tipo-antidepressivo em camundongos, sendo esse efeito dependente da ativação de dos receptores de adenosina  $A_1$  e  $A_{2A}$ . Além da participação desses receptores, o efeito tipo-antidepressivo de adenosina no teste do nado forçado (TNF) envolveu modulação de receptores glutamatérgicos NMDA, serotoninérgicos 5-HT<sub>1A</sub>, do sistema opióide, de canais de potássio e inibição de via L-argina-NO/GMPCc (KASTER *et al.*, 2004; KASTER *et al.*, 2005; KASTER, SANTOS e RODRIGUES, 2005; KASTER *et al.*, 2007; KASTER *et al.*, 2012). O papel da adenosina na depressão está relacionado com a capacidade dos receptores de adenosina em controlar vários sistemas de neurotransmissores com papel chave na fisiopatologia da depressão como a liberação de 5-HT (OKADA *et al.*, 2001), a liberação de corticotrofina e cortisol/corticosterona e o eixo hipófise-pituitária-adrenal (SCACCIAOCE *et al.*, 1988; NICHOLSON, JACKMAN e WILKE, 1989) além de modular a excitabilidade neuronal no hipocampo (FREDHOLM, CUNHA e SVENNINGSSON, 2003; FREDHOLM *et al.*, 2005).

Alguns estudos têm demonstrado o potencial antidepressivo de inosina. Foi relatado por Elgün e colaboradores (1999) que a atividade da enzima ADA - responsável pela conversão de adenosina para inosina - está reduzida no soro de pacientes com depressão, e que quanto menor a atividade desta enzima, maior a severidade dos sintomas depressivos (ELGUN, KESKINEGE e KUMBASAR, 1999). Além disso, uma diminuição dos níveis séricos dessa purina foi encontrada em pacientes depressivos. (ALI-SISTO *et al.*, 2016). Nosso grupo demonstrou que a administração intraperitoneal de inosina foi capaz de induzir efeito tipo-antidepressivo tanto no TNF quanto no teste da suspensão pela cauda (TSC), sendo que este efeito perdurou até 2 horas após a administração dessa purina. O efeito tipo-antidepressivo da inosina foi prevenido pelo tratamento dos animais com DPCPX e ZM241385, antagonistas dos receptores  $A_1$  e  $A_{2A}$  de adenosina. Esses dados corroboram dados prévios da literatura que indicam que muitos dos efeitos biológicos de inosina envolvem a ativação de receptores de adenosina. Adicionalmente, o estudo de Muto et al (2014) mostrou que a administração por via oral de inosina em camundongos foi capaz de aumentar a proliferação celular no hipocampo, aumentar a fosforilação de ERK1/2 e expressão do RNAm para BDNF, sendo esse último efeito parcialmente prevenido pelo pré-tratamento com o antagonista dos receptores  $A_1$  DPCPX. Neste mesmo

trabalho, o tratamento crônico com inosina preveniu o comportamento tipo-depressivo e a diminuição da proliferação celular no hipocampo induzidos pelo estresse crônico imprevisível em camundongos (MUTO *et al.*, 2014). Contudo, não existem dados na literatura a respeito do envolvimento de vias sinalização relacionados a neuroplasticidade e ativação de receptores de adenosina no efeito tipo-antidepressivo de inosina.

Adicionalmente, existe uma relação entre ativação de receptores de adenosina e neurotransmissão glutamatérgica, uma vez que a ativação destes receptores pode diminuir a liberação de glutamato ou causar inibição de NMDAR (DE MENDONCA e RIBEIRO, 2000; DE MENDONCA, SEBASTIAO e RIBEIRO, 2000; GEREVICH, WIRKNER e ILLES, 2002; RIBEIRO, SEBASTIAO e DE MENDONCA, 2002; GESSI *et al.*, 2011). Como já mencionado o efeito tipo-antidepressivo de adenosina também envolve a inibição de NMDAR (KASTER *et al.*, 2012), reforçando ainda mais a hipótese da modulação NMDAR pelos receptores de adenosina.

Existem poucos trabalhos na literatura que indicam uma relação entre inosina e modulação do sistema glutamatérgico. Contudo, já foi demonstrado que inosina pode exercer ação neuroprotetora em situações associadas à hiperativação do sistema glutametérgico e dos receptores NMDA, como a isquemia cerebral (SHEN *et al.*, 2005). Adicionalmente já foi demonstrado que a inosina pode exercer atividade anticonvulsivante (GANZELLA *et al.*, 2011) e pode diminuir respostas eletrofisiológicas pós-sinápticas induzidas por glutamato (SHEN *et al.*, 2005). Esses resultados podem levantar a possibilidade de uma possível modulação do sistema glutamatérgico por inosina. Contudo, a relação entre esses efeitos e o comportamento tipo-antidepressivo de inosina ainda é desconhecida.

#### 4.2 Objetivos específicos:

Os objetivos específicos relacionados aos resultados desse capítulo estão listados a seguir:

-Avaliar o papel da ativação de MEK/ERK, CAMKII, PKA, PI3K/AKT e inibição de GSK-3 $\beta$  nos efeito tipo-antidepressivo de inosina em camundongos;

-Verificar se o tratamento com inosina pode alterar o imunoconteúdo e fosforilação de CREB no hipocampo e CPF de camundongos;

-Avaliar a participação dos receptores glutamatérgicos do tipo NMDA e AMPA no efeito tipo-antidepressivo de inosina em camundongos;

-Verificar expressão de proteínas sinápticas no hipocampo e CPF de camundongos tratados com inosina e avaliar o papel da ativação de mTOR no efeito tipo-antidepressivo deste nucleosídeo.

### 4.3 Metodologia

#### 4.3.1 Animais

Foram utilizados camundongos Swiss machos, pesando entre 35 e 45 g e mantidos a 21°C ±1 com livre acesso à água e comida, em ciclo claro/escuro 12:12 h (7:00-19:00 h). Os animais foram fornecidos pelo Biotério Central da Universidade Federal de Santa Catarina e mantidos no biotério setorial nas mesmas condições. Todos os procedimentos realizados foram aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais da UFSC (número de processo: PP00772) e todos os esforços foram feitos para minimizar o sofrimento dos animais.

#### 4.3.2 Tratamento farmacológico

As seguintes drogas foram usadas: inosina, H-89, KN-62, U0126, wortmanina, AR-A014418, N-metil-D-aspartato (NMDA), MK-801, D-serina, rapamicina, cetamina e DNQX. Todas as drogas foram compradas da empresa Sigma-Aldrich Chemical Co., St. Louis, USA e preparadas no dia do respectivo experimento. Inosina e cetamina foram dissolvidas em solução salina e administradas pela via i.p. em um volume constante de 10 ml/kg. MK-801 foi administrado por via oral através de gavagem em um volume constante de 10 mL/kg.

H-89, KN-62, U0126, wortmanina, AR-A014418, rapamicina e DNQX foram dissolvidos em solução salina contendo DMSO 1%, NMDA e D-serina foram dissolvidos apenas em solução salina. Essas drogas foram administradas pela via intracerebroventricular (i.c.v.). A administração i.c.v. foi realizada utilizando uma agulha de 0,4 mm de diâmetro conectada por uma cânula de propileno a uma seringa Hamilton de 25 µl. A agulha foi inserida perpendicularmente no crânio, diretamente no ventrículo lateral, utilizando-se o bregma como referência (1 mm lateral e 1 mm posterior ao bregma, com uma perfuração de 2,4 mm de profundidade). A fim de se verificar o local exato da injeção, os animais foram dissecados e analisados macroscopicamente após os testes. Os animais que apresentassem qualquer sinal que indicasse hemorragia e/ou formação de coágulo, ou que não indicasse de forma clara que a injeção i.c.v. foi bem-sucedida, foram excluídos das análises (KASTER *et al.*, 2011; GONCALVES *et al.*, 2013).

#### 4.3.3 Teste de suspensão pela cauda (TSC)

O tempo total de duração da imobilidade foi medido de acordo com o método descrito por Steru et al. (1985). Os camundongos foram suspensos 50 cm acima do chão por fita adesiva e a imobilidade registrada durante 6 min. A atividade preditiva do tipo-antidepressiva foi determinada pela diminuição do tempo de imobilidade dos animais neste teste, uma vez que os antidepressivos clássicos reduzem o tempo de imobilidade no TSC (STERU *et al.*, 1985; MANTOVANI *et al.*, 2003; MORETTI *et al.*, 2015; NEIS *et al.*, 2015).

#### 4.3.4 Teste do Campo Aberto (TCA)

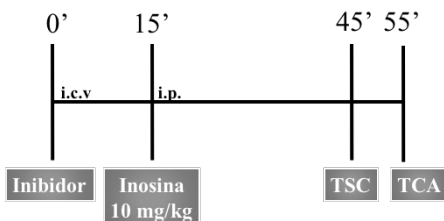
A fim de excluir a possibilidade de que a diminuição do tempo de imobilidade no TSC seja devido a uma estimulação motora, os animais foram submetidos ao TCA, durante 6 min, 10 minutos após o TSC (RODRIGUES *et al.*, 1996; MORETTI *et al.*, 2013). O teste consiste em uma caixa de madeira medindo 40x60x50 cm, com a base dividida em 12 quadrados iguais. O número de quadrados cruzados com as quatro patas foi utilizado como parâmetro para avaliar a atividade locomotora. A base da caixa de madeira foi limpa com álcool 10% entre os testes.

#### 4.3.5 Protocolo experimental

Para confirmar o efeito tipo-antidepressivo de inosina (KASTER *et al.*, 2013), os animais foram tratados com inosina (0,1-10 mg/kg, i.p.) ou salina, e submetidos ao TSC, 30 minutos após a administração dessa purina.

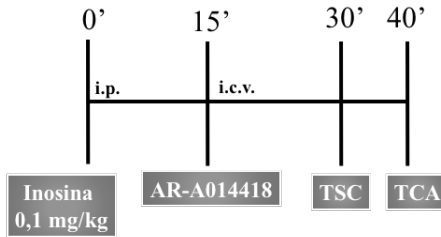
Para verificar se a ativação de ERK, CAMKII, PKA, AKT e mTOR estariam envolvidas no efeito anti-imobilidade de inosina, foram realizados experimentos com inibidores específicos de cada uma das vias de sinalização estudadas. De maneira resumida, cada experimento era composto dos seguintes grupos: Controle (animais recebendo injeção i.c.v. e injeção i.p. contendo apenas os veículos das drogas utilizadas), inibidor (animais recebendo injeção i.c.v. contendo o inibidor estudado e injeção i.p. contendo salina), inosina (animais recebendo injeção i.c.v. contendo apenas veículo e injeção i.p. de inosina), inosina + inibidor (animais recebendo injeção i.c.v. contendo o inibidor estudado e injeção i.p. contendo inosina). Nestes experimentos os inibidores foram administrados pela via i.c.v. 15 minutos antes da administração de inosina. O TSC foi realizado 30 minutos após a administração dessa purina (10 mg/kg). O protocolo utilizado nestes experimentos está

ilustrado na figura 10. Os seguintes inibidores foram utilizados nos experimentos mencionados anteriormente: U0126 (5 µg/sítio, inibidor de MEK1/2), KN-62 (1 µg/sítio, inibidor de CaMKII), H-89 (1 µg/sítio, inibidor de PKA), wortmanina (0,1 µg/sítio, inibidor de PI3K), rapamicina (0,2 nmol/sítio, inibidor mTORC1).



**Figura 10. Protocolo experimental utilizado para avaliar o efeito de diferentes inibidores de cinases no efeito tipo-antidepressivo de inosina.** Abreviações: intracerebroventricular (i.c.v.), intraperitoneal (i.p.), teste da suspensão pela cauda (TSC), Teste do campo aberto (TCA).

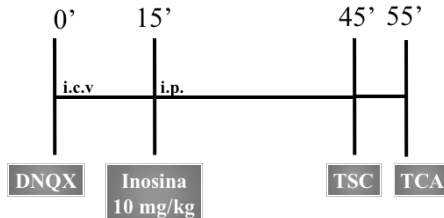
Para verificar se o envolvimento da inibição de GSK-3 $\beta$  nos efeitos comportamentais de inosina, foi verificado se o tratamento com uma dose sub-efetiva de AR-A014418 (0,001 µg/sítio, inibidor de GSK-3 $\beta$ ) juntamente com uma dose sub-efetiva de inosina (0,1 mg/kg) poderia induzir um efeito tipo antidepressivo sinérgico. Os animais foram divididos em quatro grupos: controle (animais recebendo injeção i.c.v contendo veículo e injeção i.p salina), inosina (animais recebendo injeção i.c.v contendo apenas veículo e injeção i.p de inosina), inosina + inibidor (animais recebendo injeção i.c.v contendo AR-A014418 e injeção i.p contendo inosina). 15 minutos após a administração i.p. de inosina os animais receberam a administração i.c.v de AR-A014418 e 15 minutos após o TSC foi realizado. O protocolo experimental está representado na figura 11.



**Figura 11. Protocolo experimental utilizado para avaliar o efeito do inibidor de GSK-3 $\beta$  no efeito tipo-antidepressivo de inosina.**

Abreviações: intracerebroventricular (i.c.v.), intraperitoneal (i.p.), teste da suspensão pela cauda (TSC), Teste do campo aberto (TCA).

A participação dos AMPAR nos efeitos comportamentais induzidos por inosina também foi estudada através da utilização do antagonista deste receptor, DNQX (figura 12). 15 minutos antes da administração de inosina, os animais receberam a administração i.c.v. de DNQX (2,5  $\mu$ g/sítio) e 30 minutos após a administração dessa purina o TSC foi realizado. Assim como nos experimentos mencionados anteriormente, grupos contendo os animais controle também foram utilizados nesses experimentos.

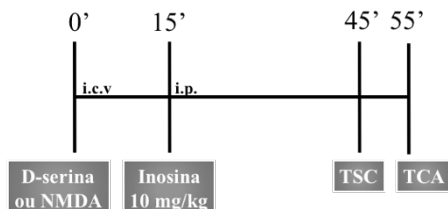


**Figura 12. Protocolo experimental utilizado para avaliar o efeito do tratamento com antagonista de receptores AMPA no efeito tipo-antidepressivo de inosina.** Abreviações: intracerebroventricular (i.c.v.), intraperitoneal (i.p.), teste da suspensão pela cauda (TSC), Teste do campo aberto (TCA).

Para avaliar o possível envolvimento da inibição de NMDAR no efeito anti-imobilidade de inosina, foram utilizadas duas abordagens experimentais: (i) efeito do pré-tratamento com NMDA (agonista NMDAR) ou D-serina (co-agonista NMDAR) no efeito anti-imobilidade de inosina; (ii) efeito da associação entre doses sub-efetivas de inosina e

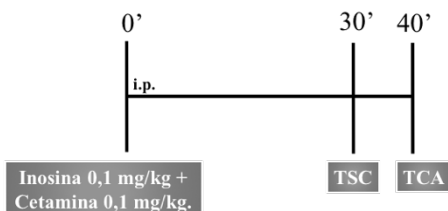


antagonistas dos receptores NMDA (MK-801 e cetamina) no TSC. No primeiro grupo de experimentos, 15 minutos antes da administração de inosina, os animais receberam a administração i.c.v. de NMDA (0.1 pmol/sítio) ou D-serina (30µg/sítio), e 30 minutos após a administração dessa purina o TSC foi realizado. O protocolo utilizado para os experimentos envolvendo, NMDA ou D-serina está ilustrado na figura 13.



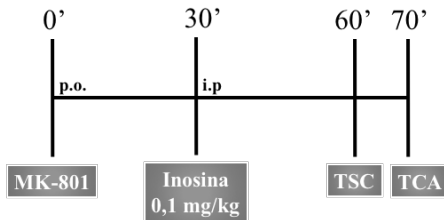
**Figura 13** Protocolo experimental utilizado para avaliar o efeito do tratamento com agonistas de NMDAR no efeito tipo-antidepressivo de inosina. Abreviações: Intracerebroventricular (i.c.v.), intraperitoneal (i.p.), Teste da suspensão pela Cauda (TSC), Teste do Campo Aberto (TCA).

No segundo grupo de experimentos, um possível efeito sinérgico entre a inosina e antagonistas de NMDAR foi investigado. Os animais foram tratados com doses sub-efetivas de inosina (0,1 mg/kg, i.p.) e cetamina (0,1 mg/kg, i.p.), e submetidos ao TSC após 30 minutos. Este protocolo experimental pode ser visualizado na figura 14.



**Figura 14.** Protocolo experimental utilizado para avaliar o efeito do tratamento com cetamina (antagonista NMDAR) no efeito tipo-antidepressivo de inosina. Abreviações: intraperitoneal (i.p.), teste da suspensão pela cauda (TSC), Teste do Campo Aberto (TCA).

Alternativamente, o efeito do co-tratamento com MK-801 e inosina também foi estudado de acordo com o protocolo experimental demonstrado na figura 15. 30 minutos antes da administração de inosina (0,1 mg/kg, i.p.), foi administrado MK-801 (0,001 mg/kg, p.o.), e 30 minutos após a administração de inosina o TSC foi realizado.



**Figura 15** Protocolo experimental utilizado para avaliar o efeito do tratamento com MK-801 (antagonista NMDAR) no efeito tipo-antidepressivo de inosina. Abreviações: administração por via oral (p.o.), intraperitoneal (i.p.), teste da suspensão pela cauda (TSC).

Todas as doses e protocolos escolhidos para a realização dos experimentos deste capítulo foram baseadas em estudos prévios na literatura (ZOMKOWSKI *et al.*, 2010; BETTIO *et al.*, 2012; KASTER *et al.*, 2012; LUDKA *et al.*, 2012; ZENI *et al.*, 2012; ZOMKOWSKI *et al.*, 2012; CUNHA *et al.*, 2015b; MANOSSO *et al.*, 2015; PESARICO *et al.*, 2016).

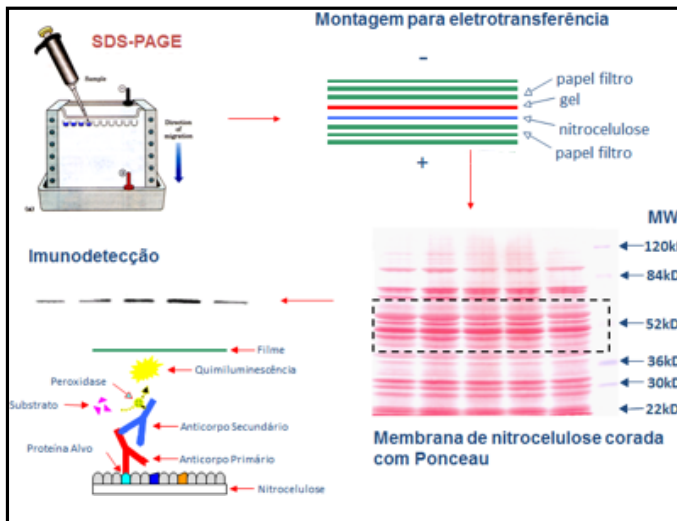
Para a realização das análises neuroquímicas, um grupo independente de animais foi tratado com inosina (10 mg/kg, i.p.) ou salina. 30 minutos ou 24 horas após administração deste nucleosídeo os animais foram mortos por decapitação e os hipocampus e CPF foram rapidamente dissecados (4°C), colocados em nitrogênio líquido e armazenados a -80°C até o momento de preparação dos homogenatos.

#### 4.3.6 Western Blotting

Os tecidos foram homogeneizados mecanicamente em 300 µL do tampão de homogeneização (Tris 50 mM pH 7,0, EDTA 35 1 mM, NaF 100 mM, PMSF 0,1 mM, Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub> 2 mM, Triton X-100 1%, glicerol 10% e inibidor de proteases AMRESCO código M222). Os lisados celulares foram centrifugados (10.000 x g por 10 min, a 4°C) para eliminar restos celulares. Os sobrenadantes foram diluídos na proporção de 1/1 (v/v) em solução de Tris 100 mM (pH 6,8), EDTA 4mM e SDS 8%, e aquecidos a 100°C por 5 min. A dosagem de proteínas foi determinada pelo método de Lowry modificado. Finalmente, foram adicionados nas amostras —tampão de diluição (40% glicerol, 100 mM Tris, azul de bromofenol, pH 6,8) na proporção 1:4 (v/v) e β-mercaptoetanol (concentração final 8%) (LOPES *et al.*, 2012; CORDOVA *et al.*, 2013).

Os processos de eletroforese, eletrotransferência e imunodeteção estão listados na figura 17. As proteínas foram isoladas através de eletroforese em gel de poliacrilamida contendo dodecil sulfato de sódio (SDS-PAGE) utilizando gel de separação com concentração de 10% e gel de entrada na concentração de 4%. A eletroforese foi realizada com corrente fixa de 15 mA/placa e voltagem máxima de 150 V durante aproximadamente 2 h. Após a eletroforese, os géis foram submetidos ao processo de eletrotransferência usando um sistema semi-dry (1,2 mA/cm<sup>2</sup>; 1,5 h) para que as proteínas fossem transferidas para membranas de nitrocelulose. Para verificar a eficiência do processo de transferência, as membranas foram coradas com Ponceau Stain (LOPES *et al.*, 2012; GONCALVES *et al.*, 2013).

As membranas foram bloqueadas com 5% de albumina sérica bovina em TBS (Tris 10 mM, NaCl 150 mM pH 7,5) por 1 h e após 3 lavagens de 5 min com TBS-T, (Tris 10 mM, NaCl 150 mM, Tween-20 0,1%, pH 7,5) as membranas foram incubadas overnight (4°C) com os anticorpos específicos para as formas fosforiladas e totais das proteínas de interesse. Para a detecção dos complexos imunes, as membranas foram incubadas por 1 h com anticorpo secundário anti-IgG de coelho, camundongo ou cabra (ligado à peroxidase) e reveladas por quimiluminescência, através do sistema LumiGlo® (Cell Signaling). O nível de fosforilação das foi determinado pela razão entre a D.O da banda fosforilada e a D.O da banda total. O imunocnteúdo das proteínas de interesse foi determinado pela razão entre a D.O da amostra e D.O de  $\beta$ -actina. A relação dos anticorpos utilizados com as respectivas diluições está alistada na tabela 2. As bandas foram quantificadas utilizando o software Scion Image ® e os resultados expressos em percentual do controle.



**Figura 16** Eletroforese, eletrotransferência e imunodetecção.

Anticorpo	Peso Molécula (Proteína alvo)	Fabricante (Código Prod.)	Diluição
P-CREB (ser-133)	43 kDa	Cell Signaling (9198)	1:1000
T-CREB	43 kDa	Cell Signaling (9197)	1:1000
Receptor A <sub>1</sub>	36 kDa	ThermoFisher (PA5-27075)	1:1000
Receptor A <sub>2A</sub>	45 kDa	Santa Cruz Biotech. (sc-32261)	1:1000
GluA1	100 kDa	Santa Cruz Biotech. (sc-13152)	1:1000
PSD95	95 kDa	Cell Signaling (2507)	1:1000
Sinapsina	77 kDa	Cell Signaling (2312)	1:1000
β-Actina	45 kDa	Santa Cruz Biotech. (sc-47778)	1:2000
Goat-anti-mouse	-	Millipore (AP308P)	1:5000
Goat-anti-rabbit	-	Millipore (AP308P)	1:5000
Donkey-anti-Goat	-	Santa Cruz (sc-2020)	1:5000

**Tabela 2.** Listagem de anticorpos utilizados para análises de Wester Blotting.

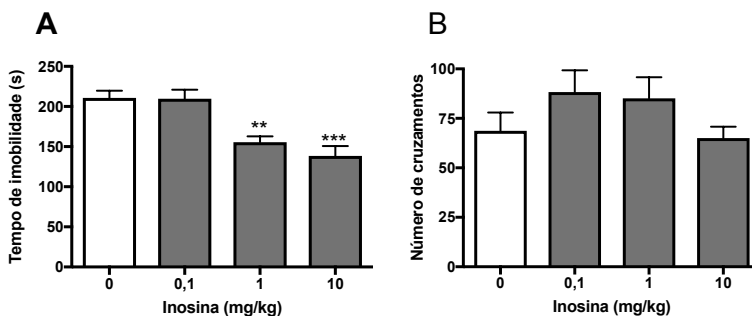
#### 4.3.7 Análise Estatística

Os resultados obtidos dos testes comportamentais foram expressos como a média + E.P.M. e avaliados por análise de variância (ANOVA) de uma ou duas vias seguido pelo *post-hoc* de Newman-Keuls, quando apropriado. Os resultados obtidos das análises por Western-Blotting foram expressos como porcentagem da média do controle + E.P.M. e avaliados pelo teste t de Student. As diferenças estatísticas foram atribuídas com um valor de  $p < 0,05$ .

## 4.4 Resultados

### 4.4.1 Efeito tipo-antidepressivo de inosina no TSC

A administração de inosina foi capaz de induzir um efeito anti-imbilidade no TSC sem alterar a locomoção dos animais no TCA, como pode ser verificado na figura 17. A ANOVA de uma via indicou um efeito significativo para o tratamento com inosina [ $F(3,26) = 13,19, p > 0,001$ ] e nenhum efeito para o número de cruzamentos observados no TCA [ $F(1,58) = 1,19, p > 0,001$ ]. As análises de *post-hoc* indicaram que a administração de inosina nas doses de 1 e 10 mg/kg diminuiu significativamente o tempo de imobilidade dos animais no TSC.

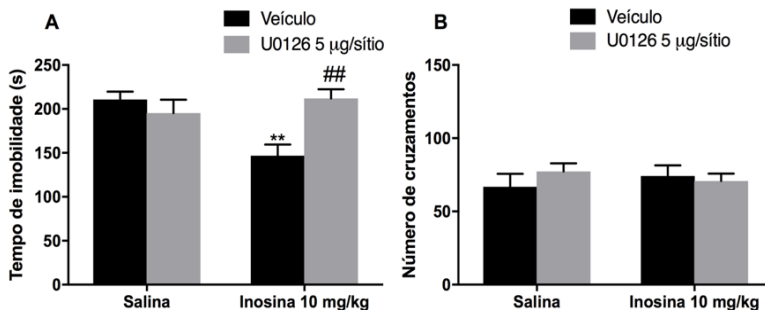


**Figura 17** Efeito do tratamento com inosina no tempo de imobilidade no TSC e no número de cruzamentos no TCA. Os animais foram tratados via i.p com inosina (0,1-10 mg/kg) ou com salina e submetidos ao TSC (A) e ao TCA (B). As barras representam a média + E.P.M. (n = 7-8). \*\* p < 0,01, \*\*\* p < 0,001 quando comparado com controle (salina). (ANOVA de uma via seguida pelo teste *post-hoc* de Newman-Keuls).

### 4.4.2 Envolvimento da ativação de MEK/ERK, CAMKII, PKA e PI3K/AKT no efeito tipo antidepressivo de inosina.

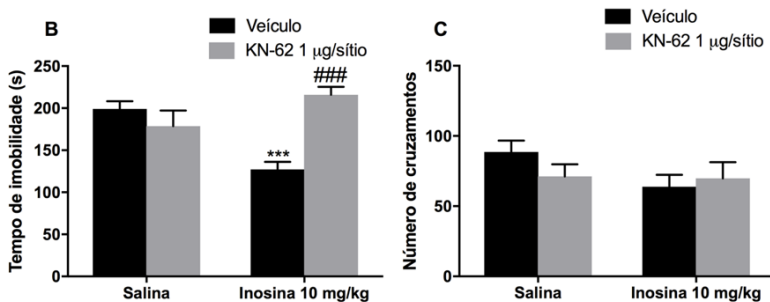
Os resultados demonstrados na figura 18A revelam que o pré-tratamento dos animais com U0126 (5 µg/sítio, i.c.v., inibidor de MEK 1/2), preveniu de maneira significativa a redução no tempo de imobilidade induzida por inosina. A ANOVA de duas vias revelou um efeito significativo do tratamento com inosina [ $F(1,24) = 4,35, p < 0,05$ ], sem diferenças para o tratamento com U0126 [ $F(1,24) = 3,19, p > 0,05$ ] e uma interação significativa entre os tratamentos com inosina e U0126 [ $F(1,24) = 11,36, p < 0,01$ ]. Os resultados mostrados na figura 18B demonstram que nenhum dos tratamentos alterou o número de cruzamentos no TCA

[tratamento com inosina:  $F(1,24) = 0,26$ ,  $p > 0,05$ ; tratamento com U0126 [ $F(1,24) = 0,0032$ ,  $p > 0,05$ ; interação entre o tratamento com inosina e U0126:  $F(1,24) = 0,96$ ,  $p > 0,05$ ].



**Figura 18. Influência da inibição da MEK1/2 nos efeitos de inosina no TSC e TCA.** Efeito do tratamento com inosina (10 mg/kg, i.p.) e/ou U0126 (inibidor da MEK1/2; 5 µg/sítio; i.c.v.) no tempo de imobilidade no TSC (painel A) e no número de cruzamentos no TCA (painel B). As barras representam a média + E.P.M. (n = 6-8). \*\*  $p < 0,01$  comparado com controle (salina + veículo). ##  $p$  comparado com o grupo inosina + veículo. (ANOVA de duas vias seguida pelo teste *post-hoc* de Newman-Keuls).

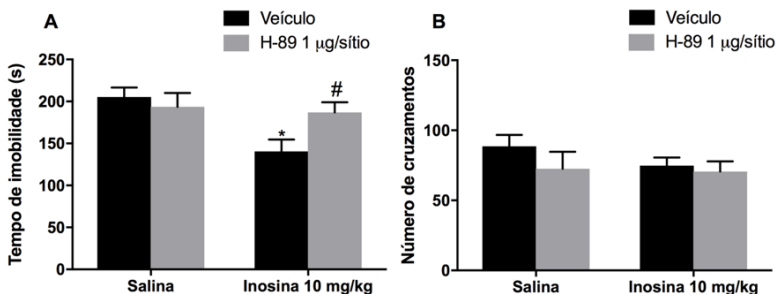
O pré-tratamento dos animais com KN-62 (1 µg/sítio i.c.v., inibidor de CaMKII) foi capaz de prevenir o efeito tipo-antidepressivo da inosina no TSC, conforme demonstrado na figura 19A. A análise por ANOVA de duas vias revelou um efeito significativo para o tratamento com inosina [ $F(1,23) = 8,38$ ,  $p < 0,05$ ], sem diferenças para o tratamento com KN-62 [ $F(1,23) = 2,17$ ,  $p > 0,05$ ], e uma interação significativa entre os tratamentos com inosina e KN-62 [ $F(1,23) = 21,49$ ,  $p < 0,001$ ]. Além disso, essas observações comportamentais não podem ser atribuídas a diferenças na atividade locomotora dos animais, uma vez que nenhum dos tratamentos alterou a locomoção dos animais no TCA, como mostrado na figura 19B [tratamento com inosina:  $F(1,23) = 0,38$ ,  $p > 0,05$ ], tratamento com KN-62: [ $F(1,23) = 2,00$ ,  $p > 0,05$ ]; interação entre o tratamento com inosina e KN-62  $F(1,23) = 1,61$ ,  $p > 0,05$ ].



**Figura 19. Influência da inibição de CAMKII nos efeitos de inosina no TSC e TCA.** Efeito do tratamento com inosina (10 mg/kg, i.p.) e/ou KN-62 (inibidor da CAMKII; 1 µg/sítio; i.c.v.) no tempo de imobilidade no TSC (painel A) e no número de cruzamentos no TCA (painel B). As barras representam a média + E.P.M. (n = 6-8). \*\*\* p < 0,001 comparado com controle (salina + veículo). ### p < 0,001 comparado com o grupo inosina + veículo. (ANOVA de duas vias seguida pelo teste *post-hoc* de Newman-Keuls).

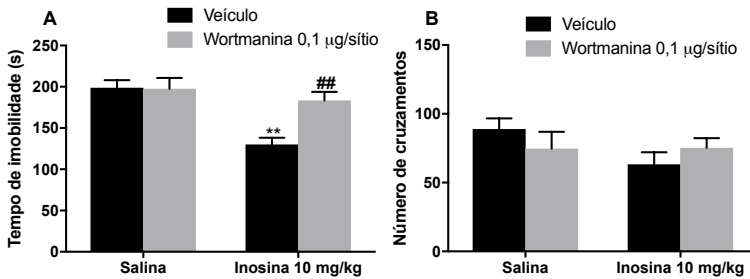
De maneira similar, os resultados na figura 20A indicam que o pré-tratamento dos camundongos com H-89 (1 µg/sítio, i.c.v., inibidor de PKA) aboliu o efeito anti-imobilidade de inosina no TSC. As análises por ANOVA de duas vias não indicaram um efeito para o tratamento com inosina [F (1,26) = 1,59, p > 0,05], um efeito para o tratamento com H-89 [F (1,26) = 6,75, p < 0,05], e um efeito significativo para a interação entre esses tratamentos [F (1,26) = 4,48, p < 0,05]. Além disso a ANOVA de duas vias indicou que os resultados do TCA, demonstrados na figura 20B, não apresentaram diferenças significativas para o tratamento com inosina, [F (1,26) = 1,27, p > 0,05], ou para o tratamento com H-89 [F (1,26) = 0,75, p > 0,05], nem para a interação entre os tratamentos com inosina e H-89 [F (1,26) = 0,43, p > 0,05].





**Figura 20. Influência da inibição de PKA (usando H-89) nos efeitos de inosina no TSC e TCA.** Efeito do tratamento com inosina (10 mg/kg, i.p.) e/ou H-89 (inibidor da PKA; 1 µg/sítio; i.c.v.) no tempo de imobilidade no TSC (painel A) e no número de cruzamentos no TCA (painel B). As barras representam a média + E.P.M. (n = 7-8). \*\*\* p < 0,001 comparado com controle (salina + veículo). ### p < 0,001 comparado com o grupo inosina + veículo. (ANOVA de duas vias seguida pelo teste de *post-hoc* de Newman-Keuls).

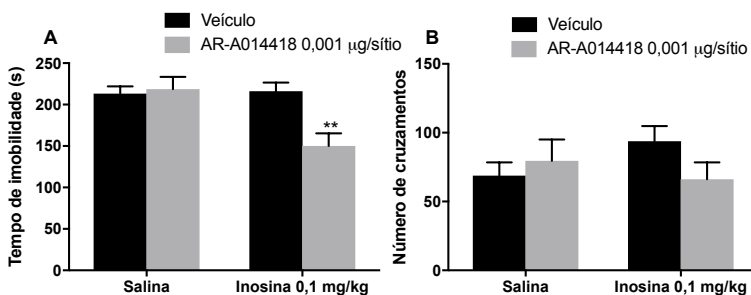
A figura 21A mostra o efeito do tratamento com wortmanina (0,1 µg/sítio, i.c.v., inibidor de PI3K) na redução do tempo de imobilidade induzida por inosina. A ANOVA de duas vias revelou um efeito significativo para o tratamento com inosina [ $F(1,25) = 6,67$ ,  $p < 0,05$ ], tratamento com wortmanina [ $F(1,25) = 16,78$ ,  $p < 0,001$ ], e para a interação entre os tratamentos anteriormente citados [ $F(1,25) = 7,49$ ,  $p < 0,01$ ]. As comparações de *post-hoc* indicaram que o tratamento com wortmanina aboliu o efeito anti-imobilidade de inosina no TSC. Adicionalmente, como indicado na figura 21B, o número de cruzamentos no TCA não foi alterado pelo tratamento com inosina e/ou wortmanina [tratamento com inosina  $F(1,25) = 0,01$ ,  $p > 0,05$ , tratamento com wortmanina:  $F(1,25) = 2,00$ ,  $p > 0,05$ , interação entre o tratamento com inosina e wortmanina:  $F(1,25) = 2,25$ ,  $p > 0,05$ ].



**Figura 21. Influência da inibição de PI3K nos efeitos de inosina no TSC e TCA.** Efeito do tratamento com inosina (10 mg/kg, i.p.) e/ou wortmanina (inibidor da PI3K 0,1 µg/sítio; i.c.v.) no tempo de imobilidade no TSC (painel A) e no número de cruzamentos no TCA (painel B). As barras representam a média + E.P.M. (n = 7-8). \*\*\* p < 0,01 comparado com controle (salina + veiculo). ## p < 0,001 comparado com o grupo inosina + veiculo. (ANOVA de duas vias seguida pelo teste *post-hoc* de Newman-Keuls).

#### 4.4.3 Envolvimento de GSK-3β no efeito tipo antidepressivo de inosina.

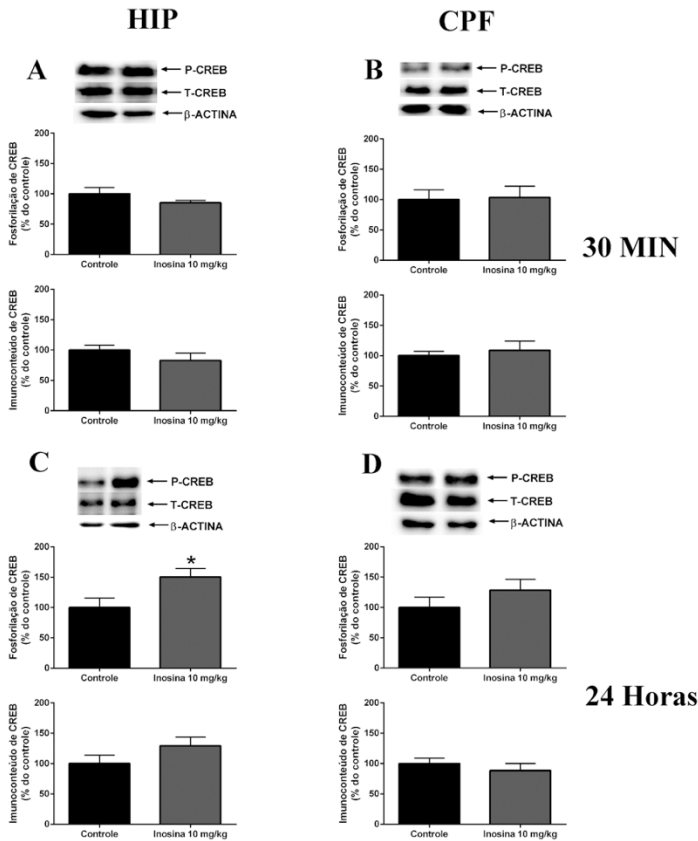
Com o intuito de verificar a hipótese de que a modulação de GSK-3β está envolvida no efeito tipo antidepressivo de inosina, os camundongos foram tratados com doses sub-ativas de inosina e o do inibidor seletivo de GSK-3β, AR-A014418 (0,001 µg/sítio, i.c.v.). A ANOVA de duas vias revelou um efeito do tratamento com inosina [F (1,24) = 5,74, p < 0,05], do tratamento com AR-A014418 [F (1,24) = 6,74, p < 0,05] e da interação entre inosina e AR-A014418. [F (1,24) = 8,01, p < 0,01]. Análises de *post-hoc* indicaram que o tratamento com sub-doses de inosina e de AR-A014418 reduziram de maneira significativa o tempo de imobilidade no TSC como demonstrado na figura 22A. Os resultados na figura 22B demonstraram que nenhum desses tratamentos alterou de maneira significativa a atividade locomotora dos animais no TCA. [Tratamento com inosina: F (1,24) = 0,48, p > 0,05], tratamento com AR-A014418 [F (1,24) = 0,22, p > 0,05], interação entre inosina e AR-A014418: F (1,24) = 2,44, p > 0,05].



**Figura 22. Influência da inibição de GSK-3 $\beta$  nos efeitos de inosina no TSC e TCA.** Efeito do tratamento com inosina (0,1 mg/kg, i.p) e/ou AR-A014418 (inibidor de GSK-3 $\beta$  0,001  $\mu$ g/sítio; i.c.v.) no tempo de imobilidade no TSC (painel A) e no número de cruzamentos no TCA (painel B). As barras representam a média + E.P.M. (n = 7). \*\* p < 0,01 comparado com controle (salina + veículo). ## p < 0,001 comparado com o grupo inosina + veículo. (ANOVA de duas vias seguida pelo teste de *post-hoc* Newman-Keuls).

#### 4.4.4 Efeito da administração de inosina na fosforilação e imunoconteúdo de CREB

Uma vez que a modulação das vias de sinalização demonstradas até agora pode convergir para a fosforilação de um alvo em comum, foi verificado por análises de Western-blotting a fosforilação (ser-133) e o imunoconteúdo de CREB no hipocampo e CPF dos animais, 30 minutos e 24 horas após a administração i.p. de inosina. Como demonstrado nas figuras 23A e 23B, não foram verificadas alterações fosforilação e no imunoconteúdo total de CREB nas estruturas cerebrais analisadas 30 minutos após o tratamento com inosina. (hipocampo P-CREB 30 min:  $t(12)=1,28$ ,  $p > 0,05$ , hipocampo T-CREB 30 min:  $t(12)=1,20$ ,  $p > 0,05$ , PFC P-CREB 30 min:  $t(12)=1,28$ ,  $p > 0,05$ , CPF T-CREB 30 min:  $t(12)=4,38$ ,  $p > 0,05$ ). Contudo, como demonstrado na figura 23C, foi observado um aumento na fosforilação de CREB no hipocampo dos animais 24 horas após o tratamento com inosina ( $t(14)=2,40$ ,  $p < 0,05$ ), sem alterações no imunoconteúdo total de CREB ( $t(14)=1,46$ ,  $p > 0,05$ ). Os resultados na figura 23D indicam que 24 horas após tratamento com inosina não foram verificadas alterações na fosforilação e no imunoconteúdo total de CREB no CPF. (P-CREB:  $t(14)=1,15$ ,  $p > 0,05$ ; T-CREB:  $t(14)=1,61$ ,  $p > 0,05$ ).



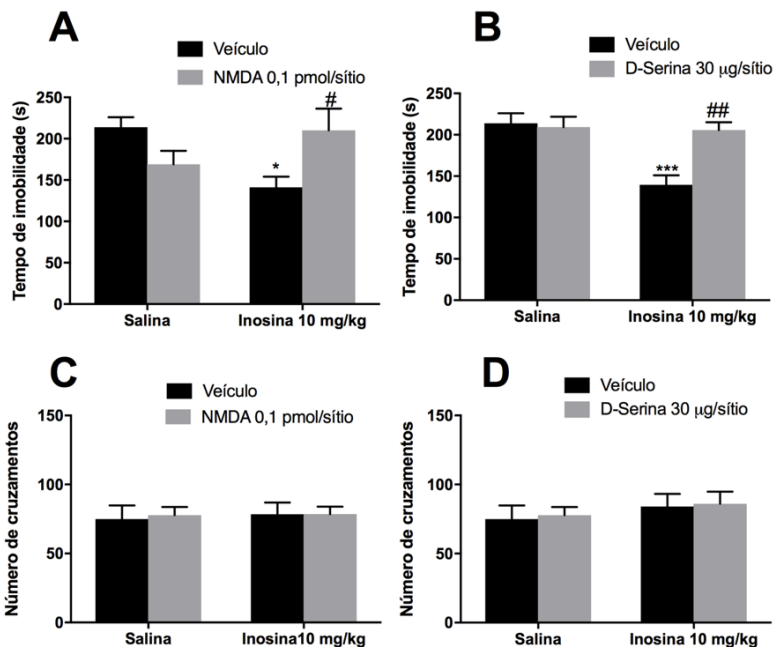
**Figura 23. Efeito do tratamento com inosina na fosforilação (ser-133) e imunoconteúdo de CREB.** A figura mostra uma imagem representativa e a quantificação da fosforilação e imunoconteúdo de CREB no hipocampo (A) e córtex pré-frontal (CPF) (B), 30 minutos após a administração de inosina (10 mg/kg, i.p.) além de mostrar a imagem representativa e a quantificação da fosforilação e imunoconteúdo de CREB no hipocampo (C) e CPF (D), 24 horas após a administração de inosina (10 mg/kg, i.p.). Os animais controle foram tratados com salina (10 ml/kg i.p.). A quantificação da fosforilação foi realizada pela razão entre a D.O. das bandas fosforiladas (P-CREB) e totais de CREB (T-CREB) e o imunoconteúdo foi avaliado pela razão da D.O. banda de T-CREB e a D.O. da banda de  $\beta$ -actina. Os resultados da quantificação estão expressos como percentual do controle e as barras representa a média  $\pm$  E.P.M de 7-8 experimentos (Teste t de student).

#### 4.4.5 Envolvimento dos receptores NMDA e AMPA no efeito tipo-antidepressivo de inosina

Além do estudo da participação destas vias de sinalização nos efeitos comportamentais induzidos por inosina, foi verificado se a modulação do sistema glutamatérgico poderia estar relacionada com o efeito tipo-antidepressivo dessa purina.

Uma vez que a hipótese envolvida nesses experimentos consistia num possível efeito inibitório de inosina nos receptores do tipo NMDA, foi verificado o efeito do tratamento com o agonista e o co-agonista desses receptores no efeito anti-imobilidade de inosina no TSC. Os resultados da figura 24A indicam que o pré-tratamento com NMDA (0,1 pmol/sítio, i.c.v. agonista NMDAR), aboliu o efeito tipo antidepressivo da inosina. A ANOVA de duas vias não revelou diferenças significativas para os tratamentos com inosina [ $F(1,24) = 0,89, p > 0,05$ ], e para o tratamento com NMDA [ $F(1,24) = 0,53, p > 0,05$ ], mas uma interação significativa entre esses tratamentos [ $F(1,24) = 11,55, p < 0,01$ ]. Análises *post-hoc* indicaram que o pré-tratamento com NMDA preveniu significativamente a diminuição do tempo de imobilidade induzido por esta purina. Adicionalmente, conforme pode ser verificado na figura 24C, nenhum dos tratamentos modificou a locomoção dos animais no TCA. A ANOVA de duas vias não mostrou diferenças significativas para o tratamento com inosina [ $F(1,24) = 0,067, p > 0,05$ ], tratamento com NMDA [ $F(1,24) = 0,036, p > 0,05$ ], ou para a interação entre os tratamentos com inosina e NMDA [ $F(1,24) = 0,031, p > 0,05$ ].

O tratamento com D-serina (30  $\mu\text{g/sítio}$ ), um co-agonista de NMDAR, também foi capaz de prevenir o efeito anti-imobilidade de inosina. (Figura 24B). A ANOVA de duas vias revelou um efeito para o tratamento com inosina [ $F(1,24) = 9,97, p < 0,05$ ], sem diferenças para o tratamento com D-serina [ $F(1,24) = 3,19, p > 0,05$ ], mas uma interação significativa para os tratamentos com inosina e D-serina [ $F(1,24) = 11,36, p < 0,01$ ]. Os resultados da figura 24D mostram que nenhum desses tratamentos citados modificou a locomoção dos animais no TCA. A ANOVA de duas vias não revelou diferenças para o tratamento com inosina [ $F(1,24) = 0,11, p > 0,05$ ], D-serina [ $F(1,24) = 0,18, p > 0,05$ ] ou para interação entre os tratamentos com inosina e D-serina [ $F(1,24) = 0,11, p > 0,05$ ].

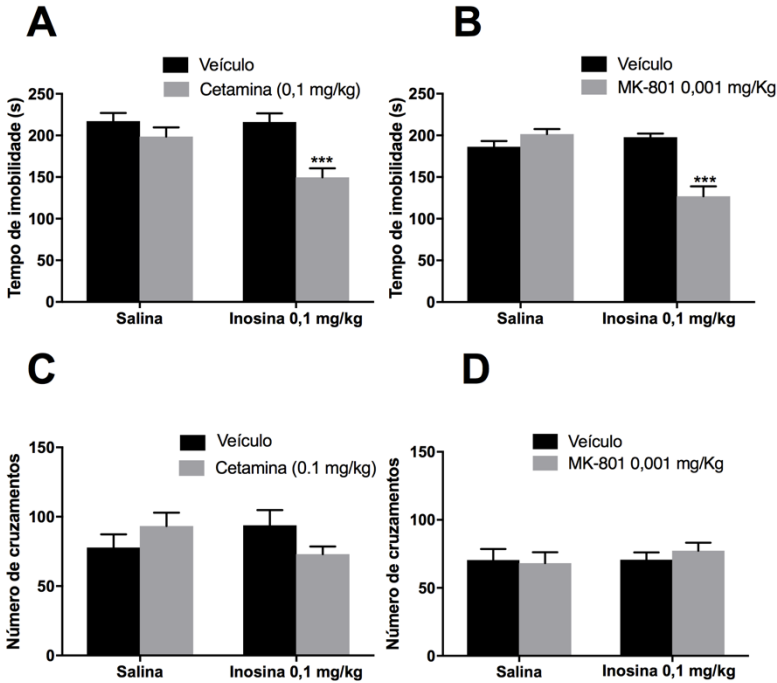


**Figura 24. Influência do tratamento com agonistas dos receptores NMDA nos efeitos de inosina no TSC e TCA.** Efeito do tratamento com inosina (10 mg/kg, i.p.) e/ou NMDA (agonista NMDAR; 0,1 pmol/sítio; i.c.v.) ou D-serina (30 µg/sítio, co-agonista NMDAR) no tempo de imobilidade no TSC (painéis A e B) e no número de cruzamentos no TCA (painel C e D). As barras representam a média ± E.P.M. (n = 7-8). \*  $p < 0,05$  comparado com controle (salina + veículo). #  $p < 0,05$  comparado com o grupo inosina + veículo \*\*\*  $p < 0,001$  comparado com controle (salina + veículo). ###  $p < 0,001$  comparado com o grupo inosina + veículo (ANOVA de duas vias seguida pelo teste de *post-hoc* Newman-Keuls).

Além da reversão do comportamento tipo antidepressivo de inosina causada pela administração do agonista e do co-agonista do receptor NMDA, foi verificado se a administração de doses sub-ativas de inosina juntamente com doses sub-ativas de antagonistas do receptor NMDA poderia induzir um comportamento tipo antidepressivo. Como pode ser verificado na figura 25A, a co-administração de inosina (0,1 mg/kg, i.p.) e cetamina (0,1 mg/kg, i.p. Antagonista NMDAR) induziram um efeito do tipo antidepressivo sinérgico. A ANOVA de duas vias revelou um efeito significativo para o tratamento com cetamina [ $F(1,24) = 16,46$ ,  $p < 0,001$ ], para o tratamento com inosina [ $F(1,24) = 5,72$ ,  $p < 0,001$ ] bem como para a interação entre os tratamentos inosina e cetamina

[F(1,24) = 5,21,  $p < 0,05$ ]. Os resultados do TCA, indicaram que o tratamento com inosina e/ou cetamina não alteram a locomoção dos animais. A ANOVA de duas vias não indicou diferenças para o tratamento com inosina [F(1,24) = 0,054,  $p > 0,05$ ], cetamina [F(1,24) = 0,08,  $p > 0,05$ ] e da interação entre esses tratamentos [F(1,24) = 3,94,  $p > 0,05$ ] (figura 3C).

Adicionalmente, os resultados da figura 25B mostram o efeito tipo-antidepressivo sinérgico entre doses sub-efetivas de inosina (0,1 mg/kg, i.p.) e MK-801 (0,001 mg/kg, p.o. antagonista NMDAR). Através da ANOVA de duas vias foi verificado um efeito para o tratamento com inosina [F(1,25) = 14,01,  $p < 0,001$ ], para o tratamento com MK-801 [F(1,25) = 11,01,  $p < 0,001$ ], bem como para interação entre esses tratamentos [F(1,25) = 26,46,  $p < 0,001$ ]. As comparações de *post-hoc* indicaram que apenas o tratamento com doses sub-ativas de inosina e MK-801 foi capaz de induzir um efeito tipo-antidepressivo. Além disso, essas alterações no TSC não podem ser atribuídas a alterações na locomoção dos animais, já que nenhum dos tratamentos alterou a locomoção dos animais no TCA (figura 25D) [tratamento com inosina: F(1,25) = 0,45,  $p > 0,05$ ; tratamento com MK-801: F(1,26) = 0,095,  $p > 0,05$ ; interação entre os tratamentos com inosina e MK-801 [F(1,25) = 0,39,  $p > 0,05$ ].

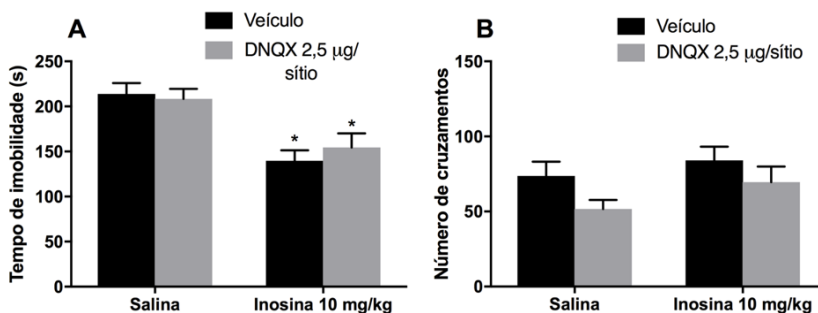


**Figura 25. Influência do tratamento com antagonistas dos receptores NMDA nos efeitos de inosina no TSC e TCA.** Efeito do tratamento com inosina (0,1 mg/kg, i.p.) e/ou cetamina (antagonista NMDAR ; 0,1 mg/kg, i.p.) ou MK-801 (antagonista NMDAR; 0,001 mg/kg, p.o.) no tempo de imobilidade no TSC (painéis A e C) e no número de cruzamentos no TCA (painéis B e D). As barras representam a média + E.P.M. (n = 7-8). \*\*\*  $p < 0,001$  comparado com controle (salina + veículo) (ANOVA de duas vias seguida pelo teste *post-hoc* de Newman-Keuls).

Os resultados na figura 26A demonstram que o efeito anti-imobilidade de inosina no TSC não foi alterado pelo tratamento com DNQX (2,5  $\mu\text{g/sítio}$ , i.c.v., antagonista de AMPAR). A ANOVA de duas vias indicou um efeito significativo para o tratamento com inosina [ $F(1,26) = 25,42$ ,  $p < 0,001$ ], sem diferenças para o tratamento com DNQX, [ $F(1,26) = 0,13$ ,  $p > 0,05$ ], e sem demonstrar uma interação entre os tratamentos com inosina e DNQX [ $F(1,26) = 0,43$ ,  $p > 0,05$ ]. Além disso, nenhum dos tratamentos modificou a locomoção dos animais no TCA (figura 26B) [Tratamento com inosina:  $F(1,26) = 2,44$ ,  $p > 0,05$ ;



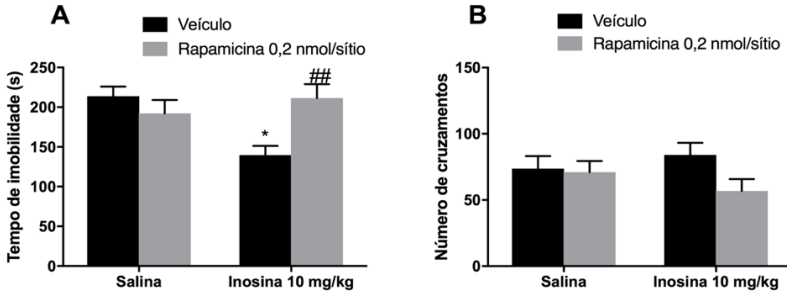
tratamento com DNQX:  $F(1,26) = 0,75$ ,  $p > 0,05$ ; interação entre os tratamentos com inosina e DNQX  $F(1,26) = 0,17$ ,  $p > 0,05$ ].



**Figura 26. Influência do tratamento com antagonista dos receptores AMPA nos efeitos de inosina no TSC e TCA.** Efeito do tratamento com inosina (10 mg/kg, i.p.) e/ou DNQX (antagonista AMPAR; 2,5 µg/sítio; i.c.v.) no tempo de imobilidade no TSC (painel A) e no número de cruzamentos no TCA (painel B). As barras representam a média + E.P.M. (n = 7-8). \*  $p < 0,05$  comparado com controle (salina + veículo) (ANOVA de duas vias seguida pelo teste de *post-hoc* de Newman-Keuls).

#### 4.4.6 Envolvimento da mTORC1 no efeito tipo antidepressivo de inosina

Adicionalmente, foi avaliado se a modulação de mTORC1 poderia estar envolvida no efeito tipo-antidepressivo de inosina no TSC. Como pode ser verificado na figura 27A o efeito tipo-antidepressivo de inosina foi prevenido pelo pré-tratamento com o inibidor de mTORC1, rapamicina (0,2 nmol/sítio, i.c.v.). A ANOVA de duas vias não indicou diferenças significativas para os tratamentos com inosina [ $F(1,24)=2,91$ ,  $p > 0,05$ ], mas para o tratamento com rapamicina [ $F(1,24)=4,30$ ,  $p < 0,05$ ] e uma interação para os tratamentos com inosina e rapamicina [ $F(1,24)=13,28$ ,  $p < 0,01$ ]. Adicionalmente, a ANOVA de duas vias não indicou diferenças para o tratamento com inosina [ $F(1,24) = 0,04 > 0,05$ ], tratamento com rapamicina [ $F(1,24) = 2,47$ ,  $p > 0,05$ ], e para a interação entre os tratamentos com inosina e rapamicina [ $F(1,24)=0,21$ ,  $p > 0,05$ ] número de cruzamentos observados no TCA (figura 27B).

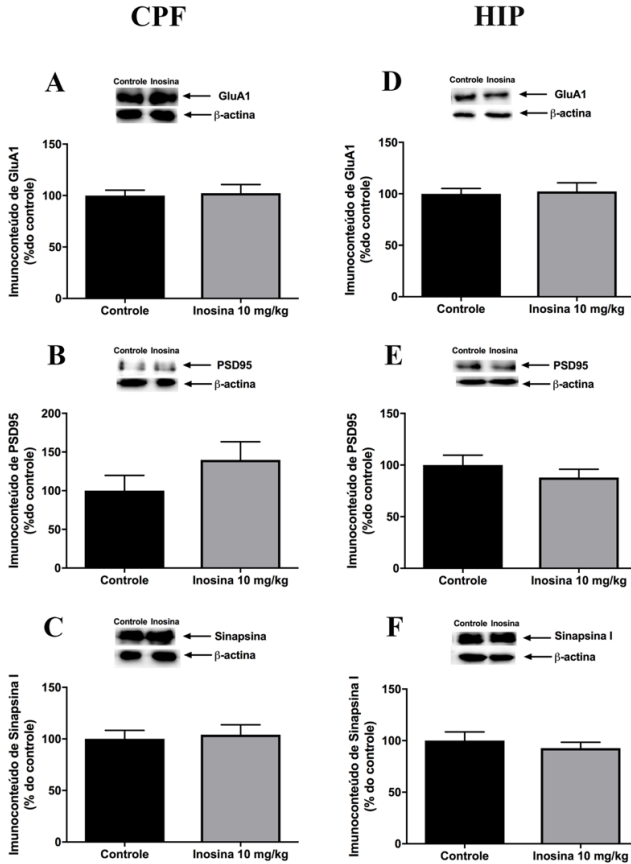


**Figura 27. Influência da inibição de mTORC1 (usando rapamicina) nos efeitos de inosina no TSC e TCA.** Efeito do tratamento com inosina (10 mg/kg, i.p.) e/ou rapamicina (inibidor da mTORC1; 0,2 nmol/sítio; i.c.v.) no tempo de imobilidade no TSC (painel A) e no número de cruzamentos no TCA (painel B). As barras representam a média + E.P.M. (n = 5-7). \*\*\* p < 0,001 comparado com controle (salina + veículo). ### p < 0,001 comparado com o grupo inosina + veículo. (ANOVA de duas vias seguida pelo teste de *post-hoc* de Newman-Keuls).

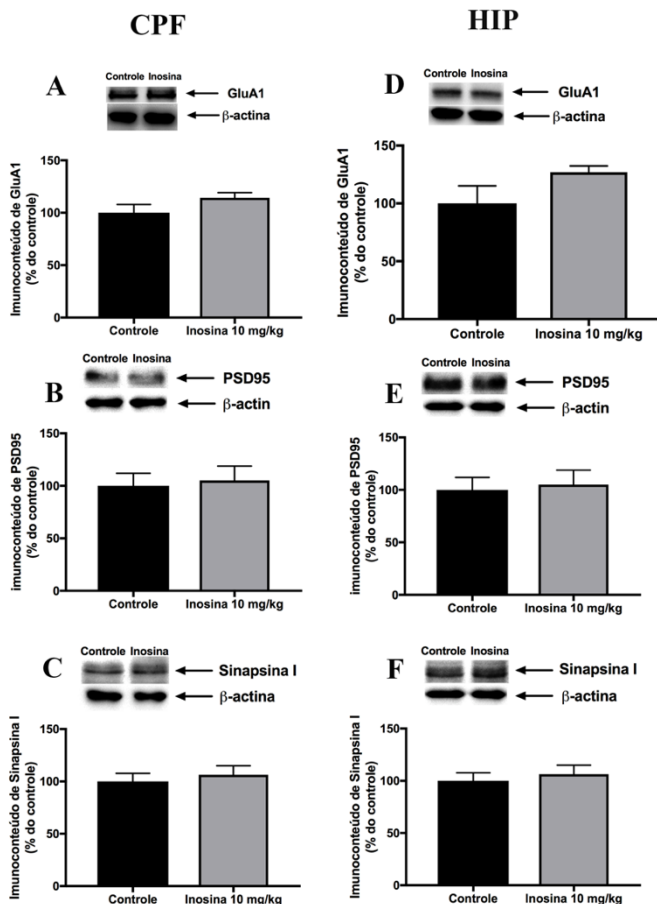
Uma vez que a ativação de mTORC1 pode levar a síntese de proteínas sinápticas (LI *et al.*, 2010), foi avaliado se inosina poderia alterar o imunocontéudo de proteínas sinápticas como PSD-95, GluA1 e sinapsina I. Contudo, não verificamos alterações no imunocontéudo dessas proteínas, 30 min ou 24 horas após a administração de inosina (figuras 28 e 29). Os resultados dos testes estatísticos estão listados na tabela a seguir:

30 min	24 horas
CPF GluA1: $t(14) = 0,24, p > 0,05$	CPF GluA1: $t(14) = 2,89, p > 0,05$
CPF PSD95: $t(13) = 1,28, p > 0,05$	CPF PSD95: $t(14) = 1,36, p > 0,05$
CPF Sinapsina I: $t(13) = 0,32, p > 0,05$	CPF Sinapsina I: $t(14) = 2,59, p > 0,05$
HIP GluA1: $t(13) = 0,73, p > 0,05$	HIP GluA1: $t(14) = 2,45, p > 0,05$
HIP PSD95: $t(14) = 0,98, p > 0,05$	HIP PSD95: $[t(14) = 1,33, p > 0,05$
HIP Sinapsina I: $t(13) = 0,73, p > 0,05$	HIP Sinapsina I: $t(14) = 1,25, p > 0,05$

**Tabela 3. Valores de significância para as análises de Western Blotting no imunocconteúdo de GluA1, PSD95 e Sinapsina I, 30 minutos e 24 horas após a administração de inosina (10 mg/kg i.p.). CPF: córtex pré-frontal; HIP: Hipocampo.**



**Figura 28. Imunoconteúdo de GluA1, PSD95 e sinapsina 30 minutos após a administração i.p. de inosina.** A figura mostra uma imagem representativa e a quantificação do imunoconteúdo de GluA1, PSD95 e sinapsina no córtex pré-frontal (CPF) (A-C) e no hipocampo (D-F), 30 minutos após a administração de inosina (10 mg/kg, i.p.). Os animais controle foram tratados com salina (10 ml/kg, i.p.). A quantificação foi realizada entre a D.O. da banda de interesse e a banda de β-actina. Os resultados da quantificação estão expressos como percentual do controle e as barras representam a média ± E.P.M de 7-8 experimentos (Teste t de student).



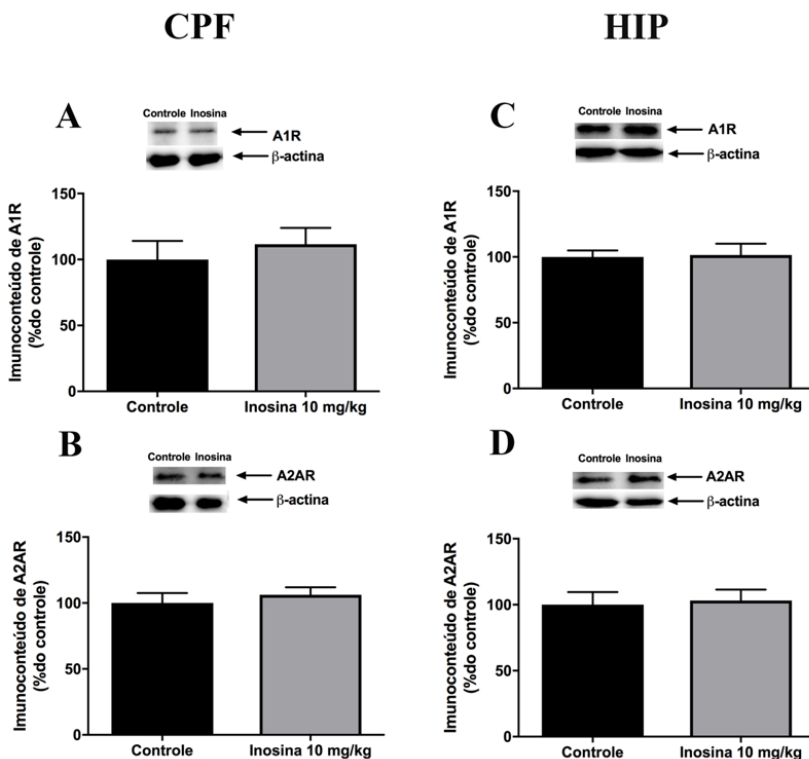
**Figura 29. Imunocnteúdo de GluA1, PSD95 e sinapsina 24 horas após a administração i.p. de inosina.** A figura mostra uma imagem representativa e a quantificação do imunocnteúdo de GluA1, PSD95 e sinapsina no córtex pré-frontal (CPF) (A-C) e no hipocampo (D-F), 24 horas após a administração de inosina (10 mg/kg, i.p.). Os animais controle foram tratados com salina (10 ml/kg i.p.). A quantificação foi realizada entre a D.O. da banda de interesse e a banda de β-actina. Os resultados da quantificação estão expressos como percentual do controle e as barras representam a média ± E.P.M de 8 experimentos (Teste t de student).

#### 4.4.7 Avaliação da expressão dos receptores de adenosina A<sub>1</sub> e A<sub>2A</sub> após a administração de inosina

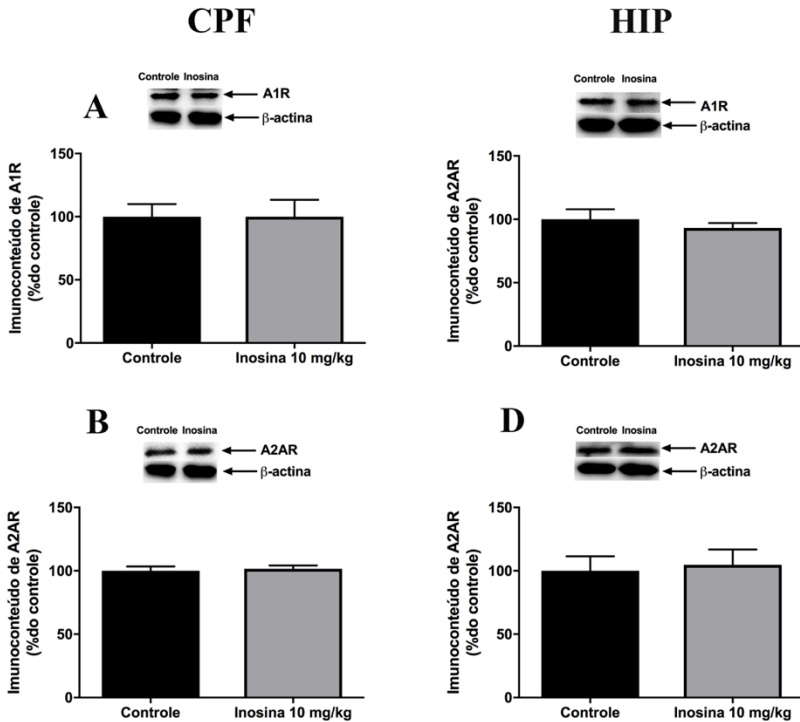
Uma vez que os receptores de adenosina estão envolvidos na modulação de outros sistemas de neurotransmissão no SNC, incluindo a neurotransmissão glutamatérgica, foi verificada se administração i.p. de inosina poderia modular o imunoconteúdo dos receptores A<sub>1</sub> e A<sub>2A</sub>. Como verificado na figura 30 e 31, a administração de inosina não alterou significativamente o imunoconteúdo destes receptores no CPF e hipocampo dos animais, 30 minutos ou 24 horas após a administração i.p. de inosina. Os resultados dos testes estatísticos estão listados a seguir:

30 min	24 horas
CPF A <sub>1</sub> : t(13) = 0,62, p > 0,05;	CPF A <sub>1</sub> : t(6) = 0,002, p > 0,05;
CPF A <sub>2A</sub> : t(9) = 0,62, p > 0,05;	CPF A <sub>2A</sub> : t(14) = 0,37, p > 0,05;
HIP A <sub>1</sub> : t(12) = 0,15, p > 0,05;	HIP A <sub>1</sub> : t(14) = 0,78, p > 0,05;
HIP A <sub>2A</sub> : t(12) = 0,25, p > 0,05;	HIP A <sub>2A</sub> : t(14) = 0,28, p > 0,05;

**Tabela 4. Valores de significância para as análises de Western Blotting no imunoconteúdo dos receptores A<sub>1</sub> e A<sub>2A</sub> de adenosina 30 minutos e 24 após a administração de inosina (10 mg/kg i.p.).** CPF : córtex pré frontal; HIP: Hipocampo.



**Figura 30. Imunoconteúdo de receptores A<sub>1</sub> (A1R) e A<sub>2A</sub> (A2AR) 30 minutos após a administração i.p. de inosina.** A figura mostra uma imagem representativa e a quantificação do imunoconteúdo de A1R e A2AR no córtex pré-frontal (CPF) (A-B) e no hipocampo (C-D), 30 minutos após a administração de inosina (10 mg/kg, i.p.). Os animais controle foram tratados com salina (10 ml/kg i.p.). A quantificação foi realizada entre a D.O. da banda de interesse e a banda de β-actina. Os resultados da quantificação estão expressos como percentual do controle e as barras representam a média ± E.P.M de 6-8 experimetos (Teste t de student).



**Figura 31. Imunoconteúdo de receptores A1 (A1R) e A2A (A2AR) 24 horas após a administração i.p. de inosina.** A figura mostra uma imagem representativa e a quantificação do imunoconteúdo de A1R e A<sub>2A</sub> A2AR no córtex pré-frontal (CPF) (A-B) e no hipocampo (C-D), 24 horas após a administração de inosina (10 mg/kg, i.p.). Os animais controle foram tratados com salina (10 ml/kg i.p.). A quantificação foi realizada entre a D.O. da banda de interesse e a banda de  $\beta$ -actina. Os resultados da quantificação estão expressos como percentual do controle e as barras representam a média  $\pm$  E.P.M de 4-8 experimentos (Teste t de student).



#### 4.5 Discussão

Os resultados desse trabalho permitiram aprofundar o entendimento dos mecanismos relacionados ao efeito tipo-antidepressivo de inosina. Foi possível demonstrar de maneira inédita, que este efeito envolve a inibição de receptores NMDA, ativação de vias de sinalização como PKA, CaMKII, PI3K/Akt, MEK/ERK, mTOR e inibição de GSK-3 $\beta$ . Adicionalmente, uma única administração de inosina (10 mg/kg, i.p.) foi capaz de aumentar a fosforilação de CREB (ser-133) no hipocampo dos animais.

O TSC foi utilizado como um modelo de desespero comportamental preditivo para avaliar a atividade antidepressiva. Neste paradigma, os animais são submetidos a uma situação aguda de estresse inescapável, e a diminuição do tempo de imobilidade é considerada como um indicativo de atividade antidepressiva. Apesar das limitações associadas a esse teste, principalmente ao fato de que esse teste responde de maneira aguda ao tratamento com antidepressivos e ter apenas uma validade preditiva, o TSC é amplamente utilizado no estudo de compostos antidepressivos e seus mecanismos de ação. Contudo, compostos que aumentam a atividade locomotora nos animais podem induzir um resultado falso-positivo no TSC (STERU *et al.*, 1985). Para excluir essa possibilidade, todos os animais foram submetidos ao TCA, e nenhum dos tratamentos alterou de maneira significativa a locomoção dos animais, validando os resultados obtidos no TSC.

Os resultados visualizados na figura 17 confirmaram resultados prévios da literatura (KASTER *et al.*, 2013), que indicaram que 30 minutos após administração de inosina diminui o tempo de imobilidade no TSC sem alterar a locomoção dos animais no TCA. Baseado nesses resultados, a dose de 10 mg/kg foi escolhida como uma dose ativa dessa purina para realização dos ensaios bioquímicos e comportamentais. Uma vez que na dose 0,1 mg/kg não foram observadas alterações no tempo de imobilidade dos animais, essa dose foi utilizada nos estudos adicionais como uma dose sub-ativa de inosina.

Inosina é uma purina endógena formada durante o metabolismo de adenosina, que está presente em todo o organismo e em todos os tipos celulares, incluindo no SNC. Quando comparado aos outros nucleosídeos e seus metabólitos, a concentração de inosina se destaca como a maior em várias regiões encefálicas (KOVACS *et al.*, 2009). Além disso, durante situações de estresse celular como em processos isquêmicos, a concentração extracelular de inosina pode aumentar de maneira significativa (BELL *et al.*, 1998). Apesar da maioria dos trabalhos

focarem nos efeitos biológicos da adenosina, vários estudos têm demonstrado que o papel biológico de inosina vai além de uma simples molécula do metabolismo da adenosina. Já foi descrito na literatura uma variedade de atividades biológicas para essa purina, como efeitos neuroprotetores, imunomodulatórios, antinociceptivo e antidepressivo (HASKO, SITKOVSKY e SZABO, 2004; KASTER *et al.*, 2013; NASCIMENTO *et al.*, 2014).

Alguns dados provenientes de estudos clínicos sugerem uma possível relação entre depressão e inosina. Por exemplo, foi observado que em pacientes deprimidos ocorre uma diminuição dos níveis séricos de inosina (ALI-SISTO *et al.*, 2016). Estes resultados corroboram dados prévios na literatura que demonstraram uma queda na atividade da enzima ADA em pacientes com diagnósticos de depressão. Neste mesmo trabalho foi demonstrado que quanto maior o score observado na Escala Hamilton de depressão menor a atividade de ADA, indicando uma correlação negativa entre a atividade de ADA e a severidade dos sintomas depressivos (ELGUN, KESKINEGE e KUMBASAR, 1999)

Já foi demonstrado que a administração aguda i.p. de inosina diminui o tempo de imobilidade dos animais no TNF e TSC indicando uma potencial atividade antidepressiva para essa purina, sendo esse resultado reproduzido nesse trabalho. Esse efeito tipo-antidepressivo da inosina foi prevenido pelo pré-tratamento com antagonistas dos receptores  $A_1$  e  $A_{2A}$  para adenosina, o que está de acordo com uma série de dados na literatura que indicam que inosina pode agir como agonista dos receptores adenosinérgicos (KASTER *et al.*, 2013). Esses resultados corroboram outros trabalhos que demonstram que o tratamento crônico com inosina é capaz de prevenir o comportamento depressogênico e a diminuição da neurogênese hipocampal induzidos por um protocolo de ECI (MUTO *et al.*, 2014).

Existem poucos trabalhos na literatura relacionados aos aspectos farmacocinéticos de inosina. Alguns estudos indicam que inosina atravessa a barreira hemato-encefálica (BHE), além de serem descritos o envolvimento de alguns transportadores de nucleosídeos no transporte de inosina (denominados: ENT1, ENT2, ENT3 CNT2 e CNT3) (RACAGNI e POPOLI, 2008; PARKINSON *et al.*, 2011; MUTO *et al.*, 2014). Apesar de até o momento não estarem disponíveis dados referentes à biodisponibilidade ou ao efeito na concentração cerebral de inosina em diferentes compartimentos celulares após a sua administração i.p., já foi relatado um aumento nos níveis cerebrais de inosina após administração por via oral dessa purina (MUTO *et al.*, 2014), o que permite especular

que a inosina administrada periféricamente pode cruzar a BHE, e agir como neuromodulador no SNC.

Devido ao rápido metabolismo e possíveis efeitos parácrinos das purinas no SNC, é um grande desafio determinar o envolvimento dos metabólitos de inosina nos efeitos observados após sua administração *in vivo*. A inosina pode exercer um efeito neuroprotetor *in vivo* frente a isquemia cerebral, porém esses efeitos não foram mimetizados pela administração de hipoxantina, o que corrobora a hipótese de um efeito direto de inosina (SHEN *et al.*, 2005). A administração de forodesina (inibidor da enzima purina nucleosídeo fosforilase, que pode aumentar a concentração endógena de inosina), induziu um efeito antinociceptivo em camundongos, sendo este efeito inibido por DPCPX (antagonista dos receptores A<sub>1</sub>). Nesse sentido, o efeito antinociceptivo de inosina observado em camundongos também foi potencializado pela administração de forodesina (NASCIMENTO *et al.*, 2014). Por outro lado, a administração de um inibidor da enzima ADA, que pode diminuir a formação endógena de inosina e aumentar a quantidade de adenosina, foi capaz de induzir efeito tipo-antidepressivo em camundongos (KASTER *et al.*, 2013). Uma vez que inosina e adenosina competem pelo mesmos transportadores entre os espaços intracelular e extracelular, é possível que o aumento na concentração de inosina causado pela administração exógena dessa purina, aumente a concentração extracelular de adenosina através da competição pelo mesmo transportador, gerando efeitos que podem ocorrer devido aumento de adenosina. Resultados prévios indicaram que efeito tipo-antidepressivo de inosina perdurou por até 240 min (KASTER *et al.*, 2013), o que não nos permite descartar a hipótese da participação de alguns dos metabólitos de inosina nas alterações comportamentais observadas. Alguns estudos clínicos também sugerem que muitos dos efeitos atribuídos à inosina podem ser gerados pelo ácido úrico (produto final de seu metabolismo), sendo que já foram reportados níveis diminuídos de ácido úrico em pacientes deprimidos (WEN *et al.*, 2012). O ácido úrico é um composto reconhecido por suas propriedades antioxidantes, o que pode influenciar nos efeitos neuroprotetores de inosina no tratamento da doença de Parkinson (SCHWARZSCHILD *et al.*, 2013; BHATTACHARYA *et al.*, 2016). No entanto, os resultados desse trabalho demonstraram que o efeito tipo-antidepressivo da inosina envolve a modulação de mecanismos neuroquímicos que podem ser relacionados com a ativação de receptores de adenosina. Contudo, futuros estudos serão necessários para elucidar o papel dos metabólitos de inosina nos efeitos observados.

As MAPKs são enzimas de transdução de sinal envolvidas em vários processos celulares incluindo a regulação da expressão gênica em resposta a um estímulo extracelular, proliferação e sobrevivência celular além da modulação da resposta ao estresse físico e químico (CHANG e KARIN, 2001). Em modelos animais de depressão induzidos pela administração crônica de corticosterona ou ECI as alterações comportamentais associadas ao fenótipo depressivo estão acompanhadas com a redução da fosforilação de ERK 1/2 (GOURLEY *et al.*, 2008; LIU *et al.*, 2014). A inibição da cascata de MEK/ERK pode induzir um comportamento do tipo-depressivo, além de prevenir a ação de alguns antidepressivos como desipramina, sertalina e cetamina (DUMAN *et al.*, 2007; REUS *et al.*, 2014). Como demonstrado na figura 18 a administração de U0126 preveniu o efeito tipo-antidepressivo de inosina. U0126 é um potente inibidor de MEK1/2, por se ligar diretamente no sítio de catalítico da enzima, impedindo a atividade cinase da mesma. Dessa forma o bloqueio da atividade de MEK 1/2 impede a fosforilação e consequentemente a ativação de ERK 1/2 (FAVATA *et al.*, 1998). Nosso resultado indica uma relação entre a ativação de ERK e o comportamento tipo-antidepressivo induzido pela administração de inosina. Já foi demonstrado que inosina é capaz de estimular a fosforilação de ERK1/2 *in vitro*. Além disso, a administração dessa purina por via oral em camundongos aumentou a fosforilação da EKR 1/2 no hipocampo, sendo esses efeitos inibidos por antagonistas dos receptores  $A_1$  e  $A_{2A}$  (MUTO *et al.*, 2014). Adicionalmente, a atividade neuroprotetora da inosina *in vitro* também parece ser depende da ativação de ERK 1/2 (TOMASELLI *et al.*, 2005). Assim, nossos resultados corroboram dados na literatura que sugerem que a ativação da sinalização MEK/ERK está intimamente relacionada com os efeitos biológicos da inosina.

A CaMKII é uma proteína cinase amplamente expressa no SNC principalmente nos terminais pré-sinápticos e densidades pós-sinápticas, capaz de modular a resposta neuronal de diferentes maneiras (CELANO *et al.*, 2003; SHONESY *et al.*, 2014). A modulação de CaMKII está relacionada com vários eventos envolvendo a neuroplasticidade, além de possivelmente estar envolvida na fisiopatologia da depressão (DU *et al.*, 2004). O tratamento com antidepressivos estimula a fosforilação de CaMKII, além de inibidores dessa enzima prevenirem os efeitos de drogas antidepressivas (D'SA e DUMAN, 2002; TIRABOSCHI *et al.*, 2004). Os resultados mostrados na figura 19, indicam que o pré-tratamento com KN-62 aboliu completamente o efeito tipo-antidepressivo de inosina. Esses resultados estão de acordo com dados prévios na literatura que indicam que a ativação de receptores  $A_1$  pode levar a um aumento de

cálcio citoplasmático proveniente de reservas intracelulares, além de estar associado com a ativação de CaMKII (LIU e WONG, 2004; ETHIER e MADISON, 2006). Contudo, estudos adicionais serão necessários para verificar se a ativação de CaMKII por inosina é decorrente da ativação de receptores de adenosina, ou por algum outro mecanismo secundário.

O inibidor farmacológico KN-62 tem sido utilizado extensivamente como uma importante ferramenta no estudo do papel da ativação de CaMKII em vários estudos *in vitro* e *in vivo* (ZENI *et al.*, 2012; CUNHA *et al.*, 2014; MANOSSO *et al.*, 2015; QU *et al.*, 2015; PESARICO *et al.*, 2016; ZHAO *et al.*, 2016). O KN-62 compete pelo sítio  $\text{Ca}^{2+}$ -Calmodulina da enzima, inibindo tanto a fosforilação do substrato e a autofosforilação de CaMKII, com  $\text{IC}_{50}$  de 0,9  $\mu\text{M}$  (TOKUMITSU *et al.*, 1990). Contudo, é válido mencionar que o KN-62 também é capaz de bloquear receptores purinérgicos do tipo P2, especificamente receptores P2X7 (SANCHEZ-NOGUEIRO *et al.*, 2014). Porém, de acordo com evidências da literatura é improvável que inosina possa se ligar e ativar receptores purinérgicos do tipo P2, uma vez que esses receptores são ativados seletivamente por ATP ou ADP em menor extensão, mas não são ativados por AMP, adenosina ou outras purinas e pirimidinas (NORTH e JARVIS, 2013). Mesmo que alguma quantidade de ATP seja liberada em situações agudas de estresse, o possível bloqueio dos receptores P2X7 induzido por KN-62 na concentração utilizada não foi capaz de induzir nenhuma resposta comportamental nos animais. Dessa maneira, nossos resultados sugerem que o tratamento com inosina pode induzir uma ativação de CaMKII, e que essa ativação está relacionada com a ação antidepressiva dessa purina. Contudo, não é possível excluir a possibilidade do envolvimento da modulação indireta de receptores P2X7 por inosina no seu efeito tipo antidepressivo.

Nós também demonstramos que o tratamento com H-89, um inibidor seletivo de PKA preveniu a queda no tempo de imobilidade induzido pela inosina. Estes resultados corroboram resultados prévios da literatura que indicam que a inibição de PKA por H-89 foi capaz de prevenir o efeito antidepressivo de outros compostos com ação antidepressiva em modelos preditivos como fluoxetina, memantina, zinco e creatina. (OKADA *et al.*, 2001; ALMEIDA *et al.*, 2006; LIU *et al.*, 2012; CUNHA *et al.*, 2014; MANOSSO *et al.*, 2015). O mecanismo dessa modulação de PKA por inosina permanece incerto, considerando que o efeito antidepressivo dessa purina envolve a ativação dos receptores  $A_1$  e  $A_{2A}$  de adenosina, que exercem efeitos antagônicos sobre a ativação de PKA (KASTER *et al.*, 2013). Receptores  $A_1$  interagem com proteínas  $G_i$ , diminuindo a atividade de adenilato ciclase e a atividade de PKA. Por

outro lado, a ativação do receptor  $A_{2A}$  estimula, via proteína Gs, a atividade de adenilato ciclase, aumentando os níveis de AMPc e consequentemente ativando PKA (JACOBSON e GAO, 2006). Porém, esses receptores podem interagir de diferentes maneiras, levando a ativação de vias de sinalização não clássicas que podem ocorrer nessas condições (SHETH *et al.*, 2014). Dessa maneira, estudos adicionais serão necessários para verificar a modulação da atividade de PKA por inosina.

A ativação de receptores de adenosina pode levar à ativação de PI3K/AKT (CHENG *et al.*, 2010; NAYAK, PRENTICE e MILTON, 2010; UMAPATHY *et al.*, 2013), além de estudos *in vitro* sugerirem que inosina é capaz de aumentar a fosforilação de AKT (GAO *et al.*, 2001). A ativação de PI3K catalisa a formação de fosfatidil-inositol-3,4,5-trisfosfato na membrana celular levando a ativação de AKT, que pode estar associada a diferentes processos celulares como crescimento de neuritos, sobrevivência celular, plasticidade sináptica e resposta antidepressiva (BRAZIL e HEMMINGS, 2001; MARSDEN, 2012). Os resultados mostrados na figura 21 indicaram que o tratamento com wortmanina, um potente inibidor de PI3K preveniu o efeito anti-imobilidade de inosina, indicando que ativação de PI3K/AKT está envolvida no efeito tipo-antidepressivo dessa purina. A via de sinalização envolvendo PI3K/AKT, está associada com a modulação de outras enzimas de sinalização como a fosforilação com consequente inativação, no resíduo ser-9 de GSK-3 $\beta$  (DWIVEDI *et al.*, 2008). A inibição de GSK-3 $\beta$  por sua vez está relacionada com efeitos antidepressivos, uma vez que inibidores dessa enzima são capazes de aumentar o efeito de alguns antidepressivos (ROSA *et al.*, 2008; KAIDANOVICH-BEILIN *et al.*, 2012). Nossos resultados indicam um efeito sinérgico (figura 22) entre uma dose sub-ativa de inosina com uma sub-dose de um inibidor de GSK-3 $\beta$  (AR-A014418). Assim, estes achados podem fornecer indícios de que inosina pode ativar AKT, que por sua vez pode fosforilar e inativar GSK-3 $\beta$ , sendo esses efeitos associados a um comportamento tipo-antidepressivo.

A ativação de MEK/ERK, PI3K/AKT, CaMKII, PKA pode induzir a fosforilação de CREB no resíduo ser-133 o qual está intimamente associado com a ativação desse fator transcrição (SHAYWITZ e GREENBERG, 1999). Além disso, a inibição GSK-3 $\beta$  (via fosforilação em ser-9 mediada por Akt), pode reduzir o efeito inibitório de GSK-3 $\beta$  na atividade de CREB (JOPE, 2003; LI e JOPE, 2010; KAIDANOVICH-BEILIN *et al.*, 2012). Nossos resultados mostraram um aumento na fosforilação de CREB no hipocampo 24 horas após o tratamento com inosina. Este resultado corrobora dados da

literatura que indicam o aumento na expressão de BDNF e proliferação celular no hipocampo estimulada pela administração de inosina (MUTO *et al.*, 2014). O hipocampo é uma das principais regiões envolvidas na regulação do humor, sendo associado às alterações neuroquímicas observadas em resposta ao estresse e ao tratamento farmacológico para depressão. A fosforilação de CREB em ser-133 leva à transcrição de diferentes genes associados à neuroplasticidade, incluindo de neurotrofinas como BDNF (AUTRY e MONTEGGIA, 2012) O padrão temporal de aumento da fosforilação de CREB induzido por inosina foi similar ao padrão observado para a expressão de BDNF após o tratamento com (2R,6R)-Hidroxinorcetamina (HNK), um composto derivado do metabolismo de cetamina e capaz de exercer um efeito antidepressivo rápido (ZANOS *et al.*, 2016). Assim, de maneira conjunta os resultados deste trabalho indicam que a administração de inosina pode modular uma complexa sinalização intracelular que converge para a fosforilação de CREB e consequente ativação deste fator de transcrição.

Devido à relação entre o sistema purinérgico e glutamatérgico, um dos objetivos deste trabalho foi verificar se o envolvimento dos receptores NMDA no efeito tipo antidepressivo de inosina. Vários trabalhos na literatura relacionam disfunções na neurotransmissão glutamatérgica, especialmente envolvendo o receptor NMDA, e a depressão (REUS *et al.*, 2016). Os resultados deste trabalho apresentam algumas evidências do envolvimento da inibição de NMDAR no efeito tipo-antidepressivo da inosina no TSC. A administração do agonista de NMDAR, NMDA (figura 24A) ou do co-agonista D-serina (figura 24C), preveniram a queda no tempo de imobilidade induzido por inosina. A formação de D-serina ocorre através em uma reação de isomerização catalisada pela enzima serina racemase, que converte L-serina em D-serina, sendo que a ligação desse co-agonista está intimamente relacionada com a ativação de NMDAR. Vários processos de neurodegeneração mediados pela hiperatividade dos receptores NMDA, como a doença de Alzheimer e esclerose lateral amiotrófica, são acompanhados pelo aumento nos níveis de D-serina. Já a inibição da enzima serina racemase pode ter efeitos neuroprotetores contra danos excitotóxicos, convulsão e isquemia, indicando dessa forma a relação entre D-serina e ativação NMDA (SASABE *et al.*, 2007; WU, BASILE e BARGER, 2007).

Uma segunda linha de evidências da inibição dos receptores NMDA nos efeitos de inosina é que a administração de dose sub-ativas de antagonistas NMDA como cetamina (figura 25A) e MK-801 (figura 25C) são capazes de potencializar o efeito tipo-antidepressivo de sub-

doses de inosina. Dessa maneira, o sinergismo na ação antidepressiva entre esses antagonistas glutamatérgicos e inosina, fornecem evidências adicionais do envolvimento da inibição de NMDAR no efeito tipo-antidepressivo de inosina.

Esse possível efeito inibitório de inosina em NMDAR corrobora os dados da literatura relacionados a possível modulação do sistema glutamatérgico por essa purina, uma vez que foi demonstrado que inosina pode diminuir respostas eletrofisiológicas pós-sinápticas induzidas por glutamato (SHEN *et al.*, 2005), além dessa purina ser capaz de prevenir convulsões induzidas por ácido quinolínico, um agonista NMDAR (GANZELLA *et al.*, 2011). Neste sentido, existem algumas evidências na literatura relacionadas ao papel anticonvulsivante de inosina (KOVACS *et al.*, 2014; KOVACS *et al.*, 2015). Inosina pode se ligar com receptores GABA, sendo que este efeito pode estar relacionado a atividade anticonvulsivante dessa purina (YAROM *et al.*, 1998; KOVACS *et al.*, 2014). Dessa maneira, estudos adicionais serão necessários para investigar o papel de receptores GABA no efeito tipo-antidepressivo de inosina.

Um número crescente de evidências tem relacionado à disfunção glutamatérgica acompanhada de hiperativação dos receptores NMDA com transtornos de humor incluindo a depressão. Análises pós-morte do cérebro de pacientes diagnosticados com depressão revelou uma diminuição na expressão de transportadores astrocitários, o que pode levar ao acúmulo de glutamato no espaço extracelular (MIGUEL-HIDALGO *et al.*, 2010; BERNARD *et al.*, 2011). Em modelos animais de depressão, também ocorre um aumento na liberação de glutamato no hipocampo (SANACORA *et al.*, 2008). Estes achados sugerem que um aumento na função glutamatérgica pode estar associado aos distúrbios na homeostasia cerebral e processos patológicos encontrados nessa doença (SKOLNICK, 1999). A hiperativação dos receptores NMDA também está associada a um aumento exacerbado nos níveis intracelulares de  $Ca^{2+}$ , que desencadeia uma série de fenômenos que levam à morte celular, incluindo: ativação de lipases e proteases citoplasmáticas, despolarização da membrana mitocondrial (DESSI, BEN-ARI e CHARRIAUT-MARLANGUE, 1993), inibição da síntese de ATP e aumento da formação de radicais livres (NICHOLLS, 1985; DYKENS, 1994; GUNTER *et al.*, 1994; BINDOKAS *et al.*, 1996). Portanto, a modulação do receptor NMDA por inosina torna-se extremamente importante, tanto no contexto dos mecanismos associados ao efeito tipo-antidepressivo, mas também em outras neuropatologias que envolvem a hiperativação de NMDAR



Considerando que inosina é capaz de se ligar e ativar receptores de adenosina (SHEN *et al.*, 2005; KASTER *et al.*, 2013; NASCIMENTO *et al.*, 2014; WELIHINDA *et al.*, 2016), e que esses receptores podem modular NMDAR, pode ser especulado que o efeito inibitório de inosina em NMDAR ocorra por um mecanismo dependente da ativação de receptores de adenosina. Os receptores A<sub>1</sub> são capazes de diminuir a liberação pré- ou pós-sináptica de glutamato, além de hiperpolarizar o neurônio pós-sináptico inibindo NMDAR. Por outro lado, os receptores A<sub>2A</sub> podem interferir na neurotransmissão glutamatérgica de diferentes maneiras. Apesar desses receptores estimularem a liberação de glutamato, existem trabalhos na literatura indicando que a ativação de A<sub>2A</sub> está associada a inibição de correntes dependentes de NMDAR em neurônios estriatais (GEREVICH, WIRKNER e ILLES, 2002). Entretanto, esses efeitos de inosina parecem não estar relacionados a mudanças na expressão desses receptores, uma vez que o tratamento com essa purina não alterou a expressão dos receptores A<sub>1</sub> e A<sub>2A</sub> no CPF e hipocampo desses animais (figuras 30 e 31). Adicionalmente, não pode ser descartada a possibilidade de uma interação direta entre inosina e receptores NMDA. Apesar de os resultados deste trabalho indicarem que inosina pode inibir NMDAR, os mecanismos dessa inibição ainda são desconhecidos, e futuros estudos são necessários para elucidar esses eventos.

Como demonstrado na figura 25A, a administração de inosina juntamente com cetamina promoveu um efeito tipo antidepressivo sinérgico, sugerindo que esses dois compostos possam ter mecanismos de ação semelhantes. Os mecanismos envolvidos no efeito antidepressivo rápido de cetamina vão além da sua atividade inibitória sobre NMDAR, mas envolvem um mecanismo complexo, que inclui a ativação de receptores AMPA, promovendo uma despolarização rápida e transitória da célula e proporcionando a liberação de neurotrofinas como BDNF (LI *et al.*, 2010; DUMAN e VOLETI, 2012). Neste trabalho foi utilizado DNQX, um antagonista seletivo de AMPAR que foi capaz de bloquear o efeito tipo-antidepressivo de cetamina no TSC (CUNHA *et al.*, 2015b). Porém o efeito tipo-antidepressivo de inosina, parece não envolver a ativação dos receptores AMPA. O pré-tratamento dos animais com DNQX não impediu a redução no tempo de imobilidade induzido por inosina (figura 26). Este resultado sugere que os mecanismos envolvendo o efeito tipo antidepressivo de inosina pode não envolver a ativação de AMPAR.

Outro ponto chave no efeito antidepressivo rápido da cetamina, está associado a ativação de mTOR. Análises pós-morte de pacientes

diagnosticados com depressão indicaram uma diminuição de mTOR no CPF de pacientes diagnosticados com essa doença (JERNIGAN *et al.*, 2011), bem como um aumento na fosforilação de mTOR em células mononucleares do sangue periférico após o tratamento com cetamina (DENK *et al.*, 2011). A rapamicina, um inibidor seletivo de mTORC1, bloqueia a ação antidepressiva e o estímulo da síntese de proteínas sinápticas induzidos por cetamina (LI *et al.*, 2010; DUMAN e VOLETI, 2012). Neste sentido, já foi também demonstrado que a administração de rapamicina aboliu o efeito tipo antidepressivo de compostos como a guanosina, ácido ascorbico, agmatina e creatina (BETTIO *et al.*, 2012; MORETTI *et al.*, 2013; CUNHA *et al.*, 2015a; NEIS *et al.*, 2016a). A administração de rapamicina preveniu o efeito tipo-antidepressivo de inosina, indicando que esta purina pode ativar mTOR (figura 27). Esse resultado corrobora um recente trabalho que demonstrou a ativação de mTOR após o tratamento com um agonista de receptores A<sub>1</sub> *in vivo* (CHENG *et al.*, 2016). A ativação de mTOR estimula a fosforilação e ativação de P70S6 cinase além da repressão de 4E-BP, resultando na regulação da tradução de proteínas sinápticas. Essa estimulação da síntese proteica por mTOR, eleva os níveis de proteínas associadas ao funcionamento sináptico como a sinapsina, PSD95 e GluA1, levando ao aumento no número de espinhas dendríticas e ao efeito antidepressivo (LI *et al.*, 2010; DUMAN e VOLETI, 2012). Contudo, nos tempos analisados neste trabalho (30 e minutos 24 horas após a administração de inosina), não foram encontradas diferenças significativas no imunoconteúdo dessas proteínas sinápticas (figuras 29 e 30). Alguns trabalhos na literatura com compostos antidepressivos que ativam mTOR, demonstraram aumento na expressão de proteínas sinápticas 60 minutos após a administração desses compostos (MORETTI *et al.*, 2013; CUNHA *et al.*, 2015a), enquanto outros trabalhos indicam esse efeito ocorre 120 minutos após a administração de cetamina (LI *et al.*, 2010). Dessa forma, o possível aumento de proteínas sinápticas induzido por inosina possa ser detectado em tempos que não foram analisados nesse trabalho. Além disso, as análises bioquímicas foram realizadas por *Western blotting*, que não permite diferenciar os efeitos bioquímicos em diferentes regiões ou populações celulares nas amostras de hipocampo e CPF. Adicionalmente, alguns dos estudos que demonstram o aumento de proteínas sinápticas pela administração de cetamina, utilizam amostras preparadas como sinaptossomas (LI *et al.*, 2010), o que permite concentrar essas proteínas e aumentar a sensibilidade da técnica de *Western-blotting*. Dessa maneira, estudos adicionais com diferentes metodologias são necessários para investigar o envolvimento da síntese de proteínas sinápticas por inosina.

Contudo, a reversão do efeito tipo-antidepressivo de inosina por rapamicina fornece um indício da participação de mTORC1 nesses efeitos promovidos pela administração desse nucleosídeo.

Como já mencionado, a capacidade de cetamina estimular a ativação de mTOR e promover o seu efeito antidepressivo, pode envolver a ativação de receptores AMPA e liberação de vesículas contendo BDNF. O BDNF por sua vez poderia se ligar e ativar seus receptores do tipo TrkB e desencadear uma sinalização celular que irá culminar com a fosforilação e ativação de mTOR. (LI *et al.*, 2010). Contudo, outros compostos como ação antidepressiva também podem ativar mTOR e exercer efeito rápido mas de maneira independente do receptor AMPA. Neste sentido, já foi demonstrado um efeito sinérgico entre creatina e inosina (CUNHA *et al.*, 2015c), o que permite especular que existam algumas similaridades entre os mecanismos de ação entre os compostos. A ação antidepressiva de creatina também envolve a ativação de mTORC1 e inibição de receptores NMDA de maneira análoga a cetamina, mas sem ativar os receptores AMPA (CUNHA *et al.*, 2015b; CUNHA *et al.*, 2015c). Recentemente foi demonstrado que ação antidepressiva tanto de creatina quando cetamina envolve a ativação dos receptores A<sub>1</sub> e A<sub>2A</sub>. (CUNHA *et al.*, 2015c). Uma vez que o efeito tipo-antidepressivo de inosina envolve a ativação de receptores adenosinérgicos (KASTER *et al.*, 2013) e modulação vias de sinalização *upstream* a mTORC1 como a ativação AKT (figura 22) e ERK (figura 19), e inibição de GSK-3 $\beta$  (figura 23), pode ser especulado que ativação de receptores de adenosina por inosina pode modular uma sinalização intracelular associada a ativação AKT, ERK e inibição de GSK-3 $\beta$ , que pode levar a fosforilação e ativação de mTOR.

Por fim, os resultados desse capítulo forneceram evidências bioquímicas e farmacológicas a respeito dos mecanismos envolvidos no efeito tipo-antidepressivo de inosina. Foi possível determinar de maneira inédita que o efeito tipo antidepressivo dessa purina envolveu a ativação de PKA, CaMKII, PI3K/Akt, MEK/ERK, mTORC1 e inibição de GSK-3 $\beta$  e NMDAR. A administração aguda de uma única dose de inosina também foi capaz de aumentar a fosforilação de CREB, de maneira análoga a expressão de BDNF por compostos que exercem efeito antidepressivo rápido (ZANOS *et al.*, 2016). Apesar de os resultados aqui apresentados não permitirem afirmar que inosina exerce um efeito antidepressivo rápido, foi possível demonstrar algumas similaridades entre os mecanismos envolvendo o efeito antidepressivo de inosina e cetamina, o que representa uma importante perspectiva terapêutica. Nossos resultados juntamente com dados prévios da literatura indicam

que a modulação do sistema purinérgico por inosina pode ser útil no tratamento da depressão, além de reforçar o papel dessa purina e do sistema purinérgico na etiologia de transtornos psiquiátricos como a depressão.

**5 Capítulo 2 – Efeito protetor de inosina contra o dano celular induzido pela exposição ao MeHg em cultura primária de astrócitos.**

## 5.1 Introdução

### 5.1.1 Mercúrio e MeHg: aspectos gerais

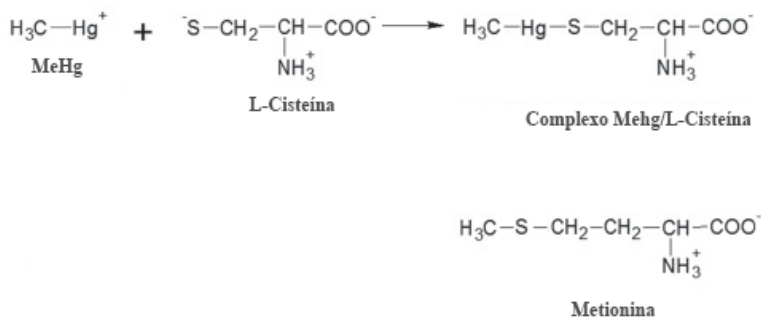
A contaminação ambiental por metais é um fator de risco para a saúde pública e o SNC é um importante alvo para a ação destes agentes tóxicos. A exposição humana aos metais pode ocorrer através de água, solo, ar ou alimentos contaminados (GULSON *et al.*, 2006; WEISS, 2011). Atualmente têm sido apontados diversos compostos com propriedades neurotóxicas que podem prejudicar o funcionamento e o desenvolvimento do SNC incluindo solventes, pesticidas e metais (GRANDJEAN e LANDRIGAN, 2014), dentre os quais podemos destacar o mercúrio (RICE *et al.*, 2014).

O mercúrio está presente na natureza em três formas químicas distintas: o mercúrio elementar ( $Hg^0$ ), na forma iônica ( $Hg^{1+}$ ,  $Hg^{2+}$ ) formando sais inorgânicos, e na forma de compostos orgânicos como MeHg, sendo este a forma de mercúrio com maior potencial tóxico para os seres humanos. A presença de mercúrio no meio ambiente pode ser decorrente de eventos naturais, como erupção vulcânica e evaporação da superfície terrestre, além das fontes antropogênicas como emissão industrial, incineração de resíduos urbanos, extração de ouro, entre outros (MYERS *et al.*, 1997; CLARKSON, 2002).

A formação de compostos orgânicos de mercúrio ocorre em bactérias presentes no ambiente aquático que transformam esse metal em sua forma inorgânica em compostos orgânicos como o MeHg, que por sua vez sofre um processo de biomagnificação (tendência de o metal se acumular em organismos vivos de níveis tróficos mais elevados dentro da cadeia alimentar). Dessa forma o MeHg se acumula principalmente em peixes, mas também em outros frutos do mar, sendo a ingestão destes a principal fonte de exposição do homem ao MeHg (CLARKSON, 2002; RODRIGUEZ MARTIN-DOIMEADIOS *et al.*, 2014). No Brasil, as comunidades ribeirinhas da Bacia Amazônica apresentam grande potencial de intoxicação por mercúrio, uma vez que desde a década de 80 este metal tem sido usado nos processos de extração de ouro. Tais comunidades apresentam uma dieta rica em pescados que contém grande quantidade de MeHg (BERZAS NEVADO *et al.*, 2010). Tais indivíduos apresentam alto teor desse composto em seus organismos, além de apresentar déficits neurológicos que podem ser decorrentes da exposição a este toxicante (DOLBEC *et al.*, 2000).

### 5.1.2 Absorção e distribuição

O MeHg é facilmente absorvido no trato gastrointestinal (cerca de 90% – 95%) (NIELSEN e ANDERSEN, 1992), e pode se depositar em diferentes órgãos, como cérebro, intestino, fígado e rins, sendo o SNC o alvo principal da ação do MeHg (CLARKSON, VYAS e BALLATORI, 2007). Após a absorção pelo trato gastro-intestinal, o MeHg é transportado da circulação sanguínea para o SNC principalmente através sistema transportador de aminoácidos neutros do tipo 1 (LAT). Devido a alta afinidade deste composto por grupamentos tióis, o MeHg pode se ligar ao aminoácido L-cisteína, formando um complexo MeHg/L-cisteína. Como poder ser verificado na figura 32, o complexo MeHg/L-cisteína apresenta uma estrutura química análoga a metionina, um ligante fisiológico para os transportadores do tipo LAT. Dessa maneira, o complexo MeHg/L-cisteína passa a ser reconhecido pelo transportador LAT, permitindo o transporte desse toxicante (KERPER, BALLATORI e CLARKSON, 1992; CLARKSON, 1993; YIN *et al.*, 2008).



**Figura 32. Estruturas químicas do metilmercúrio (MeHg) cisteína, complexo L-cisteína / metilmercúrio e metionina** (Adaptado de Clarkson, 1993).

Cerca de 10% do MeHg absorvido pelo trato gastrointestinal se acumula no cérebro, o que faz do SNC um dos alvos mais sensíveis a efeitos desse toxicante e um dos principais alvos nos estudos relacionados a intoxicação por MeHg (SKERFVING, 1974; CLARKSON, 2002). O MeHg pode atravessar a placenta, e se depositar no SNC em desenvolvimento, sendo que nessas situações a concentração desse toxicante pode ser maior no cérebro do feto do que a concentração sérica materna. (INOUE, KAJIWARA e HIRAYAMA, 1986; CERNICHIARI *et al.*, 2007). Adicionalmente, o MeHg pode ser excretado pelo leite materno, fornecendo outra fonte de exposição para esse metal durante o desenvolvimento do SNC.

### 5.1.3 Efeitos decorrentes da exposição ao MeHg

Durante a década de 1950 e no final da década de 1960 dois desastres envolvendo contaminação por MeHg ocorreram no Japão nas regiões de Minamata e Nigata. De acordo com algumas estimativas, ocorreram 2263 casos de intoxicação por MeHg na região da baía de Minamata e 690 casos na região de Nigata. Em ambos os casos, a população foi intoxicada por MeHg presente em peixes e frutos do mar previamente expostos a mercúrio presente em dejetos industriais. Na década de 1970 outra grande intoxicação por MeHg ocorreu no Iraque, quando sementes contaminadas por esse toxicante (em decorrência do uso de MeHg na agricultura) foram utilizadas pela população principalmente na fabricação de pães (CASTOLDI *et al.*, 2001; CECCATELLI, DARE e MOORS, 2010).

Na região de Minamata, os efeitos dessa intoxicação foram visualizados principalmente nas famílias de pescadores. Estes pacientes apresentavam diversos danos neurológicos, que em conjunto passaram a ser denominados como doença de Minamata. Dentre os sintomas frequentemente associados a essa síndrome, pode-se destacar: parastesia nas extremidades das mãos e pés; ataxia; constrição concêntrica bilateral do campo de visão; danos auditivos e de fala; tremores; movimentos anormais na região dos olhos; desordens mentais e perda sensorial (paladar e odor). Nos casos mais severos de intoxicação os pacientes evoluíram para óbito. As alterações histopatológicas relacionadas a essas intoxicações por MeHg eram normalmente associadas ao sistema nervoso nas regiões do córtex cerebral e cerebelo, além dos nervos sensoriais periféricos. Nos pacientes que faleceram em decorrência da intoxicação, foi observada uma grande perda neuronal e gliose, danos vasculares e edema no córtex cerebral, além de perda de neurônios granulares do cerebelo. Os achados patológicos presentes no córtex visual e cerebelo podem estar correlacionados com os sintomas clínicos observados nesses pacientes como a ataxia e danos visuais (CASTOLDI *et al.*, 2001; EKINO *et al.*, 2007; CECCATELLI, DARE e MOORS, 2010).

O desastre na região de Minamata também evidenciou pela primeira vez a vulnerabilidade do SNC em desenvolvimento à neurotoxicidade do MeHg. A exposição ao MeHg em níveis que não causaram alterações em adultos foi capaz de causar diversas alterações relacionadas ao neurodesenvolvimento como: prejuízo no crescimento, deformidades nos membros superiores e inferiores, ataxia e retardo mental. Os danos relacionados ao prejuízo motor normalmente



melhoravam com o desenvolvimento da criança, enquanto o dano cognitivo persistiu até a fase adulta. A alta prevalência de retardo mental (29%) em crianças que nasceram durante os anos de 1955-1959 na região de Minamata, indica que muitos casos de intoxicação por MeHg na infância não foram diagnosticados. (MATSUMOTO, KOYA e TAKEUCHI, 1965; HARADA *et al.*, 1968; HARADA, 1995; CECCATELLI, DARE e MOORS, 2010). Estudos epidemiológicos recentes referentes à população da baía de Minamata indicaram um aumento da incidência de transtornos psiquiátricos em adultos de diferentes idades que não apresentaram sintomas da intoxicação por MeHg após o nascimento (YORIFUJI *et al.*, 2011). Enquanto a exposição durante a fase adulta ocasiona lesões e danos mais específicos, a exposição durante o período de desenvolvimento do SNC causa alterações histopatológicas mais difusas e generalizadas no córtex cerebral e cerebelo (CASTOLDI *et al.*, 2001).

As alterações comportamentais observadas em animais expostos a MeHg podem fornecer informações importantes para o entendimento dos efeitos decorrentes da exposição a esse toxicante. Durante o desastre de Minamata em 1950 foi observado que diversos gatos que tinham uma dieta baseada em peixes (que estavam contaminados com MeHg) apresentaram graves distúrbios do movimento, convulsões ou morriam em decorrência da exposição ao MeHg (KITAMURA, 1971; FARINA, ROCHA e ASCHNER, 2011). Diversos estudos experimentais têm demonstrado que animais de laboratório expostos ao MeHg apresentaram alterações comportamentais análogas aos efeitos observados em humanos, como danos motores, ataxia e perda de equilíbrio (DIETRICH *et al.*, 2005; FARINA, ROCHA e ASCHNER, 2011; BISEN-HERSH *et al.*, 2014). Adicionalmente foi demonstrado que a exposição pré-natal e perinatal ao MeHg pode induzir um comportamento pró-depressivo em camundongos durante a fase adulta, sendo que o tratamento com fluoxetina preveniu esses efeitos. Estes animais também apresentaram uma diminuição no RNAm para BDNF no giro denteado do hipocampo. Essas alterações podem estar ligadas a modificações epigenéticas na estrutura da cromatina do gene para BDNF. A exposição ao MeHg causou uma hipermetilação na região promotora do gene para BDNF e uma diminuição na acetilação para o promotor IV de BDNF. O tratamento com fluoxetina também foi capaz de restaurar os níveis de BDNF nos animais expostos ao MeHg e aumentar a acetilação de H3 do promotor IV (ONISHCHENKO *et al.*, 2008).

#### 5.1.4 Mecanismos Moleculares da toxicidade do MeHg

As principais alterações moleculares envolvidas na neurotoxicidade induzida pelo MeHg são: 1) aumento nas concentrações de  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular, 2) produção de espécies reativas de oxigênio (ERO), 3) aumento da concentração de glutamato extracelular, através da inibição da captação deste neurotransmissor pelos astrócitos (ASCHNER *et al.*, 2007; FARINA, ROCHA e ASCHNER, 2011).

MeHg é um potente indutor de estresse oxidativo através da geração ERO. Os níveis de peróxido de hidrogênio e óxido nítrico também são aumentados após a exposição *in vitro* ao MeHg, tanto em astrócitos quanto em neurônios (SHANKER *et al.*, 2004; FARINA, ASCHNER e ROCHA, 2011). Os principais mecanismos envolvidos na geração de ERO induzidos por MeHg envolvem a inibição de complexos da cadeia transportadora de elétrons mitocondrial, alterações na função de enzimas antioxidantes e atividade da enzima óxido nítrico sintase (IKEDA *et al.*, 1999; HERCULANO *et al.*, 2006; CARVALHO *et al.*, 2008; GLASER *et al.*, 2010a; GLASER *et al.*, 2010b; GLASER *et al.*, 2014). As alterações intracelulares causadas pelo MeHg se devem em parte a sua alta capacidade eletrofílica, causando a sua ligação de forma covalente a grupamentos tióis e/ou selenóis presentes em proteínas, ou compostos não proteicos como a glutationa (GSH), e em enzimas como glutationa peroxidase (GPx) e tioredoxina (ROCHA *et al.*, 1993; GLASER *et al.*, 2010a; FARINA, ROCHA e ASCHNER, 2011). Também é conhecido que MeHg afeta a proteína de choque térmico de 90 kDa (Hsp90), um importante regulador do estado redox celular (CAPLAN, 1999; CAITO *et al.*, 2014). Assim, ocorre diminuição das defesas antioxidantes das células e aumento da geração de ERO, levando ao estresse oxidativo, que tem sido considerado um dos principais fatores envolvidos nos mecanismos da toxicidade do MeHg (HALLIWELL, 2009; FARINA, ROCHA e ASCHNER, 2011; JIMENEZ-DEL-RIO e VELEZ-PARDO, 2012).

Vários estudos sugerem que dentro do SNC o MeHg deposita-se principalmente nos astrócitos (GARMAN, WEISS e EVANS, 1975; ASCHNER, 1996; CHARLESTON *et al.*, 1996). Os astrócitos são as células mais abundantes no SNC, e são caracterizados pela expressão da proteína glial fibrilar ácida (GFAP) (GEE e KELLER, 2005). Inicialmente foi atribuído a essas células unicamente uma função de suporte metabólico por sua capacidade de estocar glicogênio e fornecer lactato para os neurônios, além de promover o equilíbrio dos íons extracelulares (PEREA e ARAQUE, 2005; VOLTERRA e

MELDOLESI, 2005). Contudo, atualmente reconhece-se que estas células podem participar de diferentes processos, como por exemplo: desenvolvimento do SNC, metabolismo de neurotransmissores e transmissão sináptica. Durante o desenvolvimento do SNC, os astrócitos participam da formação das sinapses através da síntese de proteínas de matriz celular e produção de fatores neurotróficos. Essas células também participam da formação da BHE, da síntese de glutatona e da captação de neurotransmissores como glutamato e GABA (Shih et al., 2006; Wang & Bordey, 2008). A exposição de astrócitos ao MeHg (GARMAN, WEISS e EVANS, 1975; ASCHNER, 1996; CHARLESTON *et al.*, 1996), provoca a inibição da captação de glutamato, cistina e cisteína diminuindo os níveis de glutatona (GSH) e alterando o estado redox destas células (BROOKES e KRISTT, 1989; ALLEN, SHANKER e ASCHNER, 2001; SHANKER e ASCHNER, 2001; SHANKER, SYVERSEN e ASCHNER, 2003). O aumento de glutamato extracelular causa a ativação excessiva de receptores NMDA e conseqüentemente aumentando o influxo de íons  $\text{Na}^+$  e  $\text{Ca}^{2+}$  nos neurônios, o que está associado na geração de estresse oxidativo e neurotoxicidade (MELDRUM, 2000; ASCHNER *et al.*, 2007; CECCATELLI, DARE e MOORS, 2010; FEATHERSTONE, 2010)

### 5.1.5 Tratamento da intoxicação

Atualmente não existem terapias eficazes contra a intoxicação por MeHg. O uso de agentes quelantes e nucleofílicos com grupamentos tióis, como ácido meso-2,3-dimercaptosuccínico (DMSA) e o 2,3-dimercapto-1-propanosulfonato (DMPS), têm sido uma estratégia utilizada para diminuir os níveis de metal no organismo (RISHER e AMLER, 2005; RUSH, HJELMHAUG e LOBNER, 2009). A administração de N-acetilcisteína (NAC), um antioxidante com grupamento tiol e precursor de GSH também é utilizada para minimizar os danos oxidativos causados pela intoxicação pelo metal (MOLDEUS, COTGREAVE e BERGGREN, 1986; ARUOMA *et al.*, 1989).

Uma vez que existe uma evidente relação entre dano oxidativo e os efeitos decorrentes da exposição ao MeHg, compostos que aumentam a resposta antioxidante celular podem ser uma importante estratégia de neuroproteção nessas situações. Alguns trabalhos sugerem que a ativação do fator de transcrição Nrf2 (*Nuclear factor erythroid-2-related fator 2*) pode proteger a morte celular induzida por MeHg. A super-expressão de Nrf2 protegeu contra as alterações causadas pela exposição ao MeHg em embriões de *Drosophila melanogaster* (RAND, DAO e CLASON, 2009).

Hepatócitos derivados de animais *knockout* para Nrf2 apresentaram maior sensibilidade ao MeHg (TOYAMA *et al.*, 2007; KUMAGAI *et al.*, 2013). Por outro lado, o aumento do estresse oxidativo pode induzir a ativação do fator de transcrição Nrf2, e aumento da transcrição de fatores neuroprotetores e enzimas antioxidantes, possivelmente como resposta celular na tentativa de diminuir o dano celular induzido por este toxicante (KUMAGAI *et al.*, 2013).

Nrf2 é um fator de transcrição que induz a expressão de uma variedade de genes relacionados a detoxificação celular e defesas antioxidantes (CALKINS *et al.*, 2009). Nrf2 se encontra na sua forma inativa quando à proteína repressora Keap1 (*Kelch-like-ECH-associated protein 1*), sendo que a ligação com Keap-1 também promove sua ubiquitinação e consequente degradação proteossomal. Adicionalmente, uma complexa modulação intracelular envolvendo a regulação de algumas tirosinas cinases, e outras enzimas de sinalização celular como PKC e ERK pode ocorrer, regulando a dissociação de Keap1 e posterior translocação nuclear de Nrf2 (BRYAN *et al.*, 2013). Adicionalmente, a ativação da sinalização envolvido PI3K/AKT também pode estar envolvida com a ativação de Nrf2 (DE OLIVEIRA *et al.*, 2015). No núcleo, o Nrf2 se liga ao ARE (elemento de resposta antioxidante), estimulando a transcrição de diferentes genes como HO-1 (heme-oxigenase 1), NAD(P)H: quinona oxidoreductase 1 (NQO-1), catalase, superóxido dismutase (SOD), entre outras (CALKINS *et al.*, 2009; KASPAR, NITURE e JAISWAL, 2009; NITURE, KHATRI e JAISWAL, 2014).

É de extrema importância a busca e o desenvolvimento de novas estratégias farmacológicas que possam auxiliar na prevenção e no tratamento dos efeitos desencadeados pela exposição ao MeHg. Dessa maneira, foi buscado avaliar o efeito neuroprotetor de um composto endógeno, a inosina, frente à neurotoxicidade induzida pelo MeHg, focando no seu papel na modulação do sistema purinérgico e da sinalização intracelular.

## 5.2 Objetivos específicos

Os objetivos específicos referentes a esse capítulo estão listados a seguir:

- Verificar o potencial neuroprotetor de inosina contra a neurotoxicidade induzida por MeHg em cultura primária de astrócitos;
- Avaliar a possível modulação do fator de transcrição Nrf2 por inosina;
- Verificar a possível ativação de AKT e ERK 1/2 por inosina *in vitro* e verificar a relação dessa ativação com os efeitos neuroprotetores dessa purina contra a morte celular induzida por MeHg;
- Verificar o envolvimento dos receptores de adenosina A<sub>1</sub>, A<sub>2A</sub> e A<sub>3</sub> no efeito protetor dessa purina contra a morte celular induzida por MeHg;
- Verificar se inosina pode modular a expressão do RNAm para BDNF *in vitro*;

## 5.3 Metodologia

### 5.3.1 Animais

Ratas Sprague-Dawley grávidas foram adquiridas dos laboratórios Charles River e acomodados no biotério setorial pertencente ao *Albert Einstein College of Medicine*, mantidos a 21°C ±1 com livre acesso a água e comida, em ciclo claro/escuro 12:12 h (7:00-19:00 h). Todos os procedimentos realizados foram aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais da instituição (número de protocolo: 20160606) e todos os esforços foram feitos para minimizar o sofrimento dos animais.

### 5.3.2 Cultura Primária de Astrócitos e Tratamento com MeHg

As culturas foram preparadas de acordo com métodos previamente descritos na literatura (YIN *et al.*, 2007; YIN *et al.*, 2011). Resumidamente, ratos Sprague-Dawley de 1-3 dias de idade foram mortos por decapitação, o encéfalo foi removido e transferido para uma solução contendo meio S-MEM (Thermo Fischer, #11380037) com 1% de antibiótico e antimicótico (Thermo Fischer, #15140122) onde as meninges foram cuidadosamente removidas e o córtex cerebral foi dissecado. Os córtices cerebrais foram transferidos para um béquer estéril contendo 12 mL de meio de dissociação [Composto por MEM (Thermo Fischer, #15140122), Dispase 1,6 mg/ml (Thermo Fischer, #17105-41), DNase 70 U/ml (Sigma Aldrich, #D5025), antibiótico e antimicótico 1%], e o tecido dissociado mecanicamente com o auxílio de uma pipeta de vidro (aspirado e dispensado por 7x). As células foram extraídas através de um protocolo de “multi-extração” que consistiu em submeter a solução contendo meio de dissociação e os tecidos cerebrais a agitação mecânica com auxílio de uma barra magnética a baixa rotação por 10 min. Após esse período, a solução foi deixada em repouso por aproximadamente 2 min para decantar tecidos não dissociados, e o sobrenadante contendo apenas as células dissociadas foi coletado. Foi adicionado ao béquer contendo os tecidos restantes 10 ml de meio de dissociação e o processo foi repetido aproximadamente 5-6 vezes, visando eliminar qualquer tecido não dissociado. Após as extrações, a solução contendo as células dissociadas foi centrifugada (10 000 x g, 4°C, 10 minutos) e o pellet celular foi ressuscitado em meio de cultivo [MEM (Thermo Fischer, #1109598) contendo antibiótico e antimicótico 1% e soro de cavalo 10% (Thermo Fischer, #16050-122)]. O número de células viáveis foi determinado através da coloração com azul de tripan, as

células foram plaqueadas numa densidade de 10 000 células /cm<sup>2</sup> e incubadas a 37° C em atmosfera com 5% de CO<sub>2</sub>. 24 horas após o plaqueamento, o meio de cultura foi trocado para evitar o crescimento de outros tipos celulares. As células atingiam a confluência em aproximadamente 15 dias, sendo que neste período o meio de cultura foi trocado em intervalos de 3-4 dias. Com esse protocolo foi possível obter uma cultura com aproximadamente 95% das células apresentando marcação positiva para GFAP.

Para realização dos tratamentos com MeHg (Sigma-Aldrich), durante os períodos de exposição a esse metal, as células foram incubadas em meio de cultura com soro reduzido [MEM livre de vermelho de fenol (Thermo Fischer, #51200038, antibiótico/antimicótico 1% e soro de cavalo 1% e glutamina 1% (Thermo Fischer #25030-081) ]. Todas as soluções de MeHg e inosina foram preparadas no momento do uso (um estoque de MeHg 10 mM era mantido por no máximo uma semana a -20°C). Os antagonistas de receptores de adenosina e inibidores de vias de sinalização celular foram dissolvidos em DMSO na concentração máxima de 0,1%. Em todos os experimentos foram utilizados controles tratados com os veículos apropriados. Os antagonistas para os receptores de adenosina A<sub>1</sub> (PSB36, TROCRIS), A<sub>2A</sub> (SCH58261, TOCRIS) e A<sub>3</sub> (MRS1523, TOCRIS) e os inibidores de PI3K/AKT (Wortamanina, Sigma-Aldrich) ou MEK/ERK (U0126, Cell Signaling) foram pré-incubados por 30 minutos antes dos tratamentos com Inosina (Sigma) e/ou MeHg por 6 horas. As concentrações utilizadas nesses experimentos foram baseadas em trabalhos prévios da literatura (DONOVAN e CUNNINGHAM, 1998; KOYAMA *et al.*, 2000; JIANG *et al.*, 2002; MATOS *et al.*, 2012; GESSI *et al.*, 2013)

### 5.3.3 Teste da redução do MTT

O viabilidade celular foi realizado através do teste colorimétrico com sal de tetrazólio 3-[4,5-dimetiltiazol-2-il]-2,5- difeniltetrazólio (MTT) (Thermo Fischer), baseado na redução desse composto por desidrogenases mitocondriais (MOSMANN, 1983). Após os tratamentos (realizados em triplicata), as células foram incubadas com MTT (0,5 mg/mL), por 2 h a 37°C. Em seguida, o meio contendo MTT foi retirado e adicionou-se 100 µL de DMSO por poço para a dissolução dos cristais de formazana e a absorbância foi mensurada em espectrofotômetro a 540 nm. Os resultados foram expressos como percentual controle (células tratadas com veículo apenas).

### 5.3.4 Liberação de lactato desidrogenase (LDH).

A enzima lactato desidrogenase é uma enzima presente no citoplasma de vários tipos celulares. Em situações em que a membrana celular é rompida, a enzima pode ser liberada para o meio extracelular (meio de cultura neste caso), sendo um indicativo de morte celular. A quantificação de LDH liberada no meio de cultura utilizando o kit para Dosagem de LDH (Thermo Scientifics, #88954), seguindo as orientações expressas pelo fabricante. Resumidamente, a técnica utilizada envolvia duas reações químicas conjugadas. A LDH presente no meio de cultura é capaz de converter lactato em piruvato, formando NADH. Este NADH formado serve de cofator para uma enzima diaforase (presente no kit) que converte um sal de tetrazólio em um sal de formazana vermelho. A leitura da absorbância em 490 nm indica a quantidade de formazana formada, que é diretamente proporcional a quantidade de LDH no meio. Todos os experimentos foram realizados em triplicata, e na presença de um controle positivo. Os resultados foram expressos em percentual do grupo controle (células tratadas apenas com veículo).

### 5.3.5 Produção de ERO

A geração celular de ERO foi mensurada através da sonda fluorescente 2',7'- diclorodidrofluoresceína acetato (H<sub>2</sub>DCFDA, Thermo Scientific). Quando aplicada a células intactas, H<sub>2</sub>DCFDA passa pela membrana celular, sofrendo uma hidrólise enzimática por esterases, formando um produto não fluorescente DCFH. Na presença de ERO, DCFH é oxidado gerando o composto fluorescente DCF (WANG e JOSEPH, 1999). As células foram incubadas com H<sub>2</sub>DCFDA (10 µM) por 30 minutos, e após remoção do meio com H<sub>2</sub>DCFDA duas lavagens com HBSS foram realizadas e o meio contendo os tratamentos foi adicionado. A fluorescência foi quantificada em espectrofluorímetro com 488 nm de excitação e 520 nm de leitura. Todos os experimentos foram realizados em triplicata bem como controles positivos contendo peróxido de hidrogênio. Os resultados estão expressos em percentual do controle.

### 5.3.6 RT-qPCR

**Extração do RNA.** Os ácidos ribonucléicos necessários para os estudos foram extraídos das culturas celulares utilizando colunas específicas para extração e purificação de RNA de acordo com as



instruções do fabricante (Qiagen, # 79104). Resumidamente, as células foram raspadas em tampão de lise (fornecido pelo kit contendo as colunas) com  $\beta$ -mercaptoetanol 0,1%. Após adição de etanol 70% na proporção de 1:1, a solução contendo o lisado celular foi transferida para as colunas, e uma série de lavagens com tampões específicos foram realizadas, bem como uma incubação com DNase (Qiagen, # 79254), para evitar contaminação com DNA genômico. O RNA foi coletado em 30  $\mu$ L de água pura estéril, livre de RNase. A quantificação, a determinação da pureza e a integridade do material foram verificadas utilizando o espectrofotômetro NanoDrop 2000 (Thermo Scientific), sendo considerado adequadas uma razão de 260/280nm de 1,8 a 2,0 e a concentração de 100 ng/ $\mu$ L. **Síntese do cDNA:** A síntese de cDNA foi realizada através de uma reação de transcrição reversa utilizando o kit High-Capacity cDNA Reverse Transcription (Thermo Scientific, # 439016) composto por tampão de transcrição reversa 10X, dNTPs 25X (100 mM), primers randômicos 10X, transcriptase reversa e água estéril livre de RNase. Diferentes alíquotas volumétricas foram utilizadas para obtenção de uma quantidade padronizada de 1  $\mu$ g de RNA total para cada amostra. As amostras foram submetidas ao termociclador (BioRad) sob as seguintes condições: 25°C por 10 min, 37°C por 120 min, 85°C por 5 min e então 4°C. **RT-qPCR:** As análises quantitativas da expressão dos genes previamente selecionados foram realizadas pelo método TaqMan. Os primers/sondas pré-estabelecidos foram obtidos da Life Technologies e estão listados na tabela 3. O gene para GAPDH foi utilizado para normalização. As reações foram realizadas com 3  $\mu$ L do cDNA de cada amostra e 7  $\mu$ L de TaqMan Master Mix (Life Technologies, # 439016) contendo as sondas TaqMan para os genes de interesse. A reação de amplificação foi realizada através de desnaturação inicial a 50°C por 2 min seguida de 95°C por 10 min e 40 ciclos térmicos de 95°C por 15 s e 60°C por 1 min. O monitoramento em tempo real da PCR foi realizado em um termociclador CFX96 Real-time system com o programa BioRad CFX manager (BioRad) através da detecção dos níveis de fluorescência do reagente TaqMan. Todas as reações, tanto dos genes alvo quanto do controle endógeno, foram realizadas em triplicatas (BORNHORST *et al.*, 2014). Os Cycle threshold (Ct) utilizados para as análises foram a média aritmética entre as triplicatas dos genes alvo e controles endógenos. Os valores de  $\Delta$ Ct foram obtidos pela subtração do Ct dos genes alvos pelo Ct do gene de GAPDH.  $\Delta\Delta$ Ct representa a subtração dos valores de  $\Delta$ Ct dos grupos tratados pelo  $\Delta$ Ct do grupo controle. A obtenção da expressão relativa de cada gene foi realizada pelo método  $2^{-\Delta\Delta$ Ct (LIVAK e SCHMITTGEN, 2001).

Gene Alvo	Identificação
HO-1	RN00561387
GAPDH	RN01775763
NQO-1	RN00566528
NRF2	RN00582415
BDNF	RN02531967

**Tabela 5 Sondas TaqMan utilizadas**

### 5.3.7 Dosagem de Glutathiona (GSH)

Após os tratamentos, as células aderidas foram lavadas com PBS gelado e raspadas em solução de PBS com Triton-X 0,1% e sonicadas por 10 segundos. Uma alíquota foi retirada para dosagem de proteínas e o restante diluído 1:1 em ácido metafosfórico 10%, centrifugados por 10 min a 13 000 x g, 4°C, e o sobrenadante armazenado a -80°C. A dosagem de GSH tanto nas formas reduzida e total foi realizada de acordo com as instruções presentes no kit utilizado (Enzo Life Technologies, #ADI-900-160). Resumidamente, a quantificação de GSH foi realizada após a incubação das amostras com a enzima glutathiona redutase (GR) e NADPH (fornecidos pelo kit) por 15 min, sendo a *pool* total de GSH quantificado através da reação com o reagente DTNB e leitura da absorbância em 405 nm. A medida de glutathiona oxidada foi realizada pela incubação das amostras com 4-vinil-piridina que ao reagir com a GSH reduzida na amostra forma um complexo estável que não serve de substrato para a GR. Dessa maneira, a incubação com GR e NADPH e subsequente reação com DTNB permitiu apenas a quantificação da glutathiona oxidada na amostra. A quantidade de glutathiona reduzida foi calculada pela diferença entre glutathiona total e oxidada. Os resultados foram normalizados pela quantidade de proteína de cada amostra.

### 5.3.8 Imunocitoquímica

O protocolo para realização de imunocitoquímica foi baseado em publicações prévias do grupo (NI *et al.*, 2011) com pequenas modificações. Após os tratamentos, as lamínulas contendo as células foram lavadas com PBS e fixadas com paraformaldeído 4% por 20 minutos. Após 3 lavagens com PBS, as células foram permeabilizadas com triton 0,1% por 15 minutos e bloqueio com BSA 5% por 1 hora. Após o bloqueio, o anticorpo primário contra Nrf2 (Santa Cruz Biotech, #sc-722, diluição 1:50) foi incubado *overnight*. Após a remoção do anticorpo

primário, as lamínulas foram lavadas 3 vezes com PBS e incubadas com anticorpo secundário fluorescente Alexa Fluor 488 (Thermo Scientific, #A110008) por 1 hora seguido de mais três lavagens com PBS. As lamínulas foram então montadas com líquido de montagem contendo DAPI (Life Technologies #P36931). As imagens foram adquiridas com o Microscópio Invertido Olympus IX81 e analisadas utilizando o software Velocity. A quantificação de Nrf2 no núcleo foi baseada no protocolo *Intersect* presente no programa, em que a intensidade média da coloração verde (referente a marcação com Nrf2) foi mensurada nas áreas delimitadas pela coloração com DAPI (referente ao núcleo).

### 5.3.9 Ativação de ARE – transfecção com plasmídeo ARE – Luciferase

Para verificar a ativação do fator de transcrição Nrf2, as células foram transfectadas com 500 ng do plasmídeo ARE-luciferase (BPS Bioscience #60514), e 10 ng do plasmídeo controle pRL-CMV (PROMEGA, #E2261). O plasmídeo ARE-luciferase contém a sequência consenso de ligação para o fator de transcrição Nrf2, juntamente com a sequência para a luciferase, enquanto o plasmídeo pRL-CMV contém a sequência para a transcrição de uma enzima renila luciferase. A transfecção foi realizada com o reagente Fugene-6 (PROMEGA #E2691). 24 horas após a transfecção, o meio foi trocado e as células foram tratadas com inosina. 24 horas após o tratamento, a atividade de luciferase e renila foi medida em luminômetro através de um kit comercial (PROMEGA, #E1910), a razão entre os valores de luciferase e renila foi determinada e os resultados foram calculados como percentual do controle (WANG *et al.*, 2009)

### 5.3.10 Western-Blotting

Após os tratamentos as células foram lavadas com PBS e raspadas em 100 µl de tampão para radiomunensaio (RIPA) (Sigma-Aldrich #R0278) com inibidores de protease e fosfatase mantidas no gelo e sonicadas por 10 segundos. As amostras foram centrifugadas a 10 000 g por 10 min a 4°C. O sobrenadante foi coletado e uma alíquota foi removida para análise da concentração de proteínas. O restante do sobrenadante foi diluído na proporção 1:1 em tampão Laemlli 2X (BioRad #1610737) contendo 5% de β-mercaptoetanol, e as amostras fervidas por 5 minutos.

20 µg de proteína de cada amostra foram isoladas através de eletroforese em gel de poliacrilamida contendo dodecil sulfato de sódio (SDS-PAGE) utilizando géis pré-fabricados com concentração de 10% de acrilamida (BioRad #4561034). A eletroforese foi realizada com corrente fixa de 15 mA/placa e voltagem máxima de 150 V durante aproximadamente 2h. Após separação, as proteínas foram transferidas eletroforéticamente para uma membrana de nitrocelulose, utilizando o aparato Mini Trans-Blot (Bio-Rad), por 90 minutos a 200 volts, sob refrigeração constante. A eficiência da transferência foi avaliada pela coloração das membranas com Ponceau (LOPES *et al.*, 2012; GONCALVES *et al.*, 2013)

As membranas foram bloqueadas com 5% de BSA em TBS-T (Tris 10 mM, NaCl 150 mM, Tween-20 0,1% pH 7,5) por 1 h e após 3 lavagens de 5 min com TBS-T, (Tris 10 mM, NaCl 150 mM, Tween-20 0,1%, pH 7,5) as membranas foram incubadas overnight (4°C) com os anticorpos específicos para as formas fosforiladas e totais das proteínas de interesse. Para a detecção dos complexos imunes, as membranas foram incubadas por 1 h com anticorpo secundário anti-IgG de coelho ou camundongo (ligado à peroxidase) e reveladas por quimiluminescência, através do sistema ECL de super eficiência (Thermo Scientific, #34080). O nível de fosforilação das proteínas foi determinado pela razão entre a D.O da banda fosforilada e a D.O da banda total. O imunoconteúdo das proteínas de interesse foi determinado pela razão entre a D.O da amostra e D.O de β-actina. As bandas foram quantificadas utilizando o software Scion Image ® e os resultados expressos em percentual do controle. Os anticorpos e as diluições utilizados estão presentes na tabela 6.

Anticorpo	Peso Molecular (Proteína alvo)	Fabricante (Código Prod.)	Diluição
P-CREB (ser-133)	43 kDa	Cell Signaling (9198)	1:1000
T-CREB	43 kDa	Cell Signaling (9197)	1:1000
P-ERK 1/2 (Thr-202/Tyr-204)	42/44 kDa	Sigma-Aldrich (M8159)	1:1000
T-ERK 1/2	42/44 kDa	Sigma-Aldrich (M8159)	1:1000
P-AKT (ser-473)	60 kDa	Cell Signaling (9271)	1:1000
T-AKT	60 kDa	Cell Signaling (9272)	1:1000
$\beta$ -Actina	45 kDa	Sigma-Aldrich (A2228)	1:100000
Nrf2	110 kDa	Santa Cruz Biotech. (sc722)	1:500
Goat-anti-mouse	-	Thermo Fischer (AP308P)	1:20000
Goat-anti-rabbit	-	Thermo Fischer (AP308P)	1:20000

**Tabela 6. Lista de anticorpos utilizados**

### 5.3.11 Dosagem de proteínas

As proteínas foram dosadas de acordo com o método de Pierce utilizando curva padrão de albumina sérica bovina, segundo as instruções do kit comercial utilizado (Thermo Fisher, #23227)

### 5.3.12 Análise Estatística

Os resultados obtidos dos foram avaliados por análise de variância (ANOVA) de uma, duas ou três vias, seguido pelo *post-hoc* de Duncan, quando apropriado. O resultado da atividade do plasmídeo ARE –Luciferase foi avaliado pelo teste *t* de Student. As diferenças estatísticas foram atribuídas com um valor de  $p < 0,05$ .

## 5.4 Resultados

### 5.4.1 Efeito neuroprotetor de inosina frente a toxicidade induzida por MeHg

Baseado em estudos prévios do grupo do Prof Aschner (WORMSER *et al.*, 2012), e alguns trabalhos em andamento, foi escolhida a dose de  $5\mu\text{M}$  de MeHg para os diferentes estudos. Conforme verificado na figura 33, a exposição das culturas a MeHg nessa concentração por 6 ou 24 horas induziu uma queda na viabilidade celular.

Como pode ser verificado no gráfico A da figura 33, quando as células foram co-incubadas com inosina ( $50 - 1000\ \mu\text{M}$ ) e MeHg ( $5\mu\text{M}$ ) por 6 horas, foi observado um efeito protetor de inosina frente a queda de viabilidade celular induzida por MeHg. A ANOVA de duas vias indicou um efeito para o tratamento com MeHg [ $F(1,47)= 9,84, p < 0,01$ ], nenhum efeito para o tratamento com inosina [ $F(1,47)= 1,76, p > 0,05$ ] e uma interação significativa entre os tratamentos [ $F(1,47)= 4,53, p < 0,05$ ].

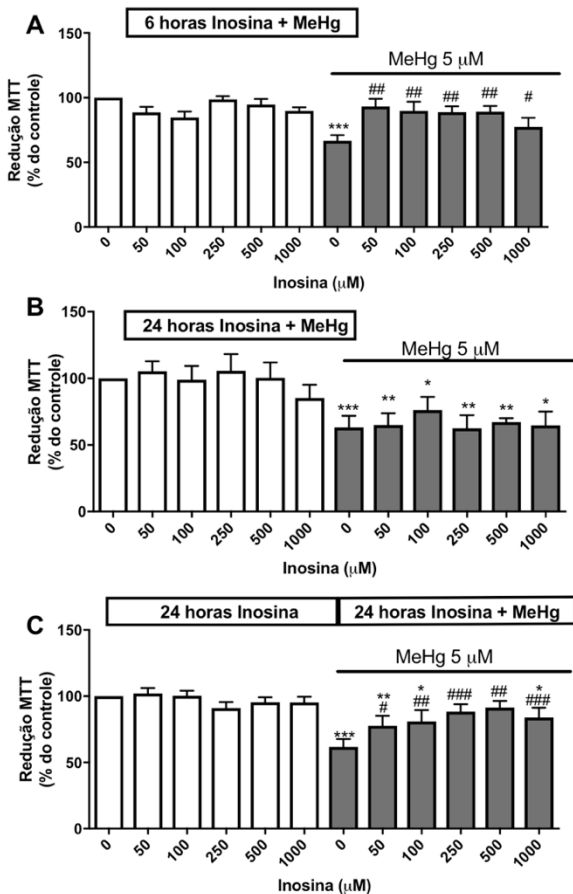
O co-tratamento com inosina ( $50 - 1000\ \mu\text{M}$ ) e MeHg ( $5\mu\text{M}$ ) por 24 horas não foi capaz de prevenir a redução na viabilidade induzido por esse toxicante, como pode ser verificado na figura 33B. A ANOVA de duas vias indicou um efeito para o tratamento com MeHg [ $F(1,34)= 28,73, p < 0,001$ ], nenhum efeito para o tratamento com inosina [ $F(1,34)= 0,93, p > 0,05$ ] ou uma interação significativa entre os tratamentos [ $F(1,34)= 0,39, p > 0,05$ ].

Por outro lado, quando as células foram pré-incubadas com inosina por 24 horas seguido de um co-tratamento com MeHg e novamente inosina por 24 horas adicionais, o tratamento com essa purina foi capaz de prevenir a morte celular induzida pelo MeHg (Figura 33C). A ANOVA de duas vias indicou um efeito para o tratamento com MeHg [ $F(1,58)= 29,54, p < 0,001$ ], nenhum efeito para o tratamento com inosina [ $F(1,58)= 1,31, p > 0,05$ ] e uma interação significativa entre os tratamentos [ $F(1,58)= 3,31, p < 0,05$ ]. As análises de *post-hoc* indicaram que os tratamentos com inosina nas concentrações de  $250$  e  $500\ \mu\text{M}$  preveniram completamente a morte celular induzida por MeHg.

Os resultados na figura 34A indicam o efeito do co-tratamento com inosina e MeHg por 6 horas sobre a liberação de LDH. A ANOVA de duas vias indicou um efeito para o tratamento com MeHg [ $F(1,47)= 5,09, p < 0,001$ ], nenhum efeito para o tratamento com inosina [ $F(1,47)= 0,39, p > 0,05$ ] ou uma interação significativa entre os tratamentos [ $F(1,47)= 1,53, p > 0,05$ ].

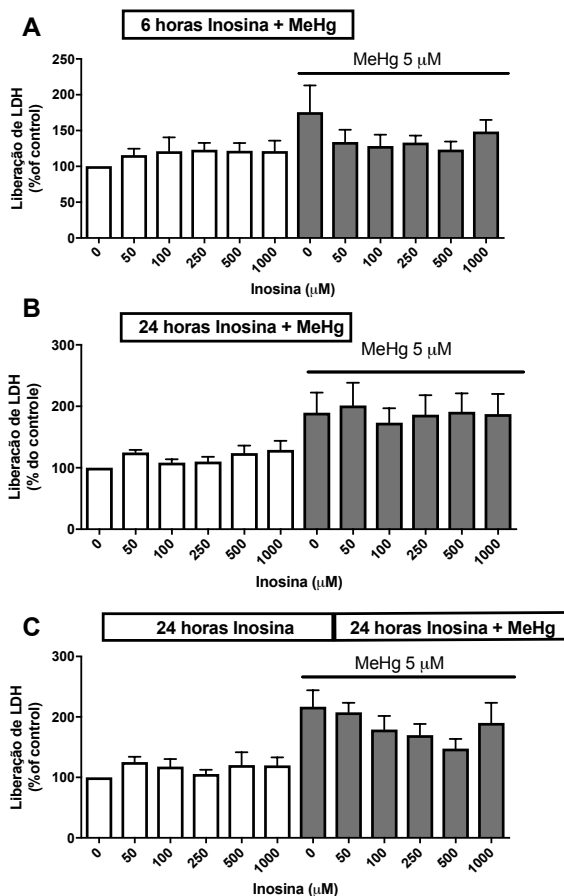
O efeito do tratamento com inosina e MeHg por 24 horas está representado na figura 34B. A ANOVA de duas vias indicou um efeito para o tratamento com MeHg [ $F(1,34)= 31,70$ ,  $p < 0,001$ ], nenhum efeito para o tratamento com inosina [ $F(1,34)= 0,18$ ,  $p > 0,05$ ] ou uma interação significativa entre os tratamentos [ $F(1,34)= 0,39$ ,  $p > 0,05$ ].

O efeito do pré-tratamento com inosina por 24 horas seguido de um co-tratamento com inosina e MeHg por mais 24 horas, estão representados na figura 34C. A ANOVA de duas vias indicou um efeito para o tratamento com MeHg [ $F(1,36)= 41,22$   $p < 0,001$ ], nenhum efeito para o tratamento com inosina [ $F(1,58)= 0,89$ ,  $p > 0,05$ ] ou uma interação significativa entre os tratamentos [ $F(1,58)= 1,230$ ,  $p > 0,05$ ].



**Figura 33. Efeito do tratamento com Inosina na redução da viabilidade celular induzido por MeHg. A viabilidade celular foi avaliada pelo método da redução do MTT. PAINEL A** representa o efeito do tratamento com inosina (50-1000µM) e inosina juntamente com MeHg 5µM por 6 horas na redução do MTT. **PAINEL B** representa o efeito do tratamento com inosina (50-1000µM) e inosina juntamente com MeHg 5µM por 24 horas na redução do MTT. **PAINEL C** representa o efeito do pré-tratamento com inosina (50-1000µM) por 24 horas, seguido do co-tratamento com inosina (50-1000µM) e/ou MeHg 5µM por 24 horas. ANOVA de duas vias seguida pelo teste *post-hoc* de Duncan \*\*\*  $p < 0,001$ , \*\*  $p < 0,01$ , \*  $p < 0,05$  quando comparado ao grupo controle. ###  $p < 0,001$ , ##  $p < 0,01$ , #  $p < 0,05$  quando comparado ao grupo tratado com MeHg. Os resultados da quantificação estão expressos como percentual do controle e as barras representam a média + E.P.M de 5-7 experimentos.



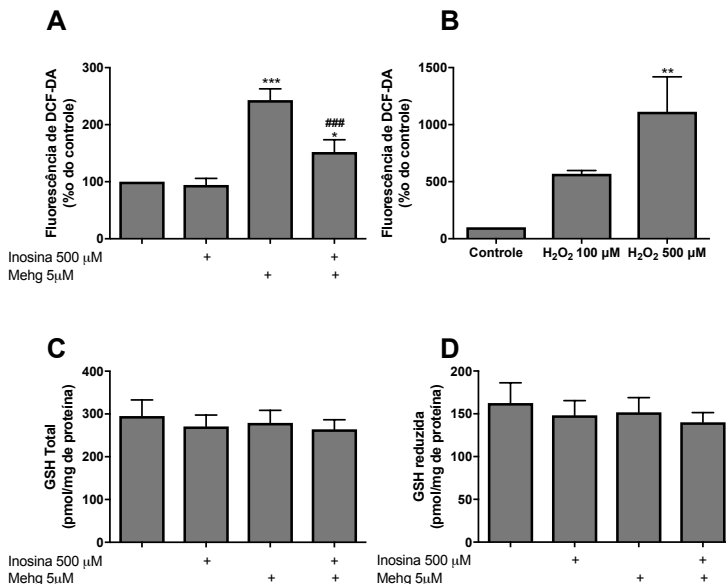


**Figura 34. Efeito do tratamento com inosina na liberação da enzima lactato desidrogenase (LDH) induzido por MeHg.** Painel A representa o efeito do tratamento com inosina (50-1000 $\mu\text{M}$ ) e inosina juntamente com MeHg 5 $\mu\text{M}$  por 6 horas na liberação de LDH. Painel B representa o efeito do tratamento com inosina (50-1000 $\mu\text{M}$ ) e inosina juntamente com MeHg 5 $\mu\text{M}$  por 24 horas na liberação de LDH. Painel C representa o efeito do pré-tratamento com inosina (50-1000 $\mu\text{M}$ ) por 24 horas, seguido do co-tratamento com inosina (50-1000 $\mu\text{M}$ ) e/ou MeHg 5 $\mu\text{M}$  por 24 horas. ANOVA de duas vias seguida pelo teste *post-hoc* de Duncan \*\*\*  $p < 0,001$ , \*\*  $p < 0,01$ , \*  $p < 0,05$  quando comprado ao grupo controle. #  $p < 0,05$  quando comprado ao grupo tratado com MeHg. Os resultados da quantificação estão expressos como percentual do controle e as barras representam a média + E.P.M de 5-6 experimentos.

#### 5.4.2 Efeito dos tratamentos com Inosina e/ou MeHg na produção de ERO e na concentração de GSH total e reduzida

Como pode ser verificado na figura 35A, 6 horas após o co-tratamento com inosina e MeHg, inosina na concentração de 500  $\mu\text{M}$  preveniu o aumento da fluorescência de  $\text{H}_2\text{DCFDA}$  induzido por MeHg, indicando que essa purina pode diminuir o aumento na quantidade de ERO induzido por esse toxicante. A ANOVA de duas vias indicou um efeito para os tratamentos com MeHg [ $F(1,12)= 45,36, p < 0,001$ ], inosina [ $F(1,12)= 10,50, p < 0,001$ ] e uma interação significativa para esses tratamentos [ $F(1,12)= 8,23, p < 0,05$ ]. Para validar a metodologia de  $\text{H}_2\text{DCFDA}$ , as células foram incubadas com peróxido de hidrogênio ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) nas mesmas condições que os experimentos anteriores (figura 35B). A ANOVA de uma via indicou um efeito significativo para o tratamento com  $\text{H}_2\text{O}_2$  [ $F(3,12)= 8,199, p < 0,001$ ]. As análises de *post-hoc* indicaram que o tratamento com  $\text{H}_2\text{O}_2$  na concentração de 500  $\mu\text{M}$  aumentou significativamente a produção de ERO.

Por outro lado, não foram observadas diferenças na quantidade total de GSH nas culturas astrocitárias (Figura 35C). A ANOVA de duas vias não indicou diferenças para o tratamento com MeHg [ $F(1,12)= 2,2, p > 0,05$ ], inosina [ $F(1,12)= 0,4, p > 0,05$ ] ou uma interação significativa para os tratamentos [ $F(1,12)= 0,97, p > 0,05$ ] nos níveis de GSH total. Também não foram observadas alterações nos níveis de GSH reduzida (Figura 35D) [tratamento com MeHg [ $F(1,12)= 0,45, p > 0,05$ ], tratamento com inosina [ $F(1,12)= 0,85, p > 0,05$ ], interação entre MeHg e inosina [ $F(1,12)= 0,01, p > 0,05$ ]].

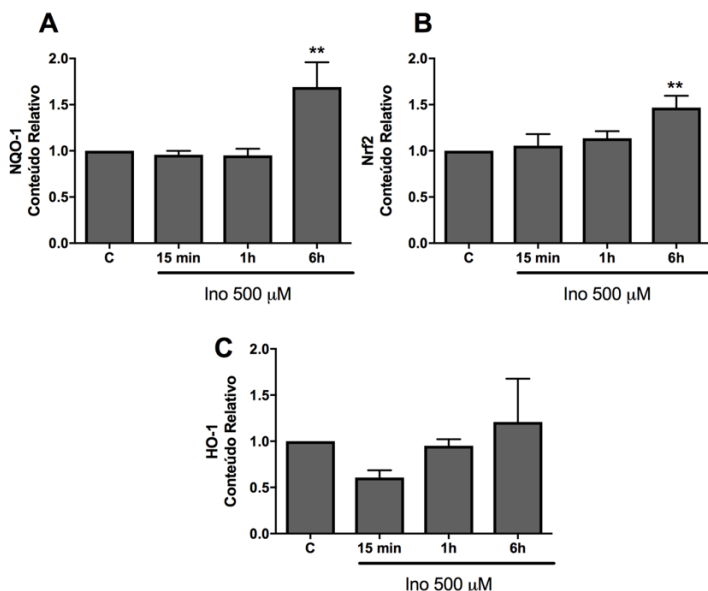


**Figura 35. Efeito do tratamento com inosina e/ou MeHg na produção de ERO (floreescência de H<sub>2</sub>DCFDA) e nos níveis de GSH total e reduzida.** Painéis A e B representam o efeito do co-tratamento com Inosina (500 $\mu$ M) e/ou MeHg 5  $\mu$ M ou peróxido de hidrogênio (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> – como controle positivo do teste) respectivamente, por 6 horas nos níveis de ERO mensurados pela florescência de H<sub>2</sub>DCFDA. Painéis C e D representam o efeito do tratamento com Inosina (500 $\mu$ M) e/ou MeHg 5  $\mu$ M por 6 horas nos níveis de GSH total reduzida. Anova de uma (painel B) ou duas vias (painéis A, C e D) seguida pelo teste *post-hoc* de Duncan. \*\*\* p < 0,001, \*\* p < 0,01 quando comprado ao grupo controle, ### p < 0,001 quando comprado ao grupo controle. Os resultados estão expressos como percentual do controle ou concentração de GSH total ou reduzida e as barras representam a média + E.P.M de 4-5 experimentos.

#### 5.4.3 Efeito do tratamento com inosina na expressão de genes relacionados a resposta antioxidante.

Foi buscado avaliar se o tratamento com inosina poderia alterar a expressão de alguns genes relacionados a ativação de Nrf2, um importante fator de transcrição relacionado a resposta antioxidante. Para este fim as células foram tratadas com inosina 500  $\mu$ M, e após 15 minutos, 1 hora ou 6 horas as células foram coletadas e o RNA processado para as análises de RT-qPCR.

Como pode ser verificado na figura 36A e 36B foi verificado um aumento significativo no conteúdo relativo do RNAm para NQO-1 [ANOVA de uma via  $F(3,16) = 6,68$   $p < 0,01$ ] e Nrf2 [ANOVA de uma via  $F(3,16) = 4,60$   $p < 0,05$ ] respectivamente. Por outro lado, não foram verificadas alterações na expressão de HO-1 (figura 36C) [ANOVA de uma via  $F(3,16) = 1,08$   $p > 0,05$ ].



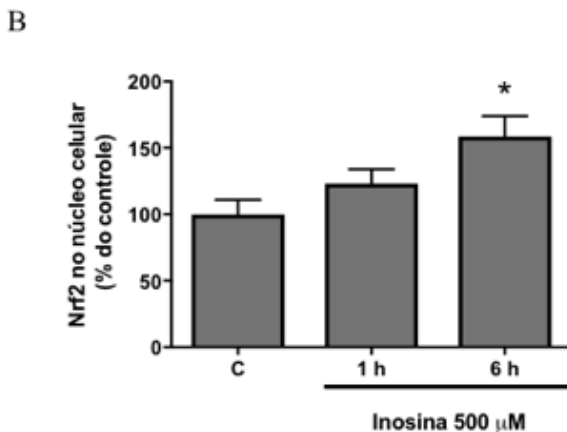
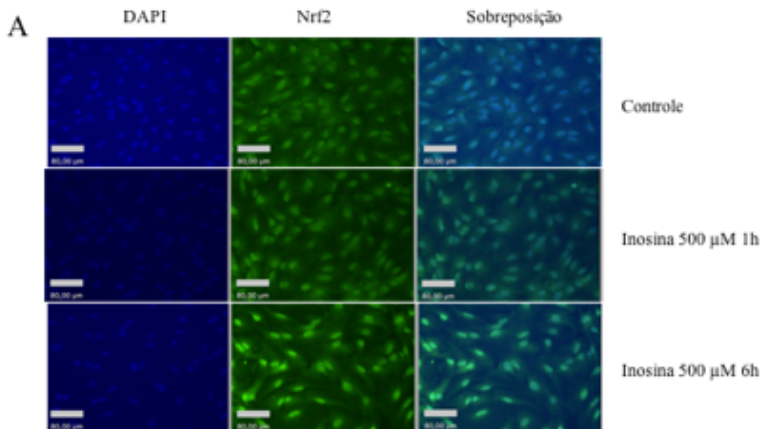
**Figura 36. Efeito do tratamento com inosina na expressão relativa de NQO-1 (A), Nrf2 (B) e HO-1 (C).** ANOVA de uma via seguida pelo *post-hoc* de Duncan \*\*  $p < 0,01$  quando comparado ao grupo controle. Resultados expressos como expressão relativa ao respectivo controle e as barras representam a média + E.P.M de 5 experimentos.

#### 5.4.4 Efeito do tratamento com inosina no imunoconteúdo, ativação e translocação de Nrf2 para o núcleo

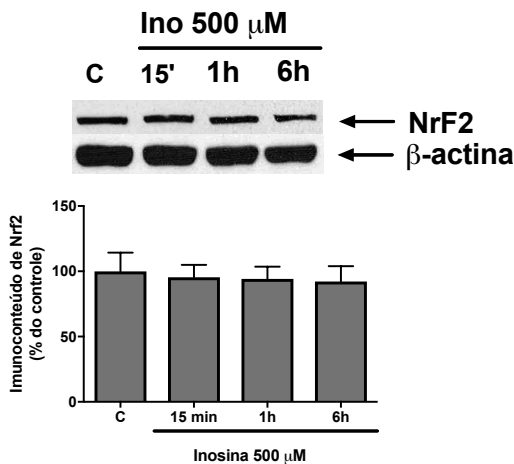
Nrf2 é um fator de transcrição que quando ativado se transloca para o núcleo, onde pode ativar a transcrição de alguns genes relacionado a defesa antioxidante (BRYAN *et al.*, 2013). Para avaliar se o tratamento com inosina era capaz de promover essa translocação de Nrf2, os cultivos astrocitários foram tratados por diferentes tempos com inosina na concentração de 500μM e as células foram fixadas e processadas para

análises de imunocitoquímica. A figura 37A mostra que inosina aumenta a marcação de Nrf2 no núcleo celular, o que pode ser evidenciado pela quantificação demonstrada na figura 37B. O tratamento com inosina alterou de maneira significativa o imunoconteúdo de Nrf2 no núcleo das células [ $F(2,9)=5,18$ ,  $p < 0,05$ ], sendo que o tratamento com inosina por 6 horas aumentou significativamente Nrf2 no núcleo celular.

Adicionalmente, as culturas celulares foram tratadas com inosina por diferentes tempos e as células coletadas para análises de *western blotting* para avaliar o imunoconteúdo de Nrf2 (figura 38), contudo não foram observadas alterações induzidas pelo tratamento com inosina [ $F(3,15)=1,14$ ,  $p > 0,05$ ].

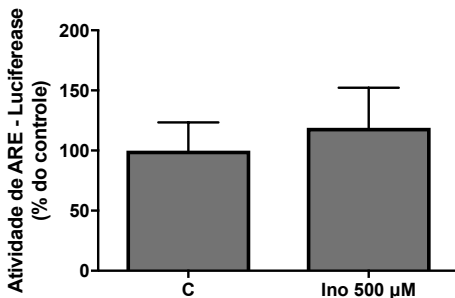


**Figura 37. Efeito do tratamento com inosina na imunocontéudo de Nrf2 no núcleo celular.** O painel representa imagens representativas das culturas primárias de astrócitos incubadas por diferentes tempos com inosina 500μM ou controle (amostras não tratadas com inosina). A primeira coluna corresponde a marcação com DAPI para o núcleo celular, a segunda coluna corresponde a marcação resultante da incubação com anticorpo anti-Nrf2 e a terceira coluna corresponde a sobreposição das imagens anteriores. Aumento de 200X e barra de escala corresponde a 80 μM. A figura B corresponde a quantificação de Nrf2 no núcleo celular de imagens de 4 cultivos celulares independentes. Os resultados da quantificação estão expressos como percentual do controle e as barras representam a média + E.P.M. ANOVA de uma via seguida de post-hoc de Duncan. \*  $p < 0,05$  quando comparado ao controle.



**Figura 38. Efeito do tratamento com inosina no imunoconteúdo de Nrf2.** Os cultivos celulares foram incubados por diferentes tempos (15 minutos, 1 hora ou 6 horas) com inosina (500  $\mu$ M). As amostras controle (C) se referem aos cultivos celulares que não foram tratados com essa purina. Uma imagem representativa para a quantificação realizada entre a D.O. entre a banda de Nrf2 e a banda de  $\beta$ -actina está representada. Os resultados da quantificação estão expressos como percentual do controle e as barras representa a média + E.P.M. ANOVA de uma via.

A ativação de Nrf2 também foi avaliada através da transcrição do plasmídeo ARE-luciferase. Esse plasmídeo contém a sequência referente ao ARE juntamente com a sequência para a transcrição de uma enzima luciferase. Nessas condições, a ligação de Nrf2 na sequência relativa ao ARE presente no plasmídeo proporciona a expressão de uma enzima luciferase. Contudo, não foram observadas alterações na atividade de luciferase após o tratamento com inosina (figura 39) [t(6) 1,2 p > 0,05].



**Figura 39. Efeito do tratamento com inosina na atividade de ARE.** Os cultivos celulares foram transfectados com os plasmídeos ARE-luciferase e pRL-CMV, e 24 horas após foram tratadas com inosina (500 µM). 24 horas após o tratamento com inosina a atividade de luciferase/renila foi medida. As amostras controle (C) se referem aos cultivos celulares que não foram tratadas com essa purina. Os resultados estão expressos como percentual do controle da razão entre a atividade de luciferase e renila para cada amostra e as barras representam a média  $\pm$  E.P.M de 4 experimentos. Teste de *t* de student.

#### 5.4.5 Efeito dos antagonistas para receptores de adenosina no efeito neuroprotetor de inosina frente a toxicidade induzida por MeHg

Uma vez que vários dos efeitos biológicos de inosina envolvem a ativação de receptores de adenosina, foi avaliado se o pré-tratamento das culturas celulares com antagonistas desses receptores poderia prevenir o efeito protetor de inosina frente a toxicidade do MeHg. Como pode ser verificado na figura 40 o pré-tratamento com o antagonista para o receptor  $A_3$  de adenosina, preveniu o efeito neuroprotetor de inosina.

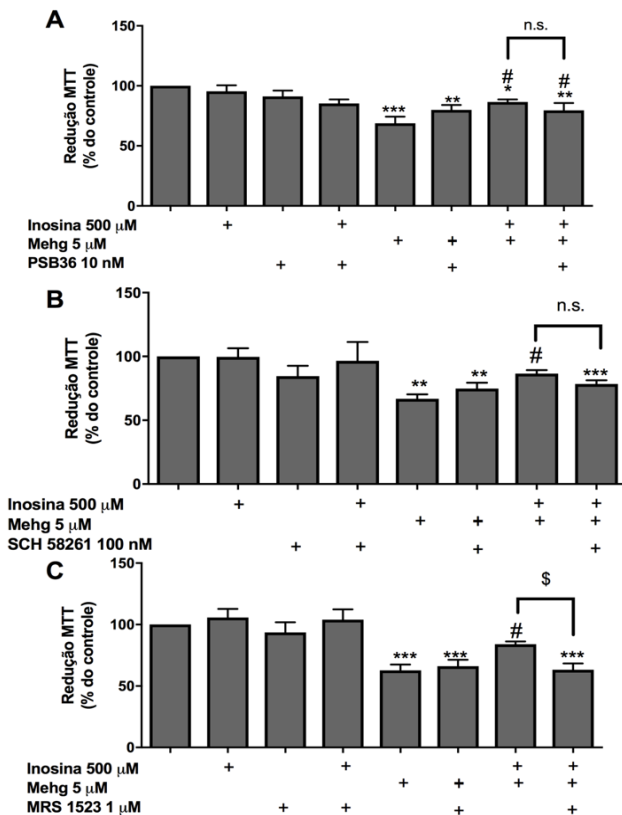
O painel A da figura 40 representa o efeito do pré tratamento com PSB36, um antagonista seletivo para receptores  $A_1$ . A ANOVA de três vias indicou um efeito na redução do MTT para o tratamento com MeHg [F(1,40)=20,48,  $p < 0,001$ ], nenhum efeito com inosina [F(1,40)=0,97,  $p > 0,05$ ] ou para o tratamento com PSB36 [F(1,40)=0,78,  $p > 0,05$ ], uma interação entre os tratamentos com inosina e MeHg [F(1,40)=7,70,  $p < 0,01$ ] e nenhuma interação significativa entre os tratamentos com inosina, MeHg e PSB 36 [F(1,40)=1,12,  $p > 0,05$ ]. As análises de *post-hoc* indicaram que o efeito neuroprotetor de inosina (500 µM) frente a queda da redução do MTT induzido por MeHg (5 µM) não foi alterado pelo tratamento com PSB36.

O pré-tratamento com SCH58261, um antagonista seletivo para receptores de adenosina  $A_{2A}$ , também não alterou o efeito neuroprotetor



de inosina (500  $\mu\text{M}$ ) frente à queda da redução do MTT induzido por MeHg (5  $\mu\text{M}$ ) (Figura 41B). A ANOVA de três vias indicou um efeito na redução do MTT para o tratamento com MeHg [ $F(1,29)=20,31$ ,  $p < 0,001$ ], nenhum efeito com inosina [ $F(1,29)=3,15$ ,  $p > 0,05$ ] ou para o tratamento com SCH58261 [ $F(1,29)=0,71$ ,  $p > 0,05$ ]. Adicionalmente não foi verificada uma interação entre os tratamentos com inosina e MeHg [ $F(1,29)=1,32$ ,  $p > 0,05$ ] bem como entre os tratamentos com inosina, MeHg e SCH58261 [ $F(1,29)=1,96$ ,  $p > 0,05$ ].

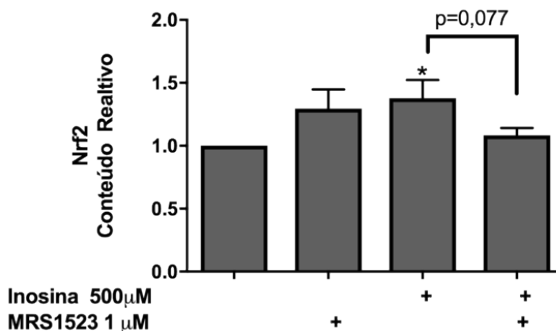
O painel C da figura 40 representa o efeito do pré tratamento com MRS1523, um antagonista seletivo para receptores  $A_3$ . A ANOVA de três vias indicou um efeito na redução do MTT para o tratamento com MeHg [ $F(1,39)=56,91$ ,  $p < 0,001$ ] e para o tratamento com inosina [ $F(1,39)=3,30$ ,  $p < 0,05$ ], e nenhuma alteração para o tratamento com MRS1523 [ $F(1,39)=0,78$ ,  $p > 0,05$ ]. Adicionalmente, ANOVA de três vias não indicou uma interação entre os tratamentos com inosina e MeHg [ $F(1,39)=0,68$ ,  $p > 0,05$ ], mas uma interação significativa entre os tratamentos com inosina, MeHg e MRS1523 [ $F(1,39)=4,2$ ,  $p < 0,05$ ]. As análises de *post-hoc* indicaram que o efeito neuroprotetor de inosina (500  $\mu\text{M}$ ) frente a queda da redução do MTT induzido por MeHg (5  $\mu\text{M}$ ) foi prevenido pelo tratamento com MRS1523.



**Figura 40. Efeito do pré-tratamento com antagonistas para os receptores de adenosina ( $A_1$ ,  $A_{2A}$  e  $A_3$ ), no efeito neuroprotetor de inosina frente a diminuição da redução do MTT induzido por MeHg.** As células foram pré-incubadas por 30 minutos com antagonistas seletivos para esses receptores, e o teste da redução do MTT foi realizado 6 horas após a incubação com inosina (500  $\mu$ M) e MeHg (5  $\mu$ M). O painel A corresponde ao pré-tratamento com PSB36, antagonista seletivo para receptores  $A_1$  de adenosina. O painel B corresponde ao pré-tratamento com SCH58261, antagonista seletivo para receptores  $A_{2A}$  de adenosina. O painel C corresponde o tratamento com MRS1523 antagonista seletivo para receptores  $A_3$  de adenosina. ANOVA de três vias, seguida pelo *post-hoc* de Duncan. \*\*\*  $p < 0,001$ , \*\*  $p < 0,01$ , \*  $p < 0,05$  quando comparado ao grupo controle, #  $p < 0,05$  quando comparado ao grupo tratado com MeHg.  $^s p < 0,05$  entre os grupos indicados e  $^{n.s.}$  não significativo entre os grupos indicados. Os resultados estão expressos como percentual do controle e as barras representam a média  $\pm$  E.P.M de 5-7 experimentos

#### 5.4.6 Efeito do tratamento com MRS1523 no aumento da expressão de Nrf2 por inosina

Uma vez que o efeito protetor de inosina envolveu a ativação do receptor  $A_3$ , foi avaliado o efeito do tratamento com MRS1523 no aumento da expressão Nrf2 por inosina. Para este fim, as culturas foram pré-tratadas com MR1523 ( $1\mu\text{M}$ ) por 30 minutos, e depois tratadas com inosina por 6 horas. A ANOVA de duas vias não indicou um efeito para o tratamento com inosina [ $F(1,16)=0,01$ ,  $p > 0,05$ ] ou para o tratamento com MRS1523 [ $F(1,16)=0,01$ ,  $p > 0,05$ ], mas uma interação entre esses tratamentos [ $F(1,15)= 7,76$ ,  $p < 0,05$ ]. As análises *post-hoc* indicaram que inosina aumentou a expressão de Nrf2 além de indicar uma tendência ( $p = 0,072$ ) para o bloqueio desse efeito por MRS1523 (figura 42)

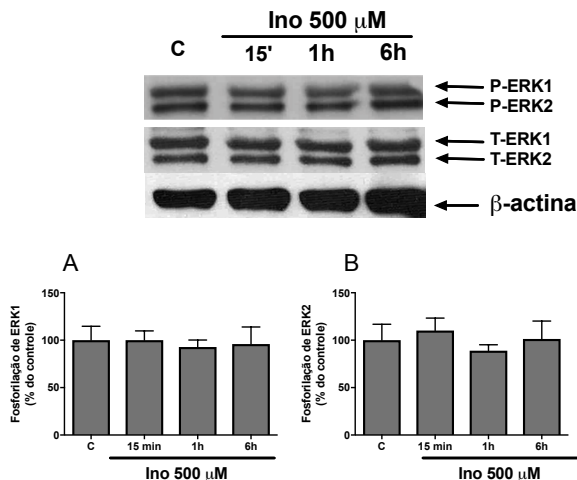


**Figura 41. Efeito do pré-tratamento com antagonista para os receptor de adenosina  $A_3$ , no aumento da expressão de Nrf2 induzido por inosina.** As células foram pré-tratadas com MRS1523, seguido pela incubação com inosina por 6 horas. Após esse período foi realizada a extração do RNA total para análise da expressão do RNAm para Nrf2 por RT-qPCR. Resultados expressos como expressão relativa ao controle e as barras representam a média  $\pm$  E.P.M de 4-5 experimentos.

#### 5.4.7 Participação da modulação de PI3K/AKT e MEK/ERK no efeito neuroprotetor de inosina.

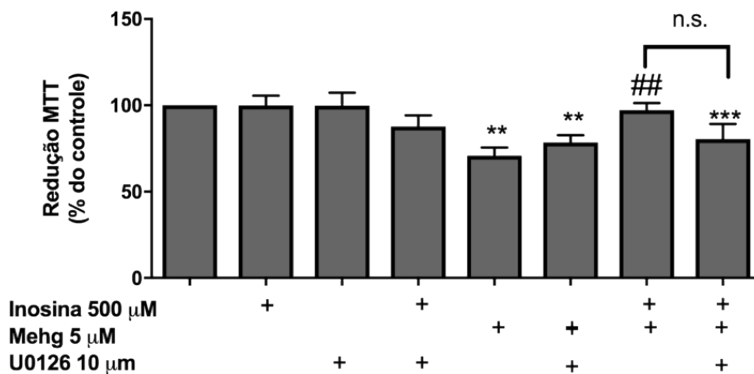
Para avaliar se os efeitos de inosina envolviam a modulação da sinalização de MEK/ERK, as culturas foram tratadas com inosina por diferentes tempos e as células coletadas para análises através de *Western-blotting* para avaliar a fosforilação de ERK 1/2 e AKT.

Conforme pode ser verificado na figura 42, a ANOVA de uma via não indicou alterações na fosforilação de ERK1 [ $F(3,19)=2,29$ ,  $p > 0,05$ ] e ERK 2 [ $F(3,19)=0,55$ ,  $p > 0,05$ ] pelo tratamento com inosina.



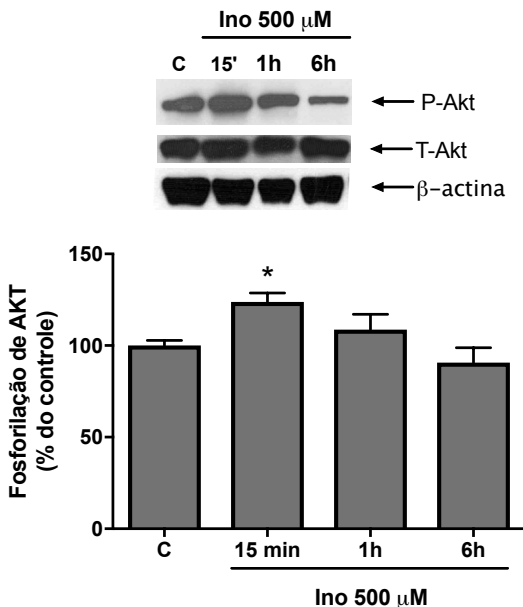
**Figura 42. Efeito do tratamento com inosina na fosforilação de ERK 1,2.** Os cultivos celulares foram incubados por diferentes tempos (15 minutos, 1 hora ou 6 horas) com inosina (500  $\mu$ M). As amostras controle (C) se referem aos cultivos celulares que não foram tratados com essa purina. Uma imagem representativa para a quantificação realizada entre a D.O. entre a banda P-ERK e a banda de T-ERK está representada. Os resultados da quantificação estão expressos como percentual do controle e as barras representa a média  $\pm$  E.P.M de 5-6 experimentos. ANOVA de uma via.

Adicionalmente, foi verificado se o tratamento com um inibidor de MEK, a enzima que fosforila e ativa ERK 1/2, poderia alterar o efeito neuroprotetor de inosina (500  $\mu$ M) frente a queda da viabilidade celular induzida por MeHg (5  $\mu$ M). Conforme mostrado na figura 43 a ANOVA de três vias indicou um efeito na redução do MTT para o tratamento com MeHg [F(1,32)=13,81,  $p < 0,001$ ], nenhum efeito para o tratamento com inosina [F(1,32)=1,01,  $p > 0,05$ ] ou para o tratamento com U0126 [F(1,32)=1,80,  $p > 0,05$ ]. Adicionalmente foi verificada um interação entre os tratamentos com inosina e MeHg [F(1,32)=6,18,  $p < 0,05$ ], mas nenhuma interação entre os tratamentos com inosina, MeHg e U0126 [F(1,32)=0,57,  $p > 0,05$ ]. As análises de *post-hoc* indicaram que o efeito neuroprotetor de inosina (500  $\mu$ M) frente a queda da redução do MTT induzido por MeHg (5  $\mu$ M) não foi alterado pelo tratamento com U0126.



**Figura 43. Efeito do pré-tratamento U0126 (inibidor seletivo de MEK), no efeito neuroprotetor de inosina frente a redução da viabilidade celular induzida por MeHg.** As células foram pré-incubadas por 30 minutos com U0126 e o teste da redução do MTT foi realizado 6 horas após a incubação com inosina (500 µM) e MeHg (5 µM). ANOVA de três vias, seguida pelo *post-hoc* de Duncan. \*\*\*  $p < 0,001$ , \*\*  $p < 0,01$ , quando comprado ao grupo controle. ##  $p < 0,01$ , quando comprado ao grupo tratado com MeHg. <sup>n.s.</sup> não significativo entre os grupos indicados. Os resultados estão expressos como percentual do controle e as barras representam a média  $\pm$  E.P.M de 5-7 experimentos.

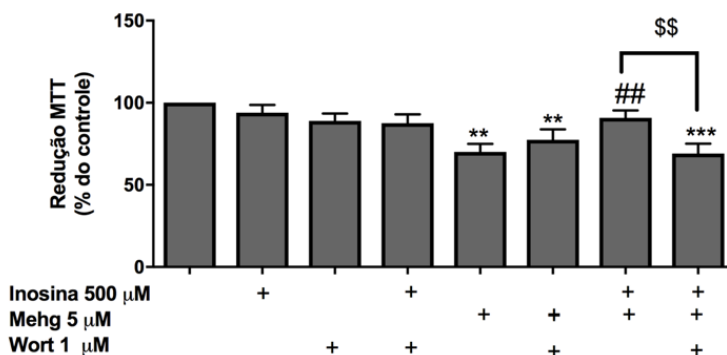
O tratamento com inosina alterou a fosforilação de AKT [ANOVA de uma via:  $F(1,32)=6,18$ ,  $p < 0,05$ ]. As análises de *post-hoc* indicaram que o tratamento com inosina por 15 min propiciou um aumento da fosforilação de AKT (figura 44).



**Figura 44. Efeito do tratamento com inosina na fosforilação de AKT. Os cultivos celulares foram incubados por diferentes tempos (15 minutos, 1 hora ou 6 horas) com inosina (500 μM).** As amostras controle (C) se referem aos cultivos celulares que não foram tratados com inosina. Uma imagem representativa para a quantificação realizada entre a D.O. entre a banda P-AKT e a banda de T-AKT está representada. Os resultados da quantificação estão expressos como percentual do controle e as barras representam a média ± E.P.M de 5-6 experimentos. \*\*  $p < 0,01$ . ANOVA de uma via seguida do teste *post-hoc* de Duncan.

Visando avaliar se a ativação de AKT esta relacionada aos efeitos de inosina na viabilidade celular, as células foram tratadas com wortmanina, um inibidor de PI3K e consequente ativação de AKT. A ANOVA de três vias indicou um efeito na redução do MTT para o tratamento com MeHg [F(1,48)=20,60,  $p < 0,001$ ], nenhum efeito com inosina [F(1,48)=0,12,  $p > 0,05$ ], e um efeito para o tratamento com wortmanina [F(1,48)=5,27,  $p < 0,05$ ]. Adicionalmente não foi verificada um interação entre os tratamentos com inosina e MeHg [F(1,48)=2,03,  $p > 0,05$ ], mas uma interação entre os tratamentos com inosina, MeHg e wortmanina [F(1,48)=5,96,  $p < 0,05$ ]. As análises de *post-hoc* indicaram que o efeito neuroprotetor de inosina (500 μM) frente à queda da redução

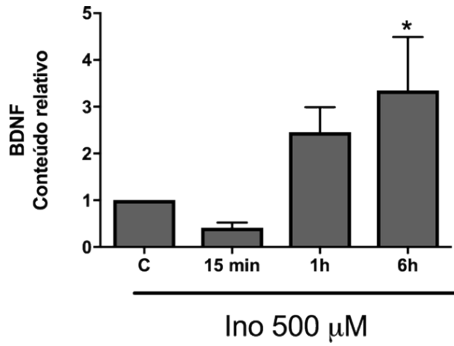
do MTT induzido por MeHg (5  $\mu$ M) foi prevenido pelo tratamento com wortmanina (figura 45).



**Figura 45.** Efeito do pré-tratamento wortmanina (inibidor seletivo de PI3K), no efeito neuroprotetor de inosina frente a queda da redução do MTT induzido por MeHg. As células foram pré-incubadas por 30 minutos com wortmanina e o teste da redução do MTT foi realizado 6 horas após a incubação com inosina (500  $\mu$ M) e MeHg (5  $\mu$ M). ANOVA de três vias, seguida pelo *post-hoc* de Duncan. \*\*\*  $p < 0,001$ , \*\*  $p < 0,01$ , quando comparado ao grupo controle. ##  $p < 0,01$ , quando comparado ao grupo tratado com MeHg. \$\$\$  $p < 0,01$  entre os grupos indicados. Os resultados estão expressos como percentual do controle e as barras representam a média  $\pm$  E.P.M de 5-7 experimentos.

#### 5.4.8 Efeito do tratamento com inosina na expressão de BDNF.

Para avaliar o efeito do tratamento com inosina na expressão do RNAm para BDNF, as células foram tratadas com inosina por 15 min, 1 hora, ou 6 horas, sendo o RNA foi extraído para análises RT-qPCR. A ANOVA de uma via indicou um efeito do tratamento com inosina no conteúdo relativo do RNAm para BDNF [ $F(3,16) = 4,50$   $p < 0,05$ ]. Foi observado um aumento significativo na expressão de BDNF 6 horas após o tratamento com inosina (Figura 46).



**Figura 46. Efeito do tratamento com inosina na expressão relativa de BDNF.** ANOVA de uma via seguida pelo *post-hoc* de Duncan \*  $p < 0,05$  quando comparado ao grupo controle. Resultados expressos como expressão relativa ao controle e as barras representam a média  $\pm$  E.P.M de 5 experimentos.



## 5.5 Discussão

A contaminação ambiental por metais é um fator de risco para a saúde pública e o SNC é um importante alvo para a ação destes agentes tóxicos. Apesar de as contaminações por MeHg provenientes de fontes antropogênicas (similares aos desastres de Minamata e Nagata ocorrido nas décadas de 50 e 60 do século XX), terem diminuído nos últimos anos, a contaminação ambiental por este metal continua sendo uma fonte de preocupação global (CASTOLDI *et al.*, 2001; CECCATELLI *et al.*, 2013). O consumo de peixes e frutos do mar contaminados com MeHg constituem uma das principais fontes de contaminação dos seres humanos para esse toxicante, especialmente em populações que consomem grandes quantidades de peixes predatórios. Dessa maneira, algumas recomendações da organização mundial de saúde preconizam que o consumo semanal tolerável (do inglês *tolerable weekly intake* – TWI) para MeHg deve ser inferior a 1,6 µg/kg de peso corporal, para prevenir danos neurológicos decorrentes da exposição a esse toxicante (CECCATELLI, DARE e MOORS, 2010; CECCATELLI *et al.*, 2013). Contudo, existe uma séria preocupação que em países que consomem grande quantidade de peixes a população possa estar sendo exposta a valores superiores a TWI para MeHg (DEBES *et al.*, 2006; CECCATELLI *et al.*, 2013). Uma vez que não existem alternativas completamente eficazes contra o dano causado pela intoxicação por MeHg, a busca por novos tratamentos pode ser justificada. Os resultados desse trabalho demonstraram de forma inédita que o tratamento com inosina foi capaz de prevenir o efeito citotóxico de MeHg em culturas primárias de astrócitos provenientes de ratos neonatos. Adicionalmente os resultados desse trabalho ajudam a elucidar os mecanismos moleculares associados aos efeitos de inosina. Os resultados deste trabalho indicam que inosina pode ativar o receptor A<sub>3</sub> de adenosina em astrócitos e modular uma sinalização celular que possivelmente estimula a atividade de Nrf2, um importante fator de transcrição relacionado a defesa antioxidante. Esses efeitos neuroprotetores da inosina são de extrema relevância, não apenas no contexto da intoxicação por MeHg, mas sugerem que essa purina pode diminuir a neurotoxicidade associada a outros metais ou a outras doenças neurológicas e psiquiátricas que tenham base fisiopatológica similar.

Os recentes avanços relacionados a compreensão do papel dos diferentes tipos celulares no SNC tem evidenciado o papel crucial dos astrócitos na manutenção da homeostase do SNC. Essas células estão associadas a formação da BHE, regulam o nível extracelular de potássio

e contribuem para a regulação do pH cerebral (BARRETO *et al.*, 2011; POSADA-DUQUE, BARRETO e CARDONA-GOMEZ, 2014). Adicionalmente os astrócitos podem controlar a função microvascular no SNC e estocam glicogênio, contribuindo para a manutenção do metabolismo neuronal (ANDERSON e NEDERGAARD, 2003; BARRETO *et al.*, 2011; BARRETO, 2016). Os astrócitos também são capazes de se comunicar através de junções *gap* que permitem o transporte de substâncias, suporte trófico e eliminação de substâncias e metabólitos tóxicos provenientes do espaço extracelular (TAKUMA, BABA e MATSUDA, 2004; BARRETO, 2016). Essas células também são reconhecidas pelo seu papel crucial na modulação da circuitaria neural, regulando a formação, maturação, atividade e plasticidade de redes neuronais envolvidas em processos sensoriais, cognitivos, emocionais e relacionados ao processamento da informação (DALLERAC e ROUACH, 2016). A participação dos astrócitos na regulação das funções sinápticas pode estar associada a liberação de neurotransmissores e neuromoduladores como glutamato ou ATP por essas células (PEREA e ARAQUE, 2005). Conforme mencionado na introdução do capítulo 1 dessa tese, os astrócitos tem um papel crucial na regulação dos níveis extracelulares de glutamato, exercendo um importante papel na regulação da neurotransmissão glutamatérgica. Diante de tantas funções importantes, pode-se esperar que disfunções no funcionamento e metabolismo dessas células irão implicar de maneira significativa na função e manutenção do SNC. Em doenças neurodegenerativas, como doença de Alzheimer, Parkinson e Huntington, que normalmente cursam com neuroinflamação, pode ser observado um fenômeno denominado astrogliose, caracterizado por uma reatividade astrocitária que pode estar associada a morte neuronal (BARRETO, 2016; DALLERAC e ROUACH, 2016). Por outro lado, em doenças psiquiátricas como a depressão é observado uma diminuição de células astrocitárias no CPF, hipocampo e amígdala tanto em pacientes diagnosticados com essa doença quanto em modelos animais de depressão (RAJKOWSKA *et al.*, 1999; COTTER *et al.*, 2002; CZECH *et al.*, 2006). Compostos com ação antidepressiva como a fluoxetina, são capazes de recuperar a perda astrocitária observada na depressão (CZECH *et al.*, 2006; RIAL *et al.*, 2015).

Os resultados desse trabalho indicaram que MeHg foi capaz de induzir um efeito citotóxico nos astrócitos provenientes de ratos neonatos. A exposição das culturas primárias de astrócitos a MeHg na concentração de 5  $\mu$ M por 6 ou 24 horas foi capaz de diminuir a redução de MTT e aumentar a liberação de LDH, indicando que esse toxicante induziu morte

celular nessas condições (figuras 33 e 34). Estes achados corroboram dados prévios da literatura que indicam que a exposição *in vitro* de culturas primárias de astrócitos ao MeHg (5  $\mu$ m) resultaram em um efeito citotóxico com perfil similar aos resultados obtidos nesse estudo (WORMSER *et al.*, 2012; PIEROZAN *et al.*, 2016). Diversos estudos têm indicado que os astrócitos constituem um dos principais alvos nas intoxicações por MeHg (SHANKER, SYVERSEN e ASCHNER, 2003; NI *et al.*, 2012). A captação de MeHg pelos astrócitos pode ocorrer através dos transportadores do tipo LAT, especificamente os transportadores LAT1, devido as similaridades entre o complexo MeHg/Cisteína e o aminoácido metionina (ASCHNER *et al.*, 1990). O MeHg pode induzir alterações morfológicas nos astrócitos como o *swelling* (“inchaço”), alterar a captação de glutamato por essas células, ou até mesmo induzir a morte celular, sendo o efeito tóxico do MeHg nos astrócitos pode conduzir ao dano neuronal e aos diversos efeitos decorrentes da exposição a esse toxicante (SHANKER, SYVERSEN e ASCHNER, 2003). Os astrócitos também podem exercer um papel protetor, por prevenir a morte neuronal induzida por MeHg. Neste sentido, é válido mencionar que uns dos mecanismos sugeridos para essa proteção envolve a liberação de ATP por essas células, que é hidrolisado formando adenosina e ativando os receptores A<sub>1</sub> neuronais e exercendo neuroproteção (NOGUCHI *et al.*, 2013).

Adicionalmente, o tratamento com inosina (50-1000  $\mu$ M) foi capaz de prevenir a queda na viabilidade celular induzida por MeHg. Apesar de a ANOVA de duas vias não indicar uma interação significativa entre os tratamentos com inosina e MeHg, os resultados referentes a liberação de LDH (figura 34) apresentaram um perfil semelhante aos resultados da redução do MTT. Inosina é uma purina endógena capaz de induzir uma série de efeitos biológicos, como neuroproteção, antinocicepção e atividade antidepressiva (HASKO, SITKOVSKY e SZABO, 2004; KASTER *et al.*, 2013; NASCIMENTO *et al.*, 2014). A inosina *per se* não alterou a viabilidade celular em nenhuma das concentrações ou tempos avaliados, indicando que essa purina não possuiu efeitos tóxicos nas condições avaliadas nesse trabalho. O co-tratamento de inosina com MeHg por 6 horas foi capaz de prevenir a morte celular induzida por esse toxicante, contudo o co-tratamento por 24 h não foi capaz de prevenir o efeito citotóxico de MeHg. Adicionalmente, o pré-tratamento das culturas por 24 horas seguidos da exposição à MeHg e inosina por 24 horas adicionais, foi capaz de prevenir o efeito citotóxico do MeHg. Esses resultados indicam que em tempos maiores de exposição

ao MeHg, e consequente maior toxicidade, a pré-incubação das células com inosina é essencial para os efeitos protetores observados, possivelmente por aumentar as defesas celulares de maneira mais efetiva. Uma vez que a concentração de 500  $\mu\text{M}$  apresentou em efeito protetor que foi consistente entre os diferentes tempos avaliados, essa dose foi escolhida para avaliar os diferentes efeitos neuroquímicos de inosina. Os resultados apresentados neste capítulo indicam que a inosina é capaz de prevenir a morte celular em astrócitos induzido por MeHg, corroborando achados da literatura indicando que inosina pode prevenir a morte celular *in vitro* induzida por peróxido de hidrogênio, zinco ou por isquemia (HAUN *et al.*, 1996; LITSKY *et al.*, 1999; SHI *et al.*, 2002; CIPRIANI, BAKSHI e SCHWARZSCHILD, 2014).

O tratamento das culturas com MeHg na dose de 5  $\mu\text{M}$  foi capaz de aumentar a fluorescência de  $\text{H}_2\text{DCFDA}$ , indicando a formação de ERO. Esses resultados estão de acordo com resultados prévios que indicaram que o MeHg (5  $\mu\text{M}$ ) induziu um aumento na produção de  $\text{F}_2$ -isoprostanos, um biomarcador de peroxidação lipídica e estresse oxidativo (WORMSER *et al.*, 2012). Adicionalmente já foi relatado um aumento mitocondrial de ânion superóxido, peróxido de hidrogênio e radical hidroxil causados por MeHg em culturas primárias de astrócitos (YIN *et al.*, 2011). O aumento na produção de espécies reativas de oxigênio constitui um mecanismo chave nos efeitos tóxicos decorrentes da exposição ao MeHg (ASCHNER *et al.*, 2007). Alterações na atividade dos complexos da cadeia transportadora de elétrons induzidas por esse toxicante, constituem umas das fontes iniciais na produção de ERO (GLASER *et al.*, 2010b; FARINA, ASCHNER e ROCHA, 2011). A peroxidação lipídica secundária a alterações na permeabilidade celular e mitocondrial, envolvendo depleção de GSH e aumento de cálcio mitocondrial alimentam um círculo vicioso através do qual as alterações na produção de ERO, levam a disfunção e morte celular. Adicionalmente, o aumento na produção de ERO pode prejudicar a atividade de transportadores de glutamato levando ao aumento nos níveis extracelulares desse neurotransmissor e morte neuronal (FARINA, ASCHNER e ROCHA, 2011). Inesperadamente, não foram observadas alterações nos níveis de glutathiona total e reduzida após a exposição das culturas por 6 horas a MeHg ou inosina, o que difere de várias evidências na literatura que indicam a redução dos níveis de GSH, ou da relação GSH/GSSG em decorrência da exposição ao MeHg (WANG *et al.*, 2009; FARINA, ASCHNER e ROCHA, 2011; NI *et al.*, 2011). Uma vez que GSH, principalmente na sua forma reduzida é uma molécula com relativa

baixa estabilidade, podemos especular que a metodologia utilizada nesse trabalho não forneceu as condições e sensibilidade necessárias para verificar o efeito de MeHg nesses parâmetros, sendo que outras metodologias estão sendo aplicadas em estudos em andamento para verificar o efeito de MeHg e inosina nos níveis de GSH.

A inosina foi capaz de prevenir o aumento na produção de ERO induzido por MeHg *in vitro*, corroborando a hipótese da relação entre diminuição de ERO e consequente diminuição do estresse oxidativo e efeito protetor contra MeHg. Apesar de inosina apresentar uma relevante ação neuroprotetora contra isquemia - situação normalmente associada ao aumento na produção de ERO e estresse oxidativo - (HAUN *et al.*, 1996; JURKOWITZ *et al.*, 1998; SHEN *et al.*, 2005), existem poucos dados na literatura que indicam que essa purina pode atenuar danos causados pelo estresse oxidativo. Por exemplo, foi demonstrado que a inosina pode prevenir dano ao DNA causado pela exposição *in vitro* à radiação ultravioleta (GUDKOV *et al.*, 2006). Inosina também preveniu o aumento nos níveis de proteínas carboniladas (marcador de dano oxidativo) causadas pelo tratamento *in vitro* com peróxido de hidrogênio (CIPRIANI, BAKSHI e SCHWARZSCHILD, 2014), e aumentou a capacidade antioxidante plasmática em pacientes portadores da doença de Parkinson (BHATTACHARYYA *et al.*, 2016). Além disso, é válido mencionar que foi demonstrado que adenosina (que possui uma estrutura química semelhante à inosina) preveniu o aumento na produção de ERO, medidos pela fluorescência do H<sub>2</sub>DCFDA, em cultura de micróglia expostas a peróxido de hidrogênio (MIN *et al.*, 2008).

Alguns autores afirmam que a modulação farmacológica do fator de transcrição Nrf2 pode constituir uma interessante estratégia para neuroproteção contra os danos causados por MeHg (WANG *et al.*, 2009). Nrf2 é um fator de transcrição que quando ativado se liga ao ARE no DNA ativando a transcrição de diferentes genes relacionados a defesa antioxidante (BRYAN *et al.*, 2013). Primariamente avaliamos por RT-qPCR, se inosina poderia aumentar a transcrição de genes relacionados a ativação desse fator de transcrição. A ativação de Nrf2 por inosina pode ser sugerida uma vez que o tratamento por 6 horas aumentou de maneira significativa o conteúdo relativo do RNAm de NQO-1. O conteúdo relativo de HO-1 não foi alterado pelo tratamento com inosina por 15 min, 1 hora ou 6 horas. Contudo, não podemos descartar a possibilidade de inosina modular a transcrição desse gene em tempos que não foram avaliados nesse estudo. Por outro lado, foi observado um aumento no conteúdo relativo do RNAm para Nrf2 após 6 horas de tratamento com inosina. Uma vez que Nrf2 pode controlar a sua própria transcrição

(KWAK *et al.*, 2002; BRYAN *et al.*, 2013) esse resultado corrobora a hipótese da ativação de Nrf2 por essa purina.

Em condições fisiológicas, Nrf2 está presente em baixas quantidade principalmente no citoplasma celular de maneira inativa associado a proteína Keap-1. Contudo, durante situações de estresse celular ou ativação de proteínas cinases, podem levar a dissociação entre Nrf2 e Keap-1, permitindo a translocação de Nrf2 para o núcleo celular e ativando a transcrição gênica (CALKINS *et al.*, 2009). Através da análise de imagens de culturas primárias de astrócitos (figura 37), foi possível verificar que o tratamento com inosina por 6 horas aumentou o imunocontéudo de Nrf2 no núcleo celular. Esses resultados indicam que o tratamento com essa purina promoveu a translocação de Nrf2 do citoplasma para o núcleo, corroborando com os resultados anteriores que mostram o aumento na transcrição de genes relacionados a ativação desse fator de transcrição. Também foi verificado se a inosina poderia modificar o conteúdo total de Nrf2 através de análises de *western-blotting*. Apesar de Nrf2 ter um peso molecular predito de 55-65 kDa, nas condições de eletroforese desnaturante normalmente utilizadas nesse trabalho (SDS-PAGE), essa proteína apresenta um peso molecular aparente de 110 kDa, sendo que a quantificação dessa banda é considerada a maneira correta na avaliação dos resultados de western blotting para Nrf2 (LAU *et al.*, 2013). Contudo não foi observado diferenças estatísticas no imunocontéudo de Nrf2 após 15 minutos, 1 hora ou 6 horas de tratamento com inosina. Adicionalmente não foram observadas diferenças estatísticas na ativação de ARE, decorrente da transfecção do plasmídeo ARE-luciferase. Outras estratégias de transfecção (plasmídeos de diferentes origens, e outros reagentes para transfecção) estão sendo realizadas para fornecer evidências adicionais da possível ativação de Nrf2 por inosina.

Interessante que também MeHg pode induzir a ativação de Nrf2. Esses efeitos podem ocorrer de maneira rápida, e alguns trabalhos indicam que o tratamento por 90 minutos com MeHg é capaz de induzir a translocação de Nrf2 para o núcleo celular (WANG *et al.*, 2009), contudo os mecanismos relacionados a esses efeitos não estão totalmente esclarecidos. Ainda que essa ativação de Nrf2 ocorra como um mecanismo de defesa celular, os efeitos de MeHg em Nrf2 não são suficientes para prevenir o dano oxidativo causado por esse toxicante (KUMAGAI *et al.*, 2013). A ativação de Nrf2 por inosina pode contribuir na defesa antioxidante celular e consequentemente ter efeito protetor contra a toxicidade induzida por MeHg. Estes achados estão de acordo com outros trabalhos que demonstram que compostos capazes de estimular a atividade desse fator de transcrição podem ter efeito protetor

contra MeHg (FARINA, ASCHNER e ROCHA, 2011; KUMAGAI *et al.*, 2013; LIU *et al.*, 2016; FENG *et al.*, 2017).

Uma vez que os resultados do capítulo 1 desse trabalho indicaram que inosina pode modular a atividade de diferentes enzimas de sinalização celular, foi investigado se os efeitos neuroprotetores de inosina envolviam a ativação de MEK/ERK e PI3K/AKT.

A ativação de MEK/ERK parece não estar envolvida no efeito neuroprotetor de inosina. O pré tratamento das culturas com U0126, um inibidor de MEK que inibe a fosforilação e ativação de ERK 1/2, não alterou os efeitos neuroprotetores de inosina. Adicionalmente a fosforilação de ERK 1/2 não foi alterada pelo tratamento por 15 minutos, 1 hora ou 6 horas com essa purina. Conforme discutido no capítulo 1 desse trabalho, o efeito tipo-antidepressivo de inosina envolveu a ativação de MEK/ERK, o que corrobora com dados prévios na literatura indicando a relação da ativação dessa via de sinalização com os efeitos de inosina (TOMASELLI *et al.*, 2005). Contudo é válido mencionar que essas discrepâncias nos resultados podem ser devido aos diferentes tipos celulares analisados. Alguns desses estudos utilizaram cultivos primários de neurônios ou células PC12, indicando que nesses tipos celulares a modulação de ERK 1/2 foi um elemento chave na resposta neuroprotetora de inosina (TOMASELLI *et al.*, 2005; MUTO *et al.*, 2014). Diferentemente, o presente trabalho se concentrou na determinação destes efeitos em astrócitos. Isso sugere que inosina pode modular a sinalização celular de maneira distinta em diferentes tipos celulares. Adicionalmente a ativação de ERK 1/2, pode estar associada a respostas neurotóxicas em astrócitos, sendo que alguns trabalhos relataram um aumento na fosforilação de ERK 1/2 induzido por MeHg (YIN *et al.*, 2011).

O tratamento das culturas primárias de astrócitos com inosina induziu um aumento transitório na fosforilação do resíduo ser-473 de AKT, sendo que a fosforilação desse resíduo está associada a ativação de AKT (BRAZIL e HEMMING, 2001). Esse aumento transitório na ativação de AKT pode repercutir no efeito neuroprotetor de inosina, uma vez que o pré-tratamento com wortmanina (inibidor de PI3K e consequente ativação de AKT) preveniu o efeito neuroprotetor dessa purina contra a citotoxicidade de MeHg. A ativação de AKT por inosina corrobora dados prévios que indicam que essa purina estimulou a fosforilação de AKT *in vitro* (GAO *et al.*, 2001), e com os resultados apresentados no capítulo 1 deste trabalho que indicam a relação entre a ativação de AKT e o efeito tipo-antidepressivo de inosina. A ativação de AKT pode levar a sobrevivência celular, principalmente pela fosforilação e inibição de alvos intracelulares relacionados a morte celular como a

proteína BAD, inibição do fator de transcrição forkhead (envolvida na transcrição de proteínas relacionadas a morte celular) e ativação de caspase-9 (MANNING e CANTLEY, 2007). Nesse sentido, a ativação de AKT tem sido relacionada a neuroproteção contra a toxicidade do MeHg em astrócitos (WANG *et al.*, 2009). Um dos fatores que pode ser relacionado com o potencial neuroprotetor de AKT é a relação dessa via de sinalização com ativação Nrf2. Diversos trabalhos têm evidenciado que ativação de AKT está relacionada à ativação de Nrf2 e transcrição de genes antioxidantes, em concordância com os resultados desse trabalho que indicaram uma ativação de AKT, ativação de Nrf2 e neuroproteção (CALKINS *et al.*, 2009; WANG *et al.*, 2009; DE OLIVEIRA *et al.*, 2015; WANG *et al.*, 2016). Os mecanismos exatos da relação entre AKT e Nrf2 ainda não estão elucidados. Uns dos possíveis mecanismos dessa interação podem envolver a participação de GSK-3 $\beta$ . A enzima GSK-3 $\beta$  pode ativar membros da família Src cinases (Fyn), que por sua vez a podem fosforilar e inibir o Nrf2 por removê-lo do núcleo da célula. A ativação de AKT levaria a fosforilação e inibição de GSK-3 $\beta$ , diminuindo esse efeito repressor na atividade de Nrf2 (JAIN e JAISWAL, 2007; ROJO, SAGARRA e CUADRADO, 2008; CHEN *et al.*, 2016). Uma vez que os resultados do capítulo 1 indicaram uma modulação da sinalização envolvendo PI3K/AKT/GSK-3 $\beta$  por inosina, estudos adicionais serão necessários para avaliar se esses efeitos estão associados ao efeito neuroprotetor dessa purina.

Devido a similaridade estrutural entre inosina e adenosina, inosina pode induzir uma série de respostas protetoras ou tróficas por meio da ativação de receptores A<sub>1</sub>, A<sub>2A</sub> e A<sub>3</sub> (JIN *et al.*, 1997; GOMEZ e SITKOVSKY, 2003; SHEN *et al.*, 2005; RAHIMIAN *et al.*, 2010; MUTO *et al.*, 2014). Os resultados desse capítulo indicaram que o pré-tratamento com PSB36 e SCH58261, que nas doses utilizadas são capazes de antagonizar os receptores A<sub>1</sub> e A<sub>2A</sub> *in vitro* (PANATIER *et al.*, 2011; GESSI *et al.*, 2013), não alteram os efeitos de inosina. Esses resultados sugerem que a ativação desses receptores não está envolvida no efeito neuroprotetor de inosina. Por outro lado, o pré-tratamento das culturas com MRS1523, um antagonista seletivo de receptores A<sub>3</sub>, aboliu o efeito neuroprotetor de inosina, o que indica a ativação do receptor A<sub>3</sub> nesses efeitos. Esses dados estão de acordo com dados prévios na literatura que indicam que esse antagonista pode prevenir alguns efeitos envolvendo a ativação do receptor A<sub>3</sub> em astrócitos (GESSI *et al.*, 2013).

Adicionalmente, o envolvimento do receptor A<sub>3</sub> no efeito neuroprotetor de inosina contra o dano celular induzido por MeHg



corroborar dados na literatura que indicam a relação da ativação desse receptor com efeito neuroprotetor dessa purina. Inosina preveniu o dano causado pela isquemia cerebral em ratos, sendo esse efeito dependente da ativação do receptor A<sub>3</sub> (SHEN *et al.*, 2005). A ativação desses receptores pode estar associada a eventos tanto de morte quanto sobrevivência celular (VON LUBITZ *et al.*, 1994; ABBRACCHIO *et al.*, 1997). A ativação de receptores A<sub>3</sub> preveniu os efeitos citotóxicos induzidos por hipóxia em culturas primárias de astrócitos (BJORKLUND *et al.*, 2008) e preveniu o dano cognitivo e perda neuronal observados em modelos animais de isquemia *in vivo* (FEDOROVA *et al.*, 2003; CHEN *et al.*, 2006). Adicionalmente, a deleção genética de receptor A<sub>3</sub> aumentou a vulnerabilidade de astrócitos submetidos a privação de oxigênio *in vitro* e aumentou os danos causados pela isquemia *in vivo* (FEDOROVA *et al.*, 2003; BJORKLUND *et al.*, 2008). A ativação de receptores A<sub>3</sub> pode levar a ativação de PI3K e fosforilação de AKT (GAO *et al.*, 2001), e como já mencionado o efeito neuroprotetor de inosina contra a neurotoxicidade do MeHg envolveu a ativação da sinalização de PI3K/AKT. Adicionalmente os resultados da figura 41, indicaram uma tendência do tratamento com antagonista de receptor A<sub>3</sub> abolirem o aumento do RNAm para Nrf2 induzido por inosina. Dessa maneira, podemos especular que nessa situação a ativação do receptor A<sub>3</sub> por inosina pode ativar a sinalização de PI3K/AKT e modulação de Nrf2, conferindo neuroproteção contra a morte celular induzida por MeHg.

Além desses efeitos relacionados à atividade direta de inosina, não pode ser descartada a possibilidade do envolvimento de diferentes metabólitos dessa purina nos efeitos observados. Inosina pode ser convertida a hipoxantina e ribose-1-fosfato, em uma reação catalizada pela enzima nucleosídeo fosforilase, sendo essa enzima expressa em astrócitos. Hipoxantina por sua vez pode ser convertida a xantina e subsequentemente a ácido úrico numa reação catalisada pela xantina oxidase. Como já mencionado anteriormente alguns trabalhos tem indicado que inosina pode exercer seus efeitos através de ácido úrico, principalmente pela atividade antioxidante deste composto (SCHWARZSCHILD *et al.*, 2013). Já foi demonstrado que o efeito neuroprotetor de inosina foi prevenido através da inibição da enzima nucleosídeo fosforilase e consequente formação de hipoxantina, porém o tratamento com hipoxantina não foi capaz de exercer ação neuroprotetora *in vitro* ou *in vivo* (HAUN *et al.*, 1996; LITSKY *et al.*, 1999; SHEN *et al.*, 2005). Apesar de o urato exercer uma importante atividade antioxidante e neuroprotetora, inclusive em cultura primária de astrócitos (BAKSHI *et al.*, 2015), foi observado que o tratamento de culturas mistas

(contendo astrócitos) com inosina aumentou o conteúdo de hipoxantina tanto no meio extracelular quanto no meio intracelular, porém sem alteração nos níveis de ácido úrico (CIPRIANI, BAKSHI e SCHWARZSCHILD, 2014). Dessa maneira, estudos adicionais serão necessários para elucidar o papel dos metabólitos de inosina nos efeitos neuroprotetores frente ao MeHg. Também é importante mencionar que a reação catalisada pela nucleosídeo fosforilase além de formar hipoxantina, é capaz de formar ribose-1-fosfato a partir de inosina. Ribose-1-fosfato pode ser convertida em intermediários da glicólise e aumentar os níveis intracelulares de ATP, sendo este um dos mecanismos associados ao efeito neuroprotetor de inosina em modelos *in vitro* de isquemia (JURKOWITZ *et al.*, 1998). Uma vez que a exposição a MeHg está associada à disfunção mitocondrial, inibição de complexos da cadeia respiratória e disfunção na produção de ATP (GLASER *et al.*, 2010b; FARINA, ASCHNER e ROCHA, 2011; FARINA, ROCHA e ASCHNER, 2011), o aumento de ATP por inosina pode contribuir para o efeito neuroprotetor dessa purina contra o dano celular induzido por este toxicante. Contudo, os resultados desse trabalho demonstraram que o aumento dos níveis de ATP não é o único mecanismo observado nessas condições, já que a ativação do receptor  $A_3$  e da via da PI3K/AKT estão envolvidos no efeito neuroprotetor dessa purina. Esses resultados corroboram com dados na literatura relacionados à atividade neuroprotetora de inosina em células PC12, que não expressam a enzima nucleosídeo fosforilase e não podem gerar ATP a partir de inosina (SHI *et al.*, 2002).

Os astrócitos também podem liberar fatores de crescimento ou citocinas relacionadas a sobrevivência neuronal (WITTENDORP, BODDEKE e BIBER, 2004; KOYAMA, 2015). A liberação de BDNF por astrócitos pode conferir neuroproteção contra a morte neuronal induzida por MeHg *in vitro* (WITTENDORP, BODDEKE e BIBER, 2004), e a diminuição dos níveis de BDNF induzido por MeHg *in vivo* está associada ao comportamento pró-depressivo induzido pela exposição a este agente tóxico durante o desenvolvimento (ONISHCHENKO *et al.*, 2008). Adicionalmente alguns trabalhos indicam que inosina aumenta a transcrição de BDNF *in vitro* em culturas neuronais (MUTO *et al.*, 2014). Os resultados desse trabalho mostraram que o tratamento das culturas primárias com inosina por 6 horas aumentou o conteúdo relativo do RNAm para BDNF, corroborando os resultados do capítulo 1 que indicam que inosina pode estimular a fosforilação (ser-133) de CREB.

Os resultados desse capítulo indicaram o efeito protetor de inosina contra a toxicidade do MeHg *in vitro*, bem como o envolvimento

da ativação do receptor A<sub>3</sub> e da sinalização de PI3K/AKT nesses efeitos. Inosina também estimulou a translocação e ativação do fator de transcrição Nrf2, o que pode estimular a defesa celular contra os danos induzidos por MeHg, além de estimular a expressão de BDNF. Estes achados contribuem para o entendimento dos efeitos dessa purina no SNC, além de apresentarem um potencial terapêutico dessa purina em doenças do SNC associadas ao dano oxidativo.

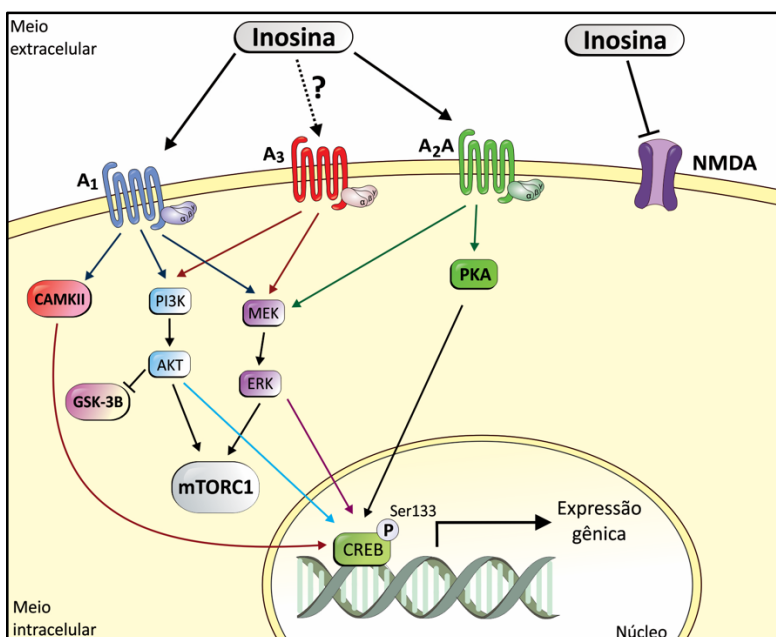
## 6 Considerações finais

Os resultados desse trabalho forneceram evidências farmacológicas e bioquímicas relacionadas aos efeitos desencadeados pela administração *in vivo* e *in vitro* de inosina, indicando a modulação de diferentes vias de sinalização relacionadas à ativação de receptores de adenosina por essa purina.

A figura 47 pode resumir de maneira esquemática os principais mecanismos neuroquímicos associados ao efeito tipo-antidepressivo da inosina em camundongos. Os resultados *in vivo* deste trabalho estão ser resumidos de maneira gr desse trabalho indicaram o envolvimento da ativação de PKA, PI3K/AKT, MEK/ERK, CaMKII e inibição de GSK- $\beta$  no efeito anti-imobilidade de inosina no TSC, sendo que a modulação dessas vias pode estar associada ao aumento na fosforilação de CREB observado após o tratamento com essa purina. Uma vez que já foi demonstrado que o efeito tipo-antidepressivo de inosina envolve a ativação dos receptores A<sub>1</sub> e A<sub>2A</sub> (KASTER *et al.*, 2013), e que esses receptores podem modular as vias de sinalização mencionadas anteriormente (CHEN, LEE e CHERN, 2014), podemos especular que a ativação desses receptores por inosina pode regular estas vias de sinalização, sendo esses efeitos moleculares correlacionados com o efeito tipo-antidepressivo desencadeado pela administração sistêmica de inosina. Contudo, não podemos excluir a possibilidade de os receptores A<sub>3</sub> estarem envolvidos nestes efeitos. Apesar da baixa expressão desse receptor no SNC, a deleção genética do receptor A<sub>3</sub> induz um efeito depressogênico em camundongos (FEDOROVA *et al.*, 2003). Inosina pode ser ligar com alta afinidade a esse receptor, além da ativação do receptor A<sub>3</sub> por essa purina ter efeito neuroprotetor contra a isquemia *in vivo* (JIN *et al.*, 1997; SHEN *et al.*, 2005). Adicionalmente, a ativação do receptor A<sub>3</sub> está relacionada à modulação de PI3K/AKT e MEK/ERK 1/2 (GAO *et al.*, 2001; CHEN, LEE e CHERN, 2014). Os resultados desse trabalho também sugerem que o efeito neuroprotetor *in vitro* de inosina foi prevenido pelo pré-tratamento com um antagonista do receptor A<sub>3</sub>, indicando a participação desse receptor nos efeitos desencadeados por essa purina. Dessa maneira, estudos adicionais serão necessários para elucidar o papel desse receptor nos efeito tipo-antidepressivo de inosina.

Outro conjunto de evidências deste trabalho indicaram o envolvimento da inibição de NMDAR e ativação de mTORC1 no efeito anti-imobilidade de inosina no TSC. Esses resultados sugerem que alguns dos mecanismos associados aos efeitos dessa purina são semelhantes aos mecanismos associados aos efeitos antidepressivos rápidos de cetamina.

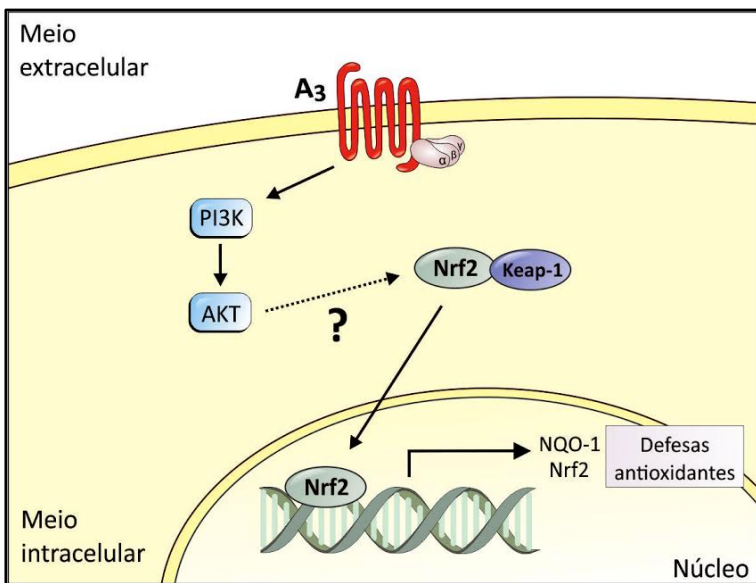
Dessa maneira, estudos adicionais serão necessários para investigar o possível efeito antidepressivo rápido de inosina, o que representa um grande potencial terapêutico no tratamento da depressão. Adicionalmente, o efeito inibitório de inosina em NMDAR pode estar relacionado com outros efeitos dessa purina, como por exemplo, a proteção contra o dano isquêmico (SHEN *et al.*, 2005), além de apontar o potencial neuroprotetor dessa purina em outras situações acompanhadas de hiperativação de NMDAR.



**Figura 47. Mecanismos moleculares associados ao efeito tipo-antidepressivo da inosina.** Resultados prévios da literatura indicam que a ativação dos receptores A<sub>1</sub> e A<sub>2A</sub>. Os resultados deste trabalho sugerem que o efeito tipo tipo-antidepressivo da inosina envolveu a ativação de MEK/ERK, PKA, CaMKII, AKT e mTORC1 e a inibição de GSK-3β e NMDAR.

Os resultados *in vitro*, que estão representados de maneira esquemática na figura 48, indicaram o potencial neuroprotetor de inosina contra o dano tóxico causado por MeHg em cultura primária de astrócitos, sendo esse efeito associado a ativação de PI3K/AKT e do receptor de A<sub>3</sub> de adenosina. Adicionalmente, inosina pode estimular a ativação do fator de transcrição Nrf2, sendo a ativação deste relacionada à transcrição de

genes associados a defesa antioxidante (BRYAN *et al.*, 2013). Esses resultados além de apresentar o potencial de inosina em prevenir danos decorrentes da exposição ao MeHg, indicam o potencial de inosina no tratamento de outras doenças associadas a disfunção glial e /ou estresse oxidativo. Nesse sentido, é válido mencionar a disfunção glial e perda astrocitária pode estar presente na fisiopatologia da depressão (RIAL *et al.*, 2015), reforçando ainda mais hipótese do papel dessa purina no tratamento deste transtorno de humor.



**Figura 48. Mecanismos moleculares associados ao efeito neuroprotetor *in vitro* da inosina em cultura de astrócitos.** Os resultados deste trabalho sugerem que o efeito neuroprotetor de inosina envolve a ativação dos receptores A<sub>3</sub> de adenosina e de PI3K/AKT. Além disso, inosina foi capaz de estimular a translocação de Nrf2 para o núcleo celular e estimular a transcrição de genes relacionados à ativação desse fator de transcrição como NQO-1 e do próprio Nrf2.

## 7 Conclusões

Os resultados provenientes deste trabalho possibilitaram elucidar alguns dos mecanismos associados aos efeitos tipo-antidepressivo e neuroprotetor da inosina. Entre os principais achados podemos destacar:

- O efeito tipo-antidepressivo de inosina no TSC envolveu a ativação de PI3K/AKT, CaMKII, MEK/ERK1,2, PKA, mTORC1, e inibição de NMDAR e GSK-3 $\beta$ ;
- A administração de uma única dose de inosina aumentou a fosforilação de CREB no hipocampo dos animais;
- Inosina preveniu a morte celular induzida por MeHg em cultura primária de astrócitos provenientes de ratos neonatos, e preveniu a formação de ERO induzidas por esse toxicante;
- O efeito protetor de inosina *in vitro* frente à exposição a MeHg envolveu a ativação dos receptores A<sub>3</sub> de adenosina e a sinalização de PI3K/AKT;
- O tratamento *in vitro* com inosina induziu a ativação do fator de transcrição Nrf2 e o aumento do RNAm para BDNF;

## 8 Perspectivas

- Avaliar a participação do receptor de adenosina A<sub>3</sub> no efeito tipo-antidepressivo da inosina;
- Verificar o efeito da administração i.p. de inosina nos níveis séricos e cerebrais de inosina e seus metabólitos. Verificar o efeito do tratamento com forodesina (inibidor da purina nucleosídeo fosforilase) nos níveis cerebrais basais de inosina e no comportamento tipo-antidepressivo dessa purina;
- Investigar o efeito antidepressivo de inosina em modelos animais de depressão induzidos pelo estresse crônico imprevisível ou pela administração sub-crônica de corticosterona. Investigar as alterações oxidativas presentes nos modelos pré-clínicos, bem como a expressão de GFAP em diferentes regiões cerebrais, e o efeito do tratamento com inosina nesses parâmetros;
- Investigar o possível efeito antidepressivo rápido de inosina em modelos animais de depressão induzidos pelo estresse crônico imprevisível ou pela administração sub-crônica de corticosterona;
- Utilizando diferentes técnicas de transfeccção (ex, plasmídeos contendo GFP-Nrf2), aprofundar o efeito de inosina na ativação de Nrf2;
- Investigar o potencial protetor de inosina contra os efeitos tóxicos e comportamentais decorrentes da exposição *in vivo* ao MeHg;



## 9 Referências Bibliográficas

ABBRACCHIO, M. P. *et al.* . G protein-dependent activation of phospholipase C by adenosine A3 receptors in rat brain. **Mol Pharmacol**, v. 48, n. 6, p. 1038-45, 1995.

ABBRACCHIO, M. P. *et al.* . Modulation of apoptosis by adenosine in the central nervous system: a possible role for the A3 receptor. Pathophysiological significance and therapeutic implications for neurodegenerative disorders. **Ann N Y Acad Sci**, v. 825, p. 11-22, 1997.

ADACHI, N. *et al.* . New insight in expression, transport, and secretion of brain-derived neurotrophic factor: Implications in brain-related diseases. **World J Biol Chem**, v. 5, n. 4, p. 409-28, 2014.

ALI-SISTO, T. *et al.* . Purine metabolism is dysregulated in patients with major depressive disorder. **Psychoneuroendocrinology**, v. 70, p. 25-32, 2016.

ALLEN, J. W.; SHANKER, G.; ASCHNER, M. Methylmercury inhibits the in vitro uptake of the glutathione precursor, cystine, in astrocytes, but not in neurons. **Brain Res**, v. 894, n. 1, p. 131-40, 2001.

ALMEIDA, R. C. *et al.* . Involvement of PKA, MAPK/ERK and CaMKII, but not PKC in the acute antidepressant-like effect of memantine in mice. **Neurosci Lett**, v. 395, n. 2, p. 93-7, 2006.

ANDERSON, C. M.; NEDERGAARD, M. Astrocyte-mediated control of cerebral microcirculation. **Trends Neurosci**, v. 26, n. 7, p. 340-4; author reply 344-5, 2003.

ARMSTRONG, S.; GANOTE, C. E. Adenosine receptor specificity in preconditioning of isolated rabbit cardiomyocytes: evidence of A3 receptor involvement. **Cardiovasc Res**, v. 28, n. 7, p. 1049-56, 1994.

ARNONE, D. *et al.* . State-dependent changes in hippocampal grey matter in depression. **Mol Psychiatry**, v. 18, n. 12, p. 1265-72, 2013.

ARUOMA, O. I. *et al.* . The antioxidant action of N-acetylcysteine: its reaction with hydrogen peroxide, hydroxyl radical, superoxide, and hypochlorous acid. **Free Radic Biol Med**, v. 6, n. 6, p. 593-7, 1989.

ASCHNER, M. Astrocytes as modulators of mercury-induced neurotoxicity. **Neurotoxicology**, v. 17, n. 3-4, p. 663-9, 1996.

ASCHNER, M. *et al.* . Methylmercury uptake in rat primary astrocyte cultures: the role of the neutral amino acid transport system. **Brain Res**, v. 521, n. 1-2, p. 221-8, 1990.

ASCHNER, M. *et al.* . Involvement of glutamate and reactive oxygen species in methylmercury neurotoxicity. **Braz J Med Biol Res**, v. 40, n. 3, p. 285-91, 2007.

ATTWELL, D.; GIBB, A. Neuroenergetics and the kinetic design of excitatory synapses. **Nat Rev Neurosci**, v. 6, n. 11, p. 841-9, 2005.

AUTRY, A. E.; MONTEGGIA, L. M. Brain-derived neurotrophic factor and neuropsychiatric disorders. **Pharmacol Rev**, v. 64, n. 2, p. 238-58, 2012.

AVIADO, D. M. Effects of fluorocarbons, chlorinated solvents, and inosine on the cardiopulmonary system. **Environ Health Perspect**, v. 26, p. 207-15, 1978.

BAKSHI, R. *et al.* . Neuroprotective effects of urate are mediated by augmenting astrocytic glutathione synthesis and release. **Neurobiol Dis**, v. 82, p. 574-9, 2015.

BALU, D. T. *et al.* . Differential regulation of central BDNF protein levels by antidepressant and non-antidepressant drug treatments. **Brain Res**, v. 1211, p. 37-43, 2008.

BANNERMAN, D. M. *et al.* . Regional dissociations within the hippocampus--memory and anxiety. **Neurosci Biobehav Rev**, v. 28, n. 3, p. 273-83, 2004.

BARANKIEWICZ, J.; COHEN, A. Purine nucleotide metabolism in resident and activated rat macrophages in vitro. **Eur J Immunol**, v. 15, n. 6, p. 627-31, 1985.

BARRETO, G. E. Targeting astrocytes in brain injuries: A translational research approach. **Prog Neurobiol**, v. 144, p. 1-4, 2016.

BARRETO, G. E. *et al.* . Astrocytic-neuronal crosstalk: implications for neuroprotection from brain injury. **Neurosci Res**, v. 71, n. 2, p. 107-13, 2011.

BEAULIEU, J. M. A role for Akt and glycogen synthase kinase-3 as integrators of dopamine and serotonin neurotransmission in mental health. **J Psychiatry Neurosci**, v. 37, n. 1, p. 7-16, 2012.

BEAULIEU, J. M.; GAINETDINOV, R. R.; CARON, M. G. Akt/GSK3 signaling in the action of psychotropic drugs. **Annu Rev Pharmacol Toxicol**, v. 49, p. 327-47, 2009.

BEHRENS, M. M. *et al.* . Ketamine-induced loss of phenotype of fast-spiking interneurons is mediated by NADPH-oxidase. **Science**, v. 318, n. 5856, p. 1645-7, 2007.

BELL, M. J. *et al.* . Interstitial adenosine, inosine, and hypoxanthine are increased after experimental traumatic brain injury in the rat. **J Neurotrauma**, v. 15, n. 3, p. 163-70, 1998.

BENOWITZ, L. I.; GOLDBERG, D. E.; IRWIN, N. Inosine stimulates axon growth in vitro and in the adult CNS. **Prog Brain Res**, v. 137, p. 389-99, 2002.

BENOWITZ, L. I. *et al.* . Inosine stimulates extensive axon collateral growth in the rat corticospinal tract after injury. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 96, n. 23, p. 13486-90, 1999.

BERNARD, R. *et al.* . Altered expression of glutamate signaling, growth factor, and glia genes in the locus coeruleus of patients with major depression. **Mol Psychiatry**, v. 16, n. 6, p. 634-46, 2011.

BERTON, O.; NESTLER, E. J. New approaches to antidepressant drug discovery: beyond monoamines. **Nat Rev Neurosci**, v. 7, n. 2, p. 137-51, 2006.

BERZAS NEVADO, J. J. *et al.* . Mercury in the Tapajós River basin, Brazilian Amazon: a review. **Environ Int**, v. 36, n. 6, p. 593-608, 2010.

BETTIO, L. E. *et al.* . Guanosine produces an antidepressant-like effect through the modulation of NMDA receptors, nitric oxide-cGMP and PI3K/mTOR pathways. **Behav Brain Res**, v. 234, n. 2, p. 137-48, 2012.

- BHATTACHARYYA, S. *et al.* . Oral Inosine Persistently Elevates Plasma antioxidant capacity in Parkinson's disease. **Mov Disord**, v. 31, n. 3, p. 417-21, 2016.
- BINDOKAS, V. P. *et al.* . Superoxide production in rat hippocampal neurons: selective imaging with hydroethidine. **J Neurosci**, v. 16, n. 4, p. 1324-36, 1996.
- BISEN-HERSH, E. B. *et al.* . Behavioral effects of developmental methylmercury drinking water exposure in rodents. **J Trace Elem Med Biol**, v. 28, n. 2, p. 117-24, 2014.
- BJORKLUND, O. *et al.* . Adenosine A1 and A3 receptors protect astrocytes from hypoxic damage. **Eur J Pharmacol**, v. 596, n. 1-3, p. 6-13, 2008.
- BLUM, D. *et al.* . A dual role of adenosine A2A receptors in 3-nitropropionic acid-induced striatal lesions: implications for the neuroprotective potential of A2A antagonists. **J Neurosci**, v. 23, n. 12, p. 5361-9, 2003.
- BOISON, D.; CHEN, J. F.; FREDHOLM, B. B. Adenosine signaling and function in glial cells. **Cell Death Differ**, v. 17, n. 7, p. 1071-82, 2009.
- BORNHORST, J. *et al.* . The effects of pdr1, djr1.1 and pink1 loss in manganese-induced toxicity and the role of alpha-synuclein in *C. elegans*. **Metalomics**, v. 6, n. 3, p. 476-90, 2014.
- BRAZIL, D. P.; HEMMINGS, B. A. Ten years of protein kinase B signalling: a hard Akt to follow. **Trends Biochem Sci**, v. 26, n. 11, p. 657-64, 2001.
- BROOKES, N.; KRISTT, D. A. Inhibition of amino acid transport and protein synthesis by HgCl<sub>2</sub> and methylmercury in astrocytes: selectivity and reversibility. **J Neurochem**, v. 53, n. 4, p. 1228-37, 1989.
- BROWN, E. S.; VARGHESE, F. P.; MCEWEN, B. S. Association of depression with medical illness: does cortisol play a role? **Biol Psychiatry**, v. 55, n. 1, p. 1-9, 2004.
- BRYAN, H. K. *et al.* . The Nrf2 cell defence pathway: Keap1-dependent and -independent mechanisms of regulation. **Biochem Pharmacol**, v. 85, n. 6, p. 705-17, 2013.

BUDNI, J. *et al.* . Involvement of PI3K, GSK-3beta and PPARgamma in the antidepressant-like effect of folic acid in the forced swimming test in mice. **J Psychopharmacol**, v. 26, n. 5, p. 714-23, 2012.

BURNSTOCK, G. An introduction to the roles of purinergic signalling in neurodegeneration, neuroprotection and neuroregeneration. **Neuropharmacology**, v. 104, p. 4-17, 2016.

BURNSTOCK, G.; FREDHOLM, B. B.; VERKHRATSKY, A. Adenosine and ATP receptors in the brain. **Curr Top Med Chem**, v. 11, n. 8, p. 973-1011, 2011.

CAITO, S. *et al.* . Methylmercury alters the activities of Hsp90 client proteins, prostaglandin E synthase/p23 (PGES/23) and nNOS. **PLoS One**, v. 9, n. 5, p. e98161, 2014.

CALKINS, M. J. *et al.* . The Nrf2/ARE pathway as a potential therapeutic target in neurodegenerative disease. **Antioxid Redox Signal**, v. 11, n. 3, p. 497-508, 2009.

CAPLAN, A. J. Hsp90's secrets unfold: new insights from structural and functional studies. **Trends Cell Biol**, v. 9, n. 7, p. 262-8, 1999.

CARMINATI, G. M. [Demonstration of the cardioprotective action of inosine on the hypofunctioning isolated heart]. **Boll Soc Ital Biol Sper**, v. 39, p. 468-70, 1963.

CARRUTHERS, A. M. *et al.* . Adenosine A(1) receptor-mediated inhibition of protein kinase A-induced calcitonin gene-related peptide release from rat trigeminal neurons. **Mol Pharmacol**, v. 59, n. 6, p. 1533-41, 2001.

CARVALHO, C. M. *et al.* . Inhibition of the human thioredoxin system. A molecular mechanism of mercury toxicity. **J Biol Chem**, v. 283, n. 18, p. 11913-23, 2008.

CASTOLDI, A. F. *et al.* . Neurotoxicity and molecular effects of methylmercury. **Brain Res Bull**, v. 55, n. 2, p. 197-203, 2001.

CASTREN, E. Is mood chemistry? **Nat Rev Neurosci**, v. 6, n. 3, p. 241-6, 2005.

CASTREN, E.; RANTAMAKI, T. The role of BDNF and its receptors in depression and antidepressant drug action: Reactivation of developmental plasticity. **Dev Neurobiol**, v. 70, n. 5, p. 289-97, 2010.

CECCATELLI, S. *et al.* . Long-lasting neurotoxic effects of exposure to methylmercury during development. **J Intern Med**, v. 273, n. 5, p. 490-7, 2013.

CECCATELLI, S.; DARE, E.; MOORS, M. Methylmercury-induced neurotoxicity and apoptosis. **Chem Biol Interact**, v. 188, n. 2, p. 301-8, 2010.

CELANO, E. *et al.* . Selective regulation of presynaptic calcium/calmodulin-dependent protein kinase II by psychotropic drugs. **Biol Psychiatry**, v. 53, n. 5, p. 442-9, 2003.

CERNICHIARI, E. *et al.* . The biological monitoring of prenatal exposure to methylmercury. **Neurotoxicology**, v. 28, n. 5, p. 1015-22, 2007.

CHANG, L.; KARIN, M. Mammalian MAP kinase signalling cascades. **Nature**, v. 410, n. 6824, p. 37-40, 2001.

CHARLESTON, J. S. *et al.* . Changes in the number of astrocytes and microglia in the thalamus of the monkey *Macaca fascicularis* following long-term subclinical methylmercury exposure. **Neurotoxicology**, v. 17, n. 1, p. 127-38, 1996.

CHATURVEDI, H. K.; BAPNA, J. S.; CHANDRA, D. Effect of fluvoxamine and N-methyl-D-aspartate receptor antagonists on shock-induced depression in mice. **Indian J Physiol Pharmacol**, v. 45, n. 2, p. 199-207, 2001.

CHEN, B. *et al.* . Increased hippocampal BDNF immunoreactivity in subjects treated with antidepressant medication. **Biol Psychiatry**, v. 50, n. 4, p. 260-5, 2001.

CHEN, G. J. *et al.* . Activation of adenosine A3 receptors reduces ischemic brain injury in rodents. **J Neurosci Res**, v. 84, n. 8, p. 1848-55, 2006.

CHEN, J. F.; LEE, C. F.; CHERN, Y. Adenosine receptor neurobiology: overview. **Int Rev Neurobiol**, v. 119, p. 1-49, 2014.

CHEN, M. J. *et al.* . Norepinephrine induces BDNF and activates the PI-3K and MAPK cascades in embryonic hippocampal neurons. **Cell Signal**, v. 19, n. 1, p. 114-28, 2007.

CHEN, X. *et al.* . GSK-3beta downregulates Nrf2 in cultured cortical neurons and in a rat model of cerebral ischemia-reperfusion. **Sci Rep**, v. 6, p. 20196, 2016.

CHEN, Z.; COBB, M. H. Regulation of stress-responsive mitogen-activated protein (MAP) kinase pathways by TAO2. **J Biol Chem**, v. 276, n. 19, p. 16070-5, 2001.

CHENG, P. *et al.* . Adenosine A1-Receptors Modulate mTOR Signaling to Regulate White Matter Inflammatory Lesions Induced by Chronic Cerebral Hypoperfusion. **Neurochem Res**, v. 41, n. 12, p. 3272-3277, 2016.

CHENG, Y. *et al.* . Adenosine A(1) receptor agonist N(6)-cyclohexyl-adenosine induced phosphorylation of delta opioid receptor and desensitization of its signaling. **Acta Pharmacol Sin**, v. 31, n. 7, p. 784-90, 2010.

CIPRIANI, S.; BAKSHI, R.; SCHWARZSCHILD, M. A. Protection by inosine in a cellular model of Parkinson's disease. **Neuroscience**, v. 274, p. 242-9, 2014.

CLARKSON, T. W. Molecular and ionic mimicry of toxic metals. **Annu Rev Pharmacol Toxicol**, v. 33, p. 545-71, 1993.

\_\_\_\_\_. The three modern faces of mercury. **Environ Health Perspect**, v. 110 Suppl 1, p. 11-23, 2002.

CLARKSON, T. W.; VYAS, J. B.; BALLATORI, N. Mechanisms of mercury disposition in the body. **Am J Ind Med**, v. 50, n. 10, p. 757-64, 2007.

COLLINGRIDGE, G. L.; LESTER, R. A. Excitatory amino acid receptors in the vertebrate central nervous system. **Pharmacol Rev**, v. 41, n. 2, p. 143-210, 1989.

CORDOVA, F. M. *et al.* . Manganese-exposed developing rats display motor deficits and striatal oxidative stress that are reversed by Trolox. **Arch Toxicol**, v. 87, n. 7, p. 1231-44, 2013.

CORSINI, F.; GRAZIA, G.; MEI, V. [Observations on the utilization of inosine on the part of the normal erythrocyte]. **Clin Pediatr (Bologna)**, v. 46, n. 11, p. 931-43, 1964.

COTTER, D. *et al.* . Reduced neuronal size and glial cell density in area 9 of the dorsolateral prefrontal cortex in subjects with major depressive disorder. **Cereb Cortex**, v. 12, n. 4, p. 386-94, 2002.

CUNHA, C.; BRAMBILLA, R.; THOMAS, K. L. A simple role for BDNF in learning and memory? **Front Mol Neurosci**, v. 3, p. 1, 2010.

CUNHA, M. P. *et al.* . Involvement of PI3K/Akt Signaling Pathway and Its Downstream Intracellular Targets in the Antidepressant-Like Effect of Creatine. **Mol Neurobiol**, 2015a.

CUNHA, M. P. *et al.* . Involvement of PKA, PKC, CAMK-II and MEK1/2 in the acute antidepressant-like effect of creatine in mice. **Pharmacol Rep**, v. 66, n. 4, p. 653-9, 2014.

CUNHA, M. P. *et al.* . Interaction of zinc with antidepressants in the tail suspension test. **Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry**, v. 32, n. 8, p. 1913-20, 2008.

CUNHA, M. P. *et al.* . The modulation of NMDA receptors and L-arginine/nitric oxide pathway is implicated in the anti-immobility effect of creatine in the tail suspension test. **Amino Acids**, v. 47, n. 4, p. 795-811, 2015b.

CUNHA, M. P. *et al.* . Creatine, similarly to ketamine, affords antidepressant-like effects in the tail suspension test via adenosine A and A receptor activation. **Purinergic Signal**, 2015c.

CUNHA, R. A. *et al.* . Potential therapeutic interest of adenosine A2A receptors in psychiatric disorders. **Curr Pharm Des**, v. 14, n. 15, p. 1512-24, 2008.

CZECH, B.; LUCASSEN, P. J. What causes the hippocampal volume decrease in depression? Are neurogenesis, glial changes and apoptosis implicated? **Eur Arch Psychiatry Clin Neurosci**, v. 257, n. 5, p. 250-60, 2007.

CZECH, B. *et al.* . Astroglial plasticity in the hippocampus is affected by chronic psychosocial stress and concomitant fluoxetine treatment. **Neuropsychopharmacology**, v. 31, n. 8, p. 1616-26, 2006.



D'SA, C.; DUMAN, R. S. Antidepressants and neuroplasticity. **Bipolar Disord**, v. 4, n. 3, p. 183-94, 2002.

DA ROCHA LAPA, F. *et al.* . Anti-inflammatory effects of inosine in allergic lung inflammation in mice: evidence for the participation of adenosine A2A and A3 receptors. **Purinergic Signal**, v. 9, n. 3, p. 325-36, 2013.

DALLERAC, G.; ROUACH, N. Astrocytes as new targets to improve cognitive functions. **Prog Neurobiol**, v. 144, p. 48-67, 2016.

DE MENDONCA, A.; RIBEIRO, J. A. Long-term potentiation observed upon blockade of adenosine A1 receptors in rat hippocampus is N-methyl-D-aspartate receptor-dependent. **Neurosci Lett**, v. 291, n. 2, p. 81-4, 2000.

DE MENDONCA, A.; SEBASTIAO, A. M.; RIBEIRO, J. A. Adenosine: does it have a neuroprotective role after all? **Brain Res Brain Res Rev**, v. 33, n. 2-3, p. 258-74, 2000.

DE OLIVEIRA, M. R. *et al.* . Role for the PI3K/Akt/Nrf2 signaling pathway in the protective effects of carnosic acid against methylglyoxal-induced neurotoxicity in SH-SY5Y neuroblastoma cells. **Chem Biol Interact**, v. 242, p. 396-406, 2015.

DEBES, F. *et al.* . Impact of prenatal methylmercury exposure on neurobehavioral function at age 14 years. **Neurotoxicol Teratol**, v. 28, n. 5, p. 536-47, 2006.

DENG, W.; AIMONE, J. B.; GAGE, F. H. New neurons and new memories: how does adult hippocampal neurogenesis affect learning and memory? **Nat Rev Neurosci**, v. 11, n. 5, p. 339-50, 2010.

DENK, M. C. *et al.* . Monitoring ketamine treatment response in a depressed patient via peripheral mammalian target of rapamycin activation. **Am J Psychiatry**, v. 168, n. 7, p. 751-2, 2011.

DESSI, F.; BEN-ARI, Y.; CHARRIAUT-MARLANGUE, C. Riluzole prevents anoxic injury in cultured cerebellar granule neurons. **Eur J Pharmacol**, v. 250, n. 2, p. 325-8, 1993.

DI LIBERTO, V. *et al.* . The Guanine-Based Purinergic System: The Tale of An Orphan Neuromodulation. **Front Pharmacol**, v. 7, p. 158, 2016.

DIAS, R. B. *et al.* . Adenosine: setting the stage for plasticity. **Trends Neurosci**, v. 36, n. 4, p. 248-57, 2013.

DIETRICH, D. E. *et al.* . Amantadine in depressive patients with Borna disease virus (BDV) infection: an open trial. **Bipolar Disord**, v. 2, n. 1, p. 65-70, 2000.

DIETRICH, M. O. *et al.* . Motor impairment induced by oral exposure to methylmercury in adult mice. **Environ Toxicol Pharmacol**, v. 19, n. 1, p. 169-75, 2005.

DINGLEDINE, R. *et al.* . The glutamate receptor ion channels. **Pharmacol Rev**, v. 51, n. 1, p. 7-61, 1999.

DIXON, A. K. *et al.* . Tissue distribution of adenosine receptor mRNAs in the rat. **Br J Pharmacol**, v. 118, n. 6, p. 1461-8, 1996.

DOLBEC, J. *et al.* . Methylmercury exposure affects motor performance of a riverine population of the Tapajos river, Brazilian Amazon. **Int Arch Occup Environ Health**, v. 73, n. 3, p. 195-203, 2000.

DONOVAN, F. M.; CUNNINGHAM, D. D. Signaling pathways involved in thrombin-induced cell protection. **J Biol Chem**, v. 273, n. 21, p. 12746-52, 1998.

DREVETS, W. C. Neuroimaging and neuropathological studies of depression: implications for the cognitive-emotional features of mood disorders. **Curr Opin Neurobiol**, v. 11, n. 2, p. 240-9, 2001.

DREVETS, W. C.; PRICE, J. L.; FUREY, M. L. Brain structural and functional abnormalities in mood disorders: implications for neurocircuitry models of depression. **Brain Struct Funct**, v. 213, n. 1-2, p. 93-118, 2008.

DU, J. *et al.* . Focus on CaMKII: a molecular switch in the pathophysiology and treatment of mood and anxiety disorders. **Int J Neuropsychopharmacol**, v. 7, n. 3, p. 243-8, 2004.

DUMAN, C. H. *et al.* . A role for MAP kinase signaling in behavioral models of depression and antidepressant treatment. **Biol Psychiatry**, v. 61, n. 5, p. 661-70, 2007.

DUMAN, R. S. Neuronal damage and protection in the pathophysiology and treatment of psychiatric illness: stress and depression. **Dialogues Clin Neurosci**, v. 11, n. 3, p. 239-55, 2009.

\_\_\_\_\_. Pathophysiology of depression and innovative treatments: remodeling glutamatergic synaptic connections. **Dialogues Clin Neurosci**, v. 16, n. 1, p. 11-27, 2014.

DUMAN, R. S.; LI, N. A neurotrophic hypothesis of depression: role of synaptogenesis in the actions of NMDA receptor antagonists. **Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci**, v. 367, n. 1601, p. 2475-84, 2012.

DUMAN, R. S.; VOLETI, B. Signaling pathways underlying the pathophysiology and treatment of depression: novel mechanisms for rapid-acting agents. **Trends Neurosci**, v. 35, n. 1, p. 47-56, 2012.

DUNWIDDIE, T. V.; MASINO, S. A. The role and regulation of adenosine in the central nervous system. **Annu Rev Neurosci**, v. 24, p. 31-55, 2001.

DURIC, V. *et al.* . A negative regulator of MAP kinase causes depressive behavior. **Nat Med**, v. 16, n. 11, p. 1328-32, 2010.

DURIC, V. *et al.* . Altered expression of synapse and glutamate related genes in post-mortem hippocampus of depressed subjects. **Int J Neuropsychopharmacol**, v. 16, n. 1, p. 69-82, 2012.

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

DWIVEDI, Y. *et al.* . Lower phosphoinositide 3-kinase (PI 3-kinase) activity and differential expression levels of selective catalytic and regulatory PI 3-kinase subunit isoforms in prefrontal cortex and hippocampus of suicide subjects. **Neuropsychopharmacology**, v. 33, n. 10, p. 2324-40, 2008.

DYKENS, J. A. Isolated cerebral and cerebellar mitochondria produce free radicals when exposed to elevated  $Ca^{2+}$  and  $Na^{+}$ : implications for neurodegeneration. **J Neurochem**, v. 63, n. 2, p. 584-91, 1994.

EKINO, S. *et al.* . Minamata disease revisited: an update on the acute and chronic manifestations of methyl mercury poisoning. **J Neurol Sci**, v. 262, n. 1-2, p. 131-44, 2007.

ELGUN, S.; KESKINEGE, A.; KUMBASAR, H. Dipeptidyl peptidase IV and adenosine deaminase activity. Decrease in depression. **Psychoneuroendocrinology**, v. 24, n. 8, p. 823-32, 1999.

ETHIER, M. F.; MADISON, J. M. Adenosine A1 receptors mediate mobilization of calcium in human bronchial smooth muscle cells. **Am J Respir Cell Mol Biol**, v. 35, n. 4, p. 496-502, 2006.

FARINA, M.; ASCHNER, M.; ROCHA, J. B. Oxidative stress in MeHg-induced neurotoxicity. **Toxicol Appl Pharmacol**, v. 256, n. 3, p. 405-17, 2011.

FARINA, M.; ROCHA, J. B.; ASCHNER, M. Mechanisms of methylmercury-induced neurotoxicity: evidence from experimental studies. **Life Sci**, v. 89, n. 15-16, p. 555-63, 2011.

FAVATA, M. F. *et al.* . Identification of a novel inhibitor of mitogen-activated protein kinase kinase. **J Biol Chem**, v. 273, n. 29, p. 18623-32, 1998.

FEATHERSTONE, D. E. Intercellular glutamate signaling in the nervous system and beyond. **ACS Chem Neurosci**, v. 1, n. 1, p. 4-12, 2010.

FEDOROVA, I. M. *et al.* . Behavioral characterization of mice lacking the A3 adenosine receptor: sensitivity to hypoxic neurodegeneration. **Cell Mol Neurobiol**, v. 23, n. 3, p. 431-47, 2003.

FENG, S. *et al.* . Sulforaphane Prevents Methylmercury-Induced Oxidative Damage and Excitotoxicity Through Activation of the Nrf2-ARE Pathway. **Mol Neurobiol**, v. 54, n. 1, p. 375-391, 2017.

FERGUSON, J. M.; SHINGLETON, R. N. An open-label, flexible-dose study of memantine in major depressive disorder. **Clin Neuropharmacol**, v. 30, n. 3, p. 136-44, 2007.

FREDHOLM, B. B. *et al.* . Adenosine and brain function. **Int Rev Neurobiol**, v. 63, p. 191-270, 2005.

FREDHOLM, B. B.; CUNHA, R. A.; SVENNINGSSON, P. Pharmacology of adenosine A2A receptors and therapeutic applications. **Curr Top Med Chem**, v. 3, n. 4, p. 413-26, 2003.

FREDHOLM, B. B. *et al.* . Comparison of the potency of adenosine as an agonist at human adenosine receptors expressed in Chinese hamster ovary cells. **Biochem Pharmacol**, v. 61, n. 4, p. 443-8, 2001.

GANZELLA, M. *et al.* . Intracerebroventricular administration of inosine is anticonvulsant against quinolinic acid-induced seizures in mice: an effect independent of benzodiazepine and adenosine receptors. **Pharmacol Biochem Behav**, v. 100, n. 2, p. 271-4, 2011.

GAO, Z. *et al.* . A3 adenosine receptor activation triggers phosphorylation of protein kinase B and protects rat basophilic leukemia 2H3 mast cells from apoptosis. **Mol Pharmacol**, v. 59, n. 1, p. 76-82, 2001.

GARMAN, R. H.; WEISS, B.; EVANS, H. L. Alkylmercurial encephalopathy in the monkey (*Saimiri sciureus* and *Macaca arctoides*): a histopathologic and autoradiographic study. **Acta Neuropathol**, v. 32, n. 1, p. 61-74, 1975.

GEE, J. R.; KELLER, J. N. Astrocytes: regulation of brain homeostasis via apolipoprotein E. **Int J Biochem Cell Biol**, v. 37, n. 6, p. 1145-50, 2005.

GEREVICH, Z.; WIRKNER, K.; ILLES, P. Adenosine A2A receptors inhibit the N-methyl-D-aspartate component of excitatory synaptic currents in rat striatal neurons. **Eur J Pharmacol**, v. 451, n. 2, p. 161-4, 2002.

GESSI, S. *et al.* . A(1) and A(3) adenosine receptors inhibit LPS-induced hypoxia-inducible factor-1 accumulation in murine astrocytes. **Pharmacol Res**, v. 76, p. 157-70, 2013.

GESSI, S. *et al.* . Adenosine receptors in health and disease. **Adv Pharmacol**, v. 61, p. 41-75, 2011.

GHASEMI, M. *et al.* . Rapid antidepressant effects of repeated doses of ketamine compared with electroconvulsive therapy in hospitalized patients with major depressive disorder. **Psychiatry Res**, v. 215, n. 2, p. 355-61, 2014.

GLASER, V. *et al.* . Oxidative stress-mediated inhibition of brain creatine kinase activity by methylmercury. **Neurotoxicology**, v. 31, n. 5, p. 454-60, 2010a.

GLASER, V. *et al.* . Diphenyl diselenide administration enhances cortical mitochondrial number and activity by increasing hemoxygenase type 1 content in a methylmercury-induced neurotoxicity mouse model. **Mol Cell Biochem**, v. 390, n. 1-2, p. 1-8, 2014.

GLASER, V. *et al.* . Effects of inorganic selenium administration in methylmercury-induced neurotoxicity in mouse cerebral cortex. **Int J Dev Neurosci**, v. 28, n. 7, p. 631-7, 2010b.

GOMEZ, G.; SITKOVSKY, M. V. Differential requirement for A2a and A3 adenosine receptors for the protective effect of inosine in vivo. **Blood**, v. 102, n. 13, p. 4472-8, 2003.

GONCALVES, F. M. *et al.* . Vatairea macrocarpa lectin (VML) induces depressive-like behavior and expression of neuroinflammatory markers in mice. **Neurochem Res**, v. 38, n. 11, p. 2375-84, 2013.

GOURLEY, S. L. *et al.* . Regionally specific regulation of ERK MAP kinase in a model of antidepressant-sensitive chronic depression. **Biol Psychiatry**, v. 63, n. 4, p. 353-9, 2008.

GRANDJEAN, P.; LANDRIGAN, P. J. Neurobehavioural effects of developmental toxicity. **Lancet Neurol**, v. 13, n. 3, p. 330-8, 2014.

GREEN, R. C. *et al.* . Depression as a risk factor for Alzheimer disease: the MIRAGE Study. **Arch Neurol**, v. 60, n. 5, p. 753-9, 2003.

GUDKOV, S. V. *et al.* . Guanosine and inosine display antioxidant activity, protect DNA in vitro from oxidative damage induced by reactive oxygen species, and serve as radioprotectors in mice. **Radiat Res**, v. 165, n. 5, p. 538-45, 2006.

GULSON, B. *et al.* . Changes in manganese and lead in the environment and young children associated with the introduction of methylcyclopentadienyl manganese tricarbonyl in gasoline--preliminary results. **Environ Res**, v. 100, n. 1, p. 100-14, 2006.

GUNTER, T. E. *et al.* . Mitochondrial calcium transport: physiological and pathological relevance. **Am J Physiol**, v. 267, n. 2 Pt 1, p. C313-39, 1994.

GUSTAVSSON, A. *et al.* . Cost of disorders of the brain in Europe 2010. **Eur Neuropsychopharmacol**, v. 21, n. 10, p. 718-79, 2011.

HALLIWELL, B. The wanderings of a free radical. **Free Radic Biol Med**, v. 46, n. 5, p. 531-42, 2009.

HARADA, M. Minamata disease: methylmercury poisoning in Japan caused by environmental pollution. **Crit Rev Toxicol**, v. 25, n. 1, p. 1-24, 1995.

HARADA, Y. *et al.* . Electroencephalographic studies of Minamata disease in children. **Dev Med Child Neurol**, v. 10, n. 2, p. 257-8, 1968.

HARDINGHAM, G. E. Coupling of the NMDA receptor to neuroprotective and neurodestructive events. **Biochem Soc Trans**, v. 37, n. Pt 6, p. 1147-60, 2009.

HASHIMOTO, K.; SAWA, A.; IYO, M. Increased levels of glutamate in brains from patients with mood disorders. **Biol Psychiatry**, v. 62, n. 11, p. 1310-6, 2007.

HASHIMOTO, K.; SHIMIZU, E.; IYO, M. Critical role of brain-derived neurotrophic factor in mood disorders. **Brain Res Brain Res Rev**, v. 45, n. 2, p. 104-14, 2004.

HASKO, G. *et al.* . Inosine inhibits inflammatory cytokine production by a posttranscriptional mechanism and protects against endotoxin-induced shock. **J Immunol**, v. 164, n. 2, p. 1013-9, 2000.

HASKO, G.; SITKOVSKY, M. V.; SZABO, C. Immunomodulatory and neuroprotective effects of inosine. **Trends Pharmacol Sci**, v. 25, n. 3, p. 152-7, 2004.

HASLER, G. *et al.* . Discovering endophenotypes for major depression. **Neuropsychopharmacology**, v. 29, n. 10, p. 1765-81, 2004.

HASLER, G.; NORTHOFF, G. Discovering imaging endophenotypes for major depression. **Mol Psychiatry**, v. 16, n. 6, p. 604-19, 2011.

HAUN, S. E. *et al.* . Inosine mediates the protective effect of adenosine in rat astrocyte cultures subjected to combined glucose-oxygen deprivation. **J Neurochem**, v. 67, n. 5, p. 2051-9, 1996.

HAYDON, P. G. Purinergic Signaling. In: BRADY, S. T.;SIEGEL, G. J., *et al.* (Ed.). **Basic neurochemistry : principles of molecular, cellular and medical neurobiology**. 8th. Amsterdam ; Oxford: Elsevier Academic Press, 2012. p.xxiv, 1096 p. ISBN 9780123749475 (hbk.)

0123749476 (hbk.).

HENN, F. A.; VOLLMAYR, B. Stress models of depression: forming genetically vulnerable strains. **Neurosci Biobehav Rev**, v. 29, n. 4-5, p. 799-804, 2005.

HENNEBERGER, C. *et al.* . Long-term potentiation depends on release of D-serine from astrocytes. **Nature**, v. 463, n. 7278, p. 232-6, 2010.

HERCULANO, A. M. *et al.* . Methylmercury intoxication activates nitric oxide synthase in chick retinal cell culture. **Braz J Med Biol Res**, v. 39, n. 3, p. 415-8, 2006.

HILLHOUSE, T. M.; PORTER, J. H. A brief history of the development of antidepressant drugs: from monoamines to glutamate. **Exp Clin Psychopharmacol**, v. 23, n. 1, p. 1-21, 2015.

HINDMARCH, I. Expanding the horizons of depression: beyond the monoamine hypothesis. **Hum Psychopharmacol**, v. 16, n. 3, p. 203-218, 2001.

HUANG, E. J.; REICHARDT, L. F. Neurotrophins: roles in neuronal development and function. **Annu Rev Neurosci**, v. 24, p. 677-736, 2001.

IKEDA, M. *et al.* . Induction of neuronal nitric oxide synthase by methylmercury in the cerebellum. **J Neurosci Res**, v. 55, n. 3, p. 352-6, 1999.

INOUE, M.; KAJIWARA, Y.; HIRAYAMA, K. Dose- and sex-dependent alterations in mercury distribution in fetal mice following methylmercury exposure. **J Toxicol Environ Health**, v. 19, n. 3, p. 425-35, 1986.



ISOMETSA, E. *et al.* . [Update on Current Care Guideline: Depression].

**Duodecim**, v. 131, n. 3, p. 280-1, 2015.

IZQUIERDO, I. Pharmacological evidence for a role of long-term potentiation in memory. **FASEB J**, v. 8, n. 14, p. 1139-45, 1994.

JABS, C. M.; NEGLEN, P.; EKLOF, B. Breakdown of adenine nucleotides, formation of oxygen free radicals, and early markers of cellular injury in endotoxic shock. **Eur J Surg**, v. 161, n. 3, p. 147-55, 1995.

JACOBSON, K. A.; GAO, Z. G. Adenosine receptors as therapeutic targets. **Nat Rev Drug Discov**, v. 5, n. 3, p. 247-64, 2006.

JAIN, A. K.; JAISWAL, A. K. GSK-3beta acts upstream of Fyn kinase in regulation of nuclear export and degradation of NF-E2 related factor 2. **J Biol Chem**, v. 282, n. 22, p. 16502-10, 2007.

JANSEN, K. L. A review of the nonmedical use of ketamine: use, users and consequences. **J Psychoactive Drugs**, v. 32, n. 4, p. 419-33, 2000.

JERNIGAN, C. S. *et al.* . The mTOR signaling pathway in the prefrontal cortex is compromised in major depressive disorder. **Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry**, v. 35, n. 7, p. 1774-9, 2011.

JIANG, Z. *et al.* . Activation of Erk1/2 and Akt in astrocytes under ischemia. **Biochem Biophys Res Commun**, v. 294, n. 3, p. 726-33, 2002.

JIMENEZ-DEL-RIO, M.; VELEZ-PARDO, C. The bad, the good, and the ugly about oxidative stress. **Oxid Med Cell Longev**, v. 2012, p. 163913, 2012.

JIN, X. *et al.* . Inosine binds to A3 adenosine receptors and stimulates mast cell degranulation. **J Clin Invest**, v. 100, n. 11, p. 2849-57, 1997.

JOPE, R. S. Lithium and GSK-3: one inhibitor, two inhibitory actions, multiple outcomes. **Trends Pharmacol Sci**, v. 24, n. 9, p. 441-3, 2003.

JUHASZ-NAGY, A.; AVIADO, D. M. Inosine as a cardioprotective agent that reverses adrenergic beta blockade. **J Pharmacol Exp Ther**, v. 202, n. 3, p. 683-95, 1977.

JUNQUEIRA, S. C. *et al.* . Inosine, an Endogenous Purine Nucleoside, Suppresses Immune Responses and Protects Mice from Experimental Autoimmune Encephalomyelitis: a Role for A2A Adenosine Receptor. **Mol Neurobiol**, 2016.

JURKOWITZ, M. S. *et al.* . Adenosine, inosine, and guanosine protect glial cells during glucose deprivation and mitochondrial inhibition: correlation between protection and ATP preservation. **J Neurochem**, v. 71, n. 2, p. 535-48, 1998.

KAIDANOVICH-BEILIN, O. *et al.* . Neurological functions of the masterswitch protein kinase - gsk-3. **Front Mol Neurosci**, v. 5, p. 48, 2012.

KARAKAS, E.; REGAN, M. C.; FURUKAWA, H. Emerging structural insights into the function of ionotropic glutamate receptors. **Trends Biochem Sci**, v. 40, n. 6, p. 328-37, 2015.

KAREGE, F. *et al.* . Decreased serum brain-derived neurotrophic factor levels in major depressed patients. **Psychiatry Res**, v. 109, n. 2, p. 143-8, 2002.

KAREGE, F. *et al.* . Neurotrophin levels in postmortem brains of suicide victims and the effects of antemortem diagnosis and psychotropic drugs. **Brain Res Mol Brain Res**, v. 136, n. 1-2, p. 29-37, 2005.

KASPAR, J. W.; NITURE, S. K.; JAISWAL, A. K. Nrf2:INrf2 (Keap1) signaling in oxidative stress. **Free Radic Biol Med**, v. 47, n. 9, p. 1304-9, 2009.

KASTER, M. P. *et al.* . The inhibition of different types of potassium channels underlies the antidepressant-like effect of adenosine in the mouse forced swimming test. **Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry**, v. 31, n. 3, p. 690-6, 2007.

KASTER, M. P. *et al.* . The antidepressant-like effect of inosine in the FST is associated with both adenosine A1 and A2A receptors. **Purinergic Signal**, v. 9, n. 3, p. 481-6, 2013.

KASTER, M. P. *et al.* . Depressive-like behavior induced by tumor necrosis factor- $\alpha$  in mice. **Neuropharmacology**, v. 62, n. 1, p. 419-26, 2011.

KASTER, M. P. *et al.* . Involvement of NMDA receptors in the antidepressant-like action of adenosine. **Pharmacol Rep**, v. 64, n. 3, p. 706-13, 2012.

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**, v. 112, n. 25, p. 7833-8, 2015.

KASTER, M. P. *et al.* . Adenosine administration produces an antidepressant-like effect in mice: evidence for the involvement of A1 and A2A receptors. **Neurosci Lett**, v. 355, n. 1-2, p. 21-4, 2004.

KASTER, M. P. *et al.* . Involvement of nitric oxide-cGMP pathway in the antidepressant-like effects of adenosine in the forced swimming test. **Int J Neuropsychopharmacol**, v. 8, n. 4, p. 601-6, 2005.

KASTER, M. P.; SANTOS, A. R.; RODRIGUES, A. L. Involvement of 5-HT1A receptors in the antidepressant-like effect of adenosine in the mouse forced swimming test. **Brain Res Bull**, v. 67, n. 1-2, p. 53-61, 2005.

KELLY, A.; LYNCH, M. A. Long-term potentiation in dentate gyrus of the rat is inhibited by the phosphoinositide 3-kinase inhibitor, wortmannin. **Neuropharmacology**, v. 39, n. 4, p. 643-51, 2000.

KEMPERMANN, G.; KRONENBERG, G. Depressed new neurons--adult hippocampal neurogenesis and a cellular plasticity hypothesis of major depression. **Biol Psychiatry**, v. 54, n. 5, p. 499-503, 2003.

KERPER, L. E.; BALLATORI, N.; CLARKSON, T. W. Methylmercury transport across the blood-brain barrier by an amino acid carrier. **Am J Physiol**, v. 262, n. 5 Pt 2, p. R761-5, 1992.

KESSLER, R. C. *et al.* . The epidemiology of major depressive disorder: results from the National Comorbidity Survey Replication (NCS-R). **JAMA**, v. 289, n. 23, p. 3095-105, 2003.

KEW, J. N.; KEMP, J. A. Ionotropic and metabotropic glutamate receptor structure and pharmacology. **Psychopharmacology (Berl)**, v. 179, n. 1, p. 4-29, 2005.

KIM, W. K.; SHIN, D.; SONG, W. O. Depression and Its Comorbid Conditions More Serious in Women than in Men in the United States. **J Womens Health (Larchmt)**, v. 24, n. 12, p. 978-85, 2015.

KITAMURA, S. [Epidemiology of Minamata disease--epidemiological approach to the organomercury poisoning]. **Saishin Igaku**, v. 26, n. 10, p. 1966-72, 1971.

KOVACS, Z. *et al.* . Nucleoside map of the human central nervous system. **Neurochem Res**, v. 35, n. 3, p. 452-64, 2009.

KOVACS, Z. *et al.* . Non-adenosine nucleoside inosine, guanosine and uridine as promising antiepileptic drugs: a summary of current literature. **Mini Rev Med Chem**, v. 14, n. 13, p. 1033-42, 2015.

KOVACS, Z. *et al.* . The antiepileptic potential of nucleosides. **Curr Med Chem**, v. 21, n. 6, p. 788-821, 2014.

KOYAMA, Y. Functional alterations of astrocytes in mental disorders: pharmacological significance as a drug target. **Front Cell Neurosci**, v. 9, p. 261, 2015.

KOYAMA, Y. *et al.* . Endothelins increase tyrosine phosphorylation of astrocytic focal adhesion kinase and paxillin accompanied by their association with cytoskeletal components. **Neuroscience**, v. 101, n. 1, p. 219-27, 2000.

KRINGELBACH, M. L. The human orbitofrontal cortex: linking reward to hedonic experience. **Nat Rev Neurosci**, v. 6, n. 9, p. 691-702, 2005.

KRISHNAN, V.; NESTLER, E. J. The molecular neurobiology of depression. **Nature**, v. 455, n. 7215, p. 894-902, 2008.

KUMAGAI, Y. *et al.* . The role of the Keap1/Nrf2 pathway in the cellular response to methylmercury. **Oxid Med Cell Longev**, p. 848279, 2013.

KURICOVA, M. *et al.* . Oral administration of inosine promotes recovery after experimental spinal cord injury in rat. **Neurol Sci**, v. 35, n. 11, p. 1785-91, 2014.

KWAK, M. K. *et al.* . Enhanced expression of the transcription factor Nrf2 by cancer chemopreventive agents: role of antioxidant response element-like sequences in the nrf2 promoter. **Mol Cell Biol**, v. 22, n. 9, p. 2883-92, 2002.

LAI, H. L. *et al.* . Protein kinase C inhibits adenylyl cyclase type VI activity during desensitization of the A2a-adenosine receptor-mediated cAMP response. **J Biol Chem**, v. 272, n. 8, p. 4970-7, 1997.

LAPIDUS, K. A.; SOLEIMANI, L.; MURROUGH, J. W. Novel glutamatergic drugs for the treatment of mood disorders. **Neuropsychiatr Dis Treat**, v. 9, p. 1101-12, 2013.

LARSEN, M. H. *et al.* . Temporal expression of brain-derived neurotrophic factor (BDNF) mRNA in the rat hippocampus after treatment with selective and mixed monoaminergic antidepressants. **Eur J Pharmacol**, v. 578, n. 2-3, p. 114-22, 2008.

LARSEN, M. H. *et al.* . Regulation of brain-derived neurotrophic factor (BDNF) in the chronic unpredictable stress rat model and the effects of chronic antidepressant treatment. **J Psychiatr Res**, v. 44, n. 13, p. 808-16, 2010.

LATINI, S.; PEDATA, F. Adenosine in the central nervous system: release mechanisms and extracellular concentrations. **J Neurochem**, v. 79, n. 3, p. 463-84, 2001.

LAU, A. *et al.* . The predicted molecular weight of Nrf2: it is what it is not. **Antioxid Redox Signal**, v. 18, n. 1, p. 91-3, 2013.

LAU, C. G.; ZUKIN, R. S. NMDA receptor trafficking in synaptic plasticity and neuropsychiatric disorders. **Nat Rev Neurosci**, v. 8, n. 6, p. 413-26, 2007.

LAUBE, B. *et al.* . Molecular determinants of agonist discrimination by NMDA receptor subunits: analysis of the glutamate binding site on the NR2B subunit. **Neuron**, v. 18, n. 3, p. 493-503, 1997.

LEBON, G. *et al.* . Agonist-bound adenosine A2A receptor structures reveal common features of GPCR activation. **Nature**, v. 474, n. 7352, p. 521-5, 2011.

LESCH, K. P.; SCHMITT, A. Antidepressants and gene expression profiling: how to SNARE novel drug targets. **Pharmacogenomics J**, v. 2, n. 6, p. 346-8, 2002.

LESSMANN, V.; GOTTMANN, K.; MALCANGIO, M. Neurotrophin secretion: current facts and future prospects. **Prog Neurobiol**, v. 69, n. 5, p. 341-74, 2003.

- LI, N. *et al.* . mTOR-dependent synapse formation underlies the rapid antidepressant effects of NMDA antagonists. **Science**, v. 329, n. 5994, p. 959-64, 2010.
- LI, N. *et al.* . Glutamate N-methyl-D-aspartate receptor antagonists rapidly reverse behavioral and synaptic deficits caused by chronic stress exposure. **Biol Psychiatry**, v. 69, n. 8, p. 754-61, 2011.
- LI, X.; JOPE, R. S. Is glycogen synthase kinase-3 a central modulator in mood regulation? **Neuropsychopharmacology**, v. 35, n. 11, p. 2143-54, 2010.
- LIEBRENZ, M.; STOHLER, R.; BORGEAT, A. Repeated intravenous ketamine therapy in a patient with treatment-resistant major depression. **World J Biol Psychiatry**, v. 10, n. 4 Pt 2, p. 640-3, 2009.
- LIPTON, S. A.; ROSENBERG, P. A. Excitatory amino acids as a final common pathway for neurologic disorders. **N Engl J Med**, v. 330, n. 9, p. 613-22, 1994.
- LITSKY, M. L. *et al.* . Inosine and guanosine preserve neuronal and glial cell viability in mouse spinal cord cultures during chemical hypoxia. **Brain Res**, v. 821, n. 2, p. 426-32, 1999.
- LIU, A. M.; WONG, Y. H. G16-mediated activation of nuclear factor kappaB by the adenosine A1 receptor involves c-Src, protein kinase C, and ERK signaling. **J Biol Chem**, v. 279, n. 51, p. 53196-204, 2004.
- LIU, D. *et al.* . Effects of curcumin on learning and memory deficits, BDNF, and ERK protein expression in rats exposed to chronic unpredictable stress. **Behav Brain Res**, v. 271, p. 116-21, 2014.
- LIU, J. H. *et al.* . Role of AC-cAMP-PKA Cascade in Antidepressant Action of Electroacupuncture Treatment in Rats. **Evid Based Complement Alternat Med**, v. 2012, p. 932414, 2012.
- LIU, W. *et al.* . Tea Polyphenols Protect Against Methylmercury-Induced Cell Injury in Rat Primary Cultured Astrocytes, Involvement of Oxidative Stress and Glutamate Uptake/Metabolism Disorders. **Mol Neurobiol**, v. 53, n. 5, p. 2995-3009, 2016.

LIVAK, K. J.; SCHMITTGEN, T. D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. **Methods**, v. 25, n. 4, p. 402-8, 2001.

LLOYD, H. G.; SCHRADER, J. Adenosine metabolism in the guinea pig heart: the role of cytosolic S-adenosyl-L-homocysteine hydrolase, 5'-nucleotidase and adenosine kinase. **Eur Heart J**, v. 14 Suppl I, p. 27-33, 1993.

LOEWITH, R. *et al.* . Two TOR complexes, only one of which is rapamycin sensitive, have distinct roles in cell growth control. **Mol Cell**, v. 10, n. 3, p. 457-68, 2002.

LOPES, M. W. *et al.* . Time-dependent modulation of mitogen activated protein kinases and AKT in rat hippocampus and cortex in the pilocarpine model of epilepsy. **Neurochem Res**, v. 37, n. 9, p. 1868-78, 2012.

LUDKA, F. K. *et al.* . Acute atorvastatin treatment exerts antidepressant-like effect in mice via the L-arginine-nitric oxide-cyclic guanosine monophosphate pathway and increases BDNF levels. **Eur Neuropsychopharmacol**, v. 23, n. 5, p. 400-12, 2012.

MACEDO-JUNIOR, S. J. *et al.* . Role of pertussis toxin-sensitive G-protein, K<sup>+</sup> channels, and voltage-gated Ca<sup>2+</sup> channels in the antinociceptive effect of inosine. **Purinergic Signal**, v. 9, n. 1, p. 51-8, 2012.

MACHADO, N. J. *et al.* . Caffeine Reverts Memory But Not Mood Impairment in a Depression-Prone Mouse Strain with Up-Regulated Adenosine A2A Receptor in Hippocampal Glutamate Synapses. **Mol Neurobiol**, 2016.

MACHADO-VIEIRA, R. *et al.* . Ketamine and the next generation of antidepressants with a rapid onset of action. **Pharmacol Ther**, v. 123, n. 2, p. 143-50, 2009.

MALBERG, J. E. Implications of adult hippocampal neurogenesis in antidepressant action. **J Psychiatry Neurosci**, v. 29, n. 3, p. 196-205, 2004.

MANJI, H. K. *et al.* . Enhancing neuronal plasticity and cellular resilience to develop novel, improved therapeutics for difficult-to-treat depression. **Biol Psychiatry**, v. 53, n. 8, p. 707-42, 2003.

- MANN, J. J.; CURRIER, D. M. Stress, genetics and epigenetic effects on the neurobiology of suicidal behavior and depression. **Eur Psychiatry**, v. 25, n. 5, p. 268-71, 2010.
- MANNING, B. D.; CANTLEY, L. C. AKT/PKB signaling: navigating downstream. **Cell**, v. 129, n. 7, p. 1261-74, 2007.
- MANOSSO, L. M. *et al.* . Antidepressant-like effect of zinc is dependent on signaling pathways implicated in BDNF modulation. **Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry**, v. 59, p. 59-67, 2015.
- MANTOVANI, M. *et al.* . Melatonin exerts an antidepressant-like effect in the tail suspension test in mice: evidence for involvement of N-methyl-D-aspartate receptors and the L-arginine-nitric oxide pathway. **Neurosci Lett**, v. 343, n. 1, p. 1-4, 2003.
- MARKOWITZ, C. E. *et al.* . The treatment of multiple sclerosis with inosine. **J Altern Complement Med**, v. 15, n. 6, p. 619-25, 2009.
- MARSDEN, W. N. Synaptic plasticity in depression: molecular, cellular and functional correlates. **Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry**, v. 43, p. 168-84, 2012.
- \_\_\_\_\_. Synaptic plasticity in depression: molecular, cellular and functional correlates. **Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry**, v. 43, p. 168-84, 2013.
- MARTON, A. *et al.* . Anti-inflammatory effects of inosine in human monocytes, neutrophils and epithelial cells in vitro. **Int J Mol Med**, v. 8, n. 6, p. 617-21, 2001.
- MATOS, M. *et al.* . Adenosine A2A receptors modulate glutamate uptake in cultured astrocytes and gliosomes. **Glia**, v. 60, n. 5, p. 702-16, 2012.
- MATSUMOTO, H.; KOYA, G.; TAKEUCHI, T. Fetal Minamata disease. A neuropathological study of two cases of intrauterine intoxication by a methyl mercury compound. **J Neuropathol Exp Neurol**, v. 24, n. 4, p. 563-74, 1965.
- MELDRUM, B. S. Glutamate as a neurotransmitter in the brain: review of physiology and pathology. **J Nutr**, v. 130, n. 4S Suppl, p. 1007S-15S, 2000.



MELONI, D. *et al.* . Dizocilpine antagonizes the effect of chronic imipramine on learned helplessness in rats. **Pharmacol Biochem Behav**, v. 46, n. 2, p. 423-6, 1993.

MENZA, M. *et al.* . A controlled trial of antidepressants in patients with Parkinson disease and depression. **Neurology**, v. 72, n. 10, p. 886-92, 2009.

MIGUEL-HIDALGO, J. J. *et al.* . Glial and glutamatergic markers in depression, alcoholism, and their comorbidity. **J Affect Disord**, v. 127, n. 1-3, p. 230-40, 2010.

MILLER, E. K.; COHEN, J. D. An integrative theory of prefrontal cortex function. **Annu Rev Neurosci**, v. 24, p. 167-202, 2001.

MIN, K. J. *et al.* . Adenosine induces hemeoxygenase-1 expression in microglia through the activation of phosphatidylinositol 3-kinase and nuclear factor E2-related factor 2. **Glia**, v. 56, n. 9, p. 1028-37, 2008.

MOLDEUS, P.; COTGREAVE, I. A.; BERGGREN, M. Lung protection by a thiol-containing antioxidant: N-acetylcysteine. **Respiration**, v. 50 Suppl 1, p. 31-42, 1986.

MORETTI, M. *et al.* . Antidepressant-like effect of ascorbic acid is associated with the modulation of mammalian target of rapamycin pathway. **J Psychiatr Res**, v. 48, n. 1, p. 16-24, 2013.

MORETTI, M. *et al.* . Effects of Agmatine on Depressive-Like Behavior Induced by Intracerebroventricular Administration of 1-Methyl-4-phenylpyridinium (MPP). **Neurotox Res**, 2015.

MOSMANN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. **J Immunol Methods**, v. 65, n. 1-2, p. 55-63, 1983.

MURROUGH, J. W. *et al.* . Reduced global functional connectivity of the medial prefrontal cortex in major depressive disorder. **Hum Brain Mapp**, v. 37, n. 9, p. 3214-23, 2016.

MUSAZZI, L. *et al.* . The action of antidepressants on the glutamate system: regulation of glutamate release and glutamate receptors. **Biol Psychiatry**, v. 73, n. 12, p. 1180-8, 2013.

MUTO, J. *et al.* . Oral administration of inosine produces antidepressant-like effects in mice. **Sci Rep**, v. 4, p. 4199, 2014.

MYERS, G. J. *et al.* . Effects of prenatal methylmercury exposure from a high fish diet on developmental milestones in the Seychelles Child Development Study. **Neurotoxicology**, v. 18, n. 3, p. 819-29, 1997.

NASCIMENTO, F. P. *et al.* . Inosine reduces pain-related behavior in mice: involvement of adenosine A1 and A2A receptor subtypes and protein kinase C pathways. **J Pharmacol Exp Ther**, v. 334, n. 2, p. 590-8, 2010.

NASCIMENTO, F. P. *et al.* . Adenosine A1 Receptor-Dependent Antinociception Induced by Inosine in Mice: Pharmacological, Genetic and Biochemical Aspects. **Mol Neurobiol**, 2014.

NAYAK, G. H.; PRENTICE, H. M.; MILTON, S. L. Neuroprotective signaling pathways are modulated by adenosine in the anoxia tolerant turtle. **J Cereb Blood Flow Metab**, v. 31, n. 2, p. 467-75, 2010.

NEIS, V. B. *et al.* . Acute agmatine administration, similar to ketamine, reverses depressive-like behavior induced by chronic unpredictable stress in mice. **Pharmacol Biochem Behav**, v. 150-151, p. 108-114, 2016a.

NEIS, V. B. *et al.* . Agmatine produces antidepressant-like effects by activating AMPA receptors and mTOR signaling. **Eur Neuropsychopharmacol**, v. 26, n. 6, p. 959-71, 2016b.

NEIS, V. B. *et al.* . Agmatine enhances antidepressant potency of MK-801 and conventional antidepressants in mice. **Pharmacol Biochem Behav**, v. 130, p. 9-14, 2015.

NEMEROFF, C. B.; OWENS, M. J. Treatment of mood disorders. **Nat Neurosci**, v. 5 Suppl, p. 1068-70, 2002.

NESTLER, E. J. *et al.* . Neurobiology of depression. **Neuron**, v. 34, n. 1, p. 13-25, 2002.

NI, M. *et al.* . Glia and methylmercury neurotoxicity. **J Toxicol Environ Health A**, v. 75, n. 16-17, p. 1091-101, 2012.

NI, M. *et al.* . Comparative study on the response of rat primary astrocytes and microglia to methylmercury toxicity. **Glia**, v. 59, n. 5, p. 810-20, 2011.

NICHOLLS, D. G. A role for the mitochondrion in the protection of cells against calcium overload? **Prog Brain Res**, v. 63, p. 97-106, 1985.

NICHOLSON, C. D.; JACKMAN, S. A.; WILKE, R. The ability of denbufylline to inhibit cyclic nucleotide phosphodiesterase and its affinity for adenosine receptors and the adenosine re-uptake site. **Br J Pharmacol**, v. 97, n. 3, p. 889-97, 1989.

NIELSEN, J. B.; ANDERSEN, O. The toxicokinetics of mercury in mice offspring after maternal exposure to methylmercury--effect of selenomethionine. **Toxicology**, v. 74, n. 2-3, p. 233-41, 1992.

NITURE, S. K.; KHATRI, R.; JAISWAL, A. K. Regulation of Nrf2-an update. **Free Radic Biol Med**, v. 66, p. 36-44, 2014.

NOGUCHI, Y. *et al.* . Astrocytes protect neurons against methylmercury via ATP/P2Y(1) receptor-mediated pathways in astrocytes. **PLoS One**, v. 8, n. 2, p. e57898, 2013.

NORTH, R. A.; JARVIS, M. F. P2X receptors as drug targets. **Mol Pharmacol**, v. 83, n. 4, p. 759-69, 2013.

NOWAK, G.; ORDWAY, G. A.; PAUL, I. A. Alterations in the N-methyl-D-aspartate (NMDA) receptor complex in the frontal cortex of suicide victims. **Brain Res**, v. 675, n. 1-2, p. 157-64, 1995.

NUMAKAWA, T. *et al.* . BDNF function and intracellular signaling in neurons. **Histol Histopathol**, v. 25, n. 2, p. 237-58, 2010.

OKADA, M. *et al.* . Adenosine receptor subtypes modulate two major functional pathways for hippocampal serotonin release. **J Neurosci**, v. 21, n. 2, p. 628-40, 2001.

OLESEN, J. *et al.* . The economic cost of brain disorders in Europe. **Eur J Neurol**, v. 19, n. 1, p. 155-62, 2012.

OLNEY, J. W. Excitotoxicity: an overview. **Can Dis Wkly Rep**, v. 16 Suppl 1E, p. 47-57; discussion 57-8, 1990.

ONISHCHENKO, N. *et al.* . Long-lasting depression-like behavior and epigenetic changes of BDNF gene expression induced by perinatal exposure to methylmercury. **J Neurochem**, v. 106, n. 3, p. 1378-87, 2008.

ORTIZ, R. *et al.* . Purinergic system dysfunction in mood disorders: a key target for developing improved therapeutics. **Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry**, v. 57, p. 117-31, 2014.

PALMER, T. M.; BENOVIC, J. L.; STILES, G. L. Agonist-dependent phosphorylation and desensitization of the rat A3 adenosine receptor. Evidence for a G-protein-coupled receptor kinase-mediated mechanism. **J Biol Chem**, v. 270, n. 49, p. 29607-13, 1995.

PANATIER, A. *et al.* . Astrocytes are endogenous regulators of basal transmission at central synapses. **Cell**, v. 146, n. 5, p. 785-98, 2011.

PARK, H.; POO, M. M. Neurotrophin regulation of neural circuit development and function. **Nat Rev Neurosci**, v. 14, n. 1, p. 7-23, 2012.

PARKINSON, F. E. *et al.* . Molecular biology of nucleoside transporters and their distributions and functions in the brain. **Curr Top Med Chem**, v. 11, n. 8, p. 948-72, 2011.

PARPURA, V. *et al.* . Glutamate-mediated astrocyte-neuron signalling. **Nature**, v. 369, n. 6483, p. 744-7, 1994.

PARSONS, M. P.; RAYMOND, L. A. Extrasynaptic NMDA receptor involvement in central nervous system disorders. **Neuron**, v. 82, n. 2, p. 279-93, 2014.

PAUL, I. A.; SKOLNICK, P. Glutamate and depression: clinical and preclinical studies. **Ann N Y Acad Sci**, v. 1003, p. 250-72, 2003.

PEDRAZZA, E. L. *et al.* . Ecto-nucleotidase pathway is altered by different treatments with fluoxetine and nortriptyline. **Eur J Pharmacol**, v. 583, n. 1, p. 18-25, 2008.

PEREA, G.; ARAQUE, A. Glial calcium signaling and neuron-glia communication. **Cell Calcium**, v. 38, n. 3-4, p. 375-82, 2005.

PESARICO, A. P. *et al.* . Contribution of NMDA, GABAA and GABAB receptors and l-arginine-NO-cGMP, MEK1/2 and CaMK-II pathways in the antidepressant-like effect of 7-fluoro-1,3-diphenylisoquinoline-1-amine in mice. **Eur J Pharmacol**, v. 782, p. 6-13, 2016.

PHILLIS, J. W. Potentiation of the action of adenosine on cerebral cortical neurones by the tricyclic antidepressants. **Br J Pharmacol**, v. 83, n. 2, p. 567-75, 1984.

PHILLIS, J. W.; WU, P. H. The effect of various centrally active drugs on adenosine uptake by the central nervous system. **Comp Biochem Physiol C**, v. 72, n. 2, p. 179-87, 1982.

PIEROZAN, P. *et al.* . Neurotoxicity of Methylmercury in Isolated Astrocytes and Neurons: the Cytoskeleton as a Main Target. **Mol Neurobiol**, 2016.

PITTENGER, C. *et al.* . Riluzole in the treatment of mood and anxiety disorders. **CNS Drugs**, v. 22, n. 9, p. 761-86, 2008.

POPOLI, P.; PEPPONI, R. Potential therapeutic relevance of adenosine A2B and A2A receptors in the central nervous system. **CNS Neurol Disord Drug Targets**, v. 11, n. 6, p. 664-74, 2012.

POSADA-DUQUE, R. A.; BARRETO, G. E.; CARDONA-GOMEZ, G. P. Protection after stroke: cellular effectors of neurovascular unit integrity. **Front Cell Neurosci**, v. 8, p. 231, 2014.

PRUUS, K. *et al.* . The effect of the NMDA receptor antagonist dizocilpine on behavioral manifestations of serotonin and adrenergic antidepressants in rats. **Methods Find Exp Clin Pharmacol**, v. 32, n. 2, p. 123-8, 2010.

QU, L. *et al.* . Inward Rectifier K<sup>+</sup> Currents Are Regulated by CaMKII in Endothelial Cells of Primarily Cultured Bovine Pulmonary Arteries. **PLoS One**, v. 10, n. 12, p. e0145508, 2015.

RACAGNI, G.; POPOLI, M. Cellular and molecular mechanisms in the long-term action of antidepressants. **Dialogues Clin Neurosci**, v. 10, n. 4, p. 385-400, 2008.

RAHIMIAN, R. *et al.* . Adenosine A2A receptors and uric acid mediate protective effects of inosine against TNBS-induced colitis in rats. **Eur J Pharmacol**, v. 649, n. 1-3, p. 376-81, 2010.

RAJKOWSKA, G. Histopathology of the prefrontal cortex in major depression: what does it tell us about dysfunctional monoaminergic circuits? **Prog Brain Res**, v. 126, p. 397-412, 2000.

RAJKOWSKA, G. *et al.* . Morphometric evidence for neuronal and glial prefrontal cell pathology in major depression. **Biol Psychiatry**, v. 45, n. 9, p. 1085-98, 1999.

RALEVIC, V.; BURNSTOCK, G. Receptors for purines and pyrimidines. **Pharmacol Rev**, v. 50, n. 3, p. 413-92, 1998.

RAND, M. D.; DAO, J. C.; CLASON, T. A. Methylmercury disruption of embryonic neural development in *Drosophila*. **Neurotoxicology**, v. 30, n. 5, p. 794-802, 2009.

REDDY, M. S. Depression: the disorder and the burden. **Indian J Psychol Med**, v. 32, n. 1, p. 1-2, 2010.

REICHARDT, L. F. Neurotrophin-regulated signalling pathways. **Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci**, v. 361, n. 1473, p. 1545-64, 2006.

REUS, G. Z. *et al.* . Glutamatergic NMDA Receptor as Therapeutic Target for Depression. **Adv Protein Chem Struct Biol**, v. 103, p. 169-202, 2016.

REUS, G. Z. *et al.* . MAPK signaling correlates with the antidepressant effects of ketamine. **J Psychiatr Res**, v. 55, p. 15-21, 2014.

RIAL, D. *et al.* . Depression as a Glial-Based Synaptic Dysfunction. **Front Cell Neurosci**, v. 9, p. 521, 2015.

RIBEIRO, J. A.; SEBASTIAO, A. M.; DE MENDONÇA, A. Adenosine receptors in the nervous system: pathophysiological implications. **Prog Neurobiol**, v. 68, n. 6, p. 377-92, 2002.

RICE, K. M. *et al.* . Environmental mercury and its toxic effects. **J Prev Med Public Health**, v. 47, n. 2, p. 74-83, 2014.

RISHER, J. F.; AMLER, S. N. Mercury exposure: evaluation and intervention the inappropriate use of chelating agents in the diagnosis and treatment of putative mercury poisoning. **Neurotoxicology**, v. 26, n. 4, p. 691-9, 2005.

ROCHA, J. B. *et al.* . Effects of methylmercury exposure during the second stage of rapid postnatal brain growth on negative geotaxis and on delta-aminolevulinatase dehydratase of suckling rats. **Braz J Med Biol Res**, v. 26, n. 10, p. 1077-83, 1993.

RODRIGUES, A. L. *et al.* . Effect of perinatal lead exposure on rat behaviour in open-field and two-way avoidance tasks. **Pharmacol Toxicol**, v. 79, n. 3, p. 150-6, 1996.

RODRIGUEZ MARTIN-DOIMEADIOS, R. C. *et al.* . Comparative study of mercury speciation in commercial fishes of the Brazilian Amazon. **Environ Sci Pollut Res Int**, v. 21, n. 12, p. 7466-79, 2014.

ROJO, A. I.; SAGARRA, M. R.; CUADRADO, A. GSK-3beta down-regulates the transcription factor Nrf2 after oxidant damage: relevance to exposure of neuronal cells to oxidative stress. **J Neurochem**, v. 105, n. 1, p. 192-202, 2008.

ROSA, A. O. *et al.* . Antidepressant-like effect of the novel thiadiazolidinone NP031115 in mice. **Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry**, v. 32, n. 6, p. 1549-56, 2008.

RUHE, H. G. *et al.* . Staging methods for treatment resistant depression. A systematic review. **J Affect Disord**, v. 137, n. 1-3, p. 35-45, 2011.

RUSH, A. J. *et al.* . Comorbid psychiatric disorders in depressed outpatients: demographic and clinical features. **J Affect Disord**, v. 87, n. 1, p. 43-55, 2005.

RUSH, T.; HJELMHAUG, J.; LOBNER, D. Effects of chelators on mercury, iron, and lead neurotoxicity in cortical culture. **Neurotoxicology**, v. 30, n. 1, p. 47-51, 2009.

RUSSO, S. J.; NESTLER, E. J. The brain reward circuitry in mood disorders. **Nat Rev Neurosci**, v. 14, n. 9, p. 609-25, 2013.

- SALOMON, R. M. *et al.* . Lack of behavioral effects of monoamine depletion in healthy subjects. **Biol Psychiatry**, v. 41, n. 1, p. 58-64, 1997.
- SANACORA, G. *et al.* . Targeting the glutamatergic system to develop novel, improved therapeutics for mood disorders. **Nat Rev Drug Discov**, v. 7, n. 5, p. 426-37, 2008.
- SANCHEZ-NOGUEIRO, J. *et al.* . Subcellular distribution and early signalling events of P2X7 receptors from mouse cerebellar granule neurons. **Eur J Pharmacol**, v. 744, p. 190-202, 2014.
- SANTARELLI, L. *et al.* . Requirement of hippocampal neurogenesis for the behavioral effects of antidepressants. **Science**, v. 301, n. 5634, p. 805-9, 2003.
- SASABE, J. *et al.* . D-serine is a key determinant of glutamate toxicity in amyotrophic lateral sclerosis. **EMBO J**, v. 26, n. 18, p. 4149-59, 2007.
- SATTLER, R.; ROTHSTEIN, J. D. Targeting an old mechanism in a new disease-protection of glutamatergic dysfunction in depression. **Biol Psychiatry**, v. 61, n. 2, p. 137-8, 2007.
- SAVITZ, J.; DREVETS, W. C. Bipolar and major depressive disorder: neuroimaging the developmental-degenerative divide. **Neurosci Biobehav Rev**, v. 33, n. 5, p. 699-771, 2009.
- SAWYNOK, J.; LIU, X. J. Adenosine in the spinal cord and periphery: release and regulation of pain. **Prog Neurobiol**, v. 69, n. 5, p. 313-40, 2003.
- SAWYNOK, J.; REID, A. Peripheral adenosine 5'-triphosphate enhances nociception in the formalin test via activation of a purinergic p2X receptor. **Eur J Pharmacol**, v. 330, n. 2-3, p. 115-21, 1997.
- SCACCIANOCE, S. *et al.* . [Pharmacologic demonstration of the physiologic role of adenosine in stress activation]. **Ann Ist Super Sanita**, v. 24, n. 4, p. 555-8, 1988.
- SCHILDKRAUT, J. J. The catecholamine hypothesis of affective disorders: a review of supporting evidence. **Am J Psychiatry**, v. 122, n. 5, p. 509-22, 1965.



SCHMIDT, A. P.; LARA, D. R.; SOUZA, D. O. Proposal of a guanine-based purinergic system in the mammalian central nervous system. **Pharmacol Ther**, v. 116, n. 3, p. 401-16, 2007.

SCHMIDT, H. D.; DUMAN, R. S. The role of neurotrophic factors in adult hippocampal neurogenesis, antidepressant treatments and animal models of depressive-like behavior. **Behav Pharmacol**, v. 18, n. 5-6, p. 391-418, 2007.

SCHULTE, G.; FREDHOLM, B. B. Signalling from adenosine receptors to mitogen-activated protein kinases. **Cell Signal**, v. 15, n. 9, p. 813-27, 2003.

SCHWARZSCHILD, M. A. *et al.* . Inosine to increase serum and cerebrospinal fluid urate in Parkinson disease: a randomized clinical trial. **JAMA Neurol**, v. 71, n. 2, p. 141-50, 2013.

SERAFINI, G. *et al.* . Pharmacological properties of glutamatergic drugs targeting NMDA receptors and their application in major depression. **Curr Pharm Des**, v. 19, n. 10, p. 1898-922, 2013.

SHANKER, G. *et al.* . Free radical formation in cerebral cortical astrocytes in culture induced by methylmercury. **Brain Res Mol Brain Res**, v. 128, n. 1, p. 48-57, 2004.

SHANKER, G.; ASCHNER, M. Identification and characterization of uptake systems for cystine and cysteine in cultured astrocytes and neurons: evidence for methylmercury-targeted disruption of astrocyte transport. **J Neurosci Res**, v. 66, n. 5, p. 998-1002, 2001.

SHANKER, G.; SYVERSEN, T.; ASCHNER, M. Astrocyte-mediated methylmercury neurotoxicity. **Biol Trace Elem Res**, v. 95, n. 1, p. 1-10, 2003.

SHAYWITZ, A. J.; GREENBERG, M. E. CREB: a stimulus-induced transcription factor activated by a diverse array of extracellular signals. **Annu Rev Biochem**, v. 68, p. 821-61, 1999.

SHELINE, Y. I. 3D MRI studies of neuroanatomic changes in unipolar major depression: the role of stress and medical comorbidity. **Biol Psychiatry**, v. 48, n. 8, p. 791-800, 2000.

- \_\_\_\_\_. Neuroimaging studies of mood disorder effects on the brain. **Biol Psychiatry**, v. 54, n. 3, p. 338-52, 2003.
- \_\_\_\_\_. Depression and the hippocampus: cause or effect? **Biol Psychiatry**, v. 70, n. 4, p. 308-9, 2011.
- SHEN, H. *et al.* . Inosine reduces ischemic brain injury in rats. **Stroke**, v. 36, n. 3, p. 654-9, 2005.
- SHETH, S. *et al.* . Adenosine receptors: expression, function and regulation. **Int J Mol Sci**, v. 15, n. 2, p. 2024-52, 2014.
- SHI, M. *et al.* . Direct protection of inosine on PC12 cells against zinc-induced injury. **Neuroreport**, v. 13, n. 4, p. 477-9, 2002.
- SHONESY, B. C. *et al.* . CaMKII: a molecular substrate for synaptic plasticity and memory. **Prog Mol Biol Transl Sci**, v. 122, p. 61-87, 2014.
- SKERFVING, S. Methylmercury exposure, mercury levels in blood and hair, and health status in Swedes consuming contaminated fish. **Toxicology**, v. 2, n. 1, p. 3-23, 1974.
- SKOLNICK, P. Antidepressants for the new millennium. **Eur J Pharmacol**, v. 375, n. 1-3, p. 31-40, 1999.
- STERU, L. *et al.* . The tail suspension test: a new method for screening antidepressants in mice. **Psychopharmacology (Berl)**, v. 85, n. 3, p. 367-70, 1985.
- SWEATT, J. D. Mitogen-activated protein kinases in synaptic plasticity and memory. **Curr Opin Neurobiol**, v. 14, n. 3, p. 311-7, 2004.
- TAKAHASHI, R. N.; PAMPLONA, F. A.; PREDIGER, R. D. Adenosine receptor antagonists for cognitive dysfunction: a review of animal studies. **Front Biosci**, v. 13, p. 2614-32, 2008.
- TAKUMA, K.; BABA, A.; MATSUDA, T. Astrocyte apoptosis: implications for neuroprotection. **Prog Neurobiol**, v. 72, n. 2, p. 111-27, 2004.

TARDITO, D. *et al.* . Signaling pathways regulating gene expression, neuroplasticity, and neurotrophic mechanisms in the action of antidepressants: a critical overview. **Pharmacol Rev**, v. 58, n. 1, p. 115-34, 2006.

THOMAS, G. M.; HUGANIR, R. L. MAPK cascade signalling and synaptic plasticity. **Nat Rev Neurosci**, v. 5, n. 3, p. 173-83, 2004.

TIBBLES, L. A.; WOODGETT, J. R. The stress-activated protein kinase pathways. **Cell Mol Life Sci**, v. 55, n. 10, p. 1230-54, 1999.

TINCANI, G. P.; TRALDI, A. [Treatment of Myocardial Insufficiency with Utp and Inosine]. **Minerva Cardioangiol**, v. 11, p. 553-6, 1963.

TIRABOSCHI, E. *et al.* . Antidepressants activate CaMKII in neuron cell body by Thr286 phosphorylation. **Neuroreport**, v. 15, n. 15, p. 2393-6, 2004.

TOKUMITSU, H. *et al.* . KN-62, 1-[N,O-bis(5-isoquinolinesulfonyl)-N-methyl-L-tyrosyl]-4-phenylpiperazine, a specific inhibitor of Ca<sup>2+</sup>/calmodulin-dependent protein kinase II. **J Biol Chem**, v. 265, n. 8, p. 4315-20, 1990.

TOMASELLI, B. *et al.* . Purine nucleoside-mediated protection of chemical hypoxia-induced neuronal injuries involves p42/44 MAPK activation. **Neurochem Int**, v. 46, n. 7, p. 513-21, 2005.

TOYAMA, T. *et al.* . Cytoprotective role of Nrf2/Keap1 system in methylmercury toxicity. **Biochem Biophys Res Commun**, v. 363, n. 3, p. 645-50, 2007.

UMAPATHY, S. N. *et al.* . Adenosine A1 receptors promote vasa vasorum endothelial cell barrier integrity via Gi and Akt-dependent actin cytoskeleton remodeling. **PLoS One**, v. 8, n. 4, p. e59733, 2013.

VAN CALKER, D.; BIBER, K. The role of glial adenosine receptors in neural resilience and the neurobiology of mood disorders. **Neurochem Res**, v. 30, n. 10, p. 1205-17, 2005.

VIGO, D.; THORNICROFT, G.; ATUN, R. Estimating the true global burden of mental illness. **Lancet Psychiatry**, v. 3, n. 2, p. 171-8, 2016.

VOLTERRA, A.; MELDOLESI, J. Astrocytes, from brain glue to communication elements: the revolution continues. **Nat Rev Neurosci**, v. 6, n. 8, p. 626-40, 2005.

VON LUBITZ, D. K. *et al.* . Adenosine A3 receptor stimulation and cerebral ischemia. **Eur J Pharmacol**, v. 263, n. 1-2, p. 59-67, 1994.

WANG, H.; JOSEPH, J. A. Quantifying cellular oxidative stress by dichlorofluorescein assay using microplate reader. **Free Radic Biol Med**, v. 27, n. 5-6, p. 612-6, 1999.

WANG, J. Q. *et al.* . Roles of subunit phosphorylation in regulating glutamate receptor function. **Eur J Pharmacol**, v. 728, p. 183-7, 2014.

WANG, L. *et al.* . Methylmercury toxicity and Nrf2-dependent detoxification in astrocytes. **Toxicol Sci**, v. 107, n. 1, p. 135-43, 2009.

WANG, L. *et al.* . Nrf2-mediated liver protection by esculetoside A against acetaminophen toxicity through the AMPK/Akt/GSK3beta pathway. **Free Radic Biol Med**, v. 101, p. 401-412, 2016.

WEISS, B. Lead, manganese, and methylmercury as risk factors for neurobehavioral impairment in advanced age. **Int J Alzheimers Dis**, v. 2011, p. 607543, 2011.

WELIHINDA, A. A. *et al.* . The adenosine metabolite inosine is a functional agonist of the adenosine A2A receptor with a unique signaling bias. **Cell Signal**, v. 28, n. 6, p. 552-60, 2016.

WEN, S. *et al.* . Serum uric acid levels and the clinical characteristics of depression. **Clin Biochem**, v. 45, n. 1-2, p. 49-53, 2012.

WITTENDORP, M. C.; BODDEKE, H. W.; BIBER, K. Adenosine A3 receptor-induced CCL2 synthesis in cultured mouse astrocytes. **Glia**, v. 46, n. 4, p. 410-8, 2004.

WORMSER, U. *et al.* . Protective effect of a novel peptide against methylmercury-induced toxicity in rat primary astrocytes. **Neurotoxicology**, v. 33, n. 4, p. 763-8, 2012.

WU, S.; BASILE, A. S.; BARGER, S. W. Induction of serine racemase expression and D-serine release from microglia by secreted amyloid precursor protein (sAPP). **Curr Alzheimer Res**, v. 4, n. 3, p. 243-51, 2007.

YANG, P. C. *et al.* . Phosphatidylinositol 3-kinase activation is required for stress protocol-induced modification of hippocampal synaptic plasticity. **J Biol Chem**, v. 283, n. 5, p. 2631-43, 2008.

YAROM, M. *et al.* . Identification of inosine as an endogenous modulator for the benzodiazepine binding site of the GABAA receptors. **J Biomed Sci**, v. 5, n. 4, p. 274-80, 1998.

YIN, Z. *et al.* . The methylmercury-L-cysteine conjugate is a substrate for the L-type large neutral amino acid transporter. **J Neurochem**, v. 107, n. 4, p. 1083-90, 2008.

YIN, Z. *et al.* . Methylmercury-induced alterations in astrocyte functions are attenuated by ebselen. **Neurotoxicology**, v. 32, n. 3, p. 291-9, 2011.

YIN, Z. *et al.* . Methylmercury induces oxidative injury, alterations in permeability and glutamine transport in cultured astrocytes. **Brain Res**, v. 1131, n. 1, p. 1-10, 2007.

YORIFUJI, T. *et al.* . Long-term exposure to methylmercury and psychiatric symptoms in residents of Minamata, Japan. **Environ Int**, v. 37, n. 5, p. 907-13, 2011.

YUAN, P. *et al.* . Altered levels of extracellular signal-regulated kinase signaling proteins in postmortem frontal cortex of individuals with mood disorders and schizophrenia. **J Affect Disord**, v. 124, n. 1-2, p. 164-9, 2009.

ZANOS, P. *et al.* . NMDAR inhibition-independent antidepressant actions of ketamine metabolites. **Nature**, v. 533, n. 7604, p. 481-6, 2016.

ZARATE, C. A., JR. *et al.* . A randomized trial of an N-methyl-D-aspartate antagonist in treatment-resistant major depression. **Arch Gen Psychiatry**, v. 63, n. 8, p. 856-64, 2006.

ZENI, A. L. *et al.* . Involvement of PKA, CaMKII, PKC, MAPK/ERK and PI3K in the acute antidepressant-like effect of ferulic acid in the tail suspension test.

**Pharmacol Biochem Behav**, v. 103, n. 2, p. 181-6, 2012.

ZHAO, Y. *et al.* . CaMKII inhibition promotes neuronal apoptosis by transcriptionally upregulating Bim expression. **Neuroreport**, v. 27, n. 14, p. 1018-23, 2016.

ZIMMERMANN, H.; ZEBISCH, M.; STRATER, N. Cellular function and molecular structure of ecto-nucleotidases. **Purinergic Signal**, v. 8, n. 3, p. 437-502, 2012.

ZOMKOWSKI, A. D. *et al.* . The role of the NMDA receptors and l-arginine-nitric oxide-cyclic guanosine monophosphate pathway in the antidepressant-like effect of duloxetine in the forced swimming test. **Pharmacol Biochem Behav**, v. 103, n. 2, p. 408-17, 2012.

ZOMKOWSKI, A. D. *et al.* . Involvement of NMDA receptors and L-arginine-nitric oxide-cyclic guanosine monophosphate pathway in the antidepressant-like effects of escitalopram in the forced swimming test. **Eur Neuropsychopharmacol**, v. 20, n. 11, p. 793-801, 2010.