

Pedro Porto Alegre Baptista

Depressão experimental e tratamento agudo com cetamina: Análise comportamental, neurometabólica e histofisiológica dopaminérgica.

Tese apresentada como requisito para obtenção do grau de Doutor pelo Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular da Faculdade de Biociências da Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul.

Orientador: Prof. Dr. Léder Leal Xavier

Porto Alegre

2015

Aos meus pais, por seu amor incondicional!

AGRADECIMENTOS

À minha família, em especial aos meus pais, Danilo e Adriana, por terem me ensinado os princípios e valores que tenho hoje e por nunca terem poupado esforços para que eu pudesse me dedicar aos estudos de forma integral. À Ana, minha irmã, por sempre torcer pelo meu sucesso. Mesmo à distância vocês estavam próximos. Amo vocês.

Ao meu orientador e amigo, Professor Léder, pela oportunidade, pelo exemplo de profissionalismo; por todo seu empenho para a conclusão deste trabalho. Obrigado por compartilhar sua sabedoria, e por depositar sua confiança em mim.

À Juliana, meu amor, a descoberta mais valiosa que o laboratório me proporcionou. Te amo.

Aos queridos colegas, amigos e professores do Laboratório de Biologia Celular e Tecidual – PUCRS e do Centro de Pesquisa pré-clínica do Instituto do Cérebro do Rio Grande do Sul – PUCRS pela amizade acima de tudo. Pela competência e pela disponibilidade em me auxiliar no desenvolver este trabalho. Pelo companheirismo e dedicação em todas as etapas.

À PUCRS e ao PPG em Biologia Celular e Molecular, pelo espaço e oportunidade.

Ao CNPq e FAPERGS pelos recursos.

À CAPES pela bolsa concedida.

À Deus, por arquitetar o universo; e me dar a curiosidade para explorá-lo.

Amar é admirar com o coração.

Admirar é amar com o cérebro.

Theophile Gautier

RESUMO

O transtorno depressivo maior (MDD) é um distúrbio psiquiátrico que altera profundamente a neuroquímica e o metabolismo encefálico; caracterizado clinicamente por um estado de tristeza profunda crônica, acompanhada por anedonia, sensação de desvalia e falta de motivação, podendo levar o paciente a cometer suicídio. A área tegmental ventral (VTA) é uma importante região dopaminérgica intimamente relacionada com a patofisiologia do MDD. A cetamina é um fármaco antagonista de receptores NMDA glutamatérgicos que apresenta um rápido efeito antidepressivo e o tratamento agudo com cetamina é uma promissora alternativa terapêutica para os pacientes com MDD. Ademais, a tomografia por emissão de pósitrons para pequenos animais (microPET) é uma técnica que permite avaliar a distribuição temporal-espacial de moléculas radiomarcadas *in vivo*, e a utilização do ¹⁸F-Fluorodeoxiglicose (¹⁸F-FDG) como rádio-traçador para este tipo de análise ainda necessita ser padronizada junto a nossa Universidade. Deste modo, esta tese de doutorado foi dividida em duas etapas. Primeiramente, padronizamos a técnica de análise do metabolismo encefálico de ratos Wistar com uso de ¹⁸F-FDG associada ao microPET, e com isso confeccionamos um atlas neurometabólico detalhado da distribuição de ¹⁸F-FDG em 56 regiões encefálicas. Comparamos os dados neurometabólicos obtidos com dados de cinco artigos da literatura científica que realizaram avaliações bioquímicas e imunistoquímicas da atividade do citocromo c oxidase (COX), técnicas tradicionalmente utilizadas para análise do metabolismo encefálico *ex vivo*. Para a comparação, ordenamos as regiões analisadas em nosso estudo e as regiões dos estudos de COX selecionados, então correlacionamos estas ordenações através do teste não paramétrico de correlação para dados ordenados de Spearman. Neste estudo detalhamos a distribuição de ¹⁸F-FDG no encéfalo de ratos Wistar. Em quatro dos estudos selecionados não encontramos correlação, somente com o estudo de Shumake et al. encontramos uma correlação moderada ($r=0,56$, $p=0,023$).

Na segunda etapa, analisamos a influência do tratamento agudo com a cetamina sobre o comportamento símil-depressivo, o metabolismo de glicose e a

atividade da enzima tirosina hidroxilase (TH) (uma enzima limitante na síntese de dopamina) na VTA de animais submetidos protocolo de estresse crônico imprevisível (CUS). Neste estudo, 48 ratos Wistar foram divididos em quatro grupos: 1-Controle, 2-Cetamina, 3-CUS, 4-CUS+Cetamina. Os animais submetidos ao protocolo CUS foram expostos a estressores variados, duas vezes ao dia, por 28 dias consecutivos. O tratamento foi uma única administração intraperitoneal de 10mg/kg de cetamina. Para análise comportamental foram realizados os testes de preferência a sacarose, campo aberto e nado forçado. O metabolismo da glicose e a imunorreatividade para TH na VTA foram analisadas por meio do ^{18}F -FDG-microPET e imunistoquímica para TH, respectivamente. Os grupos CUS apresentaram uma diminuição do consumo de solução de sacarose e um aumento no tempo de imobilidade no teste de nado forçado e o tratamento com cetamina foi capaz de reverter o comportamento símil-depressivo ($p < 0,05$). O protocolo CUS e o tratamento com cetamina não exerceram influência sobre a captação de ^{18}F -FDG e a imunorreatividade para TH na VTA.

Os resultados obtidos com esta tese de doutorado possibilitaram a padronização do uso de ^{18}F -FDG com microPET, para análise do metabolismo encefálico de ratos Wistar em nossa Universidade. Ademais, com o uso do protocolo CUS, confirmou-se o efeito antidepressivo agudo da cetamina, contudo nossos achados indicam que este não é relacionado a alterações metabólicas ou da histofisiologia dopaminérgica da VTA.

Palavras-chave: Depressão. microPET. Cetamina. Área tegmental ventral. Tirosina hidroxilase.

ABSTRACT

The major depressive disorder (MDD) is a psychiatric condition which profoundly alters with the brain metabolism and neurochemistry characterized by a state of deep, chronic sadness, accompanied by anhedonia, sensation of worthlessness and lack of motivation, often leading the patient to suicide. The ventral tegmental area (VTA) is an important dopaminergic region intimately associated with the pathophysiology of MDD. Ketamine is a drug that antagonizes the glutamatergic NMDA receptors which has been shown to exert an immediate antidepressant effect and the treatment with ketamine is a promising new alternative for MDD therapeutic. Furthermore, the small animal positron emission tomography (microPET) is a technique which allows the assessment of the temporal-spatial distribution of radiolabelled molecules *in vivo*, and the utilization of ¹⁸F-Fluorodeoxyglucose (¹⁸F-FDG) as a radiotracer for this analysis still needs standardization in our University. In this sense, this thesis has been divided into two stages. Firstly, we standardized the brain metabolic assessment technique using ¹⁸F-FDG associated with microPET in Wistar rats, and with it, we rendered a neurometabolic atlas of the distribution of ¹⁸F-FDG in 56 brain regions. We compared our neurometabolic data with data from five other scientific articles which assessed the biochemical and immunohistochemical activity of cytochrome c oxidase (COX), these techniques are traditionally used for assessment of *ex vivo* brain metabolism. Thus, we ranked the regions analyzed in our study and the regions from the selected COX studies, and correlated the rankings with the Spearman test for non-parametric ranked data correlation. In this study we detailed the distribution of ¹⁸F-FDG in the brain of Wistar rats. On four of the selected studies we did not find a correlation, only on Shumake et al.'s study we found a moderate correlation ($r=0.56$, $p=0.023$).

In the second stage, we analyzed the influence of acute ketamine treatment on the depressive-like behavior, the glucose metabolism and tyrosine hydroxylase activity (TH) (a rate-limiting dopamine synthesis enzyme) in the VTA of animals exposed to the chronic unpredictable stress (CUS). In this study, 48 Wistar rats were divided into four groups: 1-Control, 2-Ketamine, 3-CUS, 4-CUS+Ketamine. The

animals undergone the CUS protocol were exposed to several stressors, twice-daily, for 28 consecutive days. The treatment consisted of a single intraperitoneal injection of 10mg/kg of ketamine. For the behavioral analysis the sucrose preference test, the open field test, and the forced swim test were executed. The glucose metabolism and TH immunoreactivity in the VTA were analyzed by ^{18}F -FDG-microPET and immunohistochemistry for TH, respectively. The CUS groups showed a decrease in sucrose solution intake and an increase in the immobility time on the forced swim test, and ketamine treatment was able to revert the depressive-like behavior ($p < 0.05$). The CUS protocol and ketamine treatment did not influence upon the ^{18}F -FDG uptake or the TH immunoreactivity in the VTA.

The results obtained in this thesis aid on the standardizing of the use of ^{18}F -FDG with microPET, for the analyses on brain metabolism in our university. Furthermore, with the CUS protocol, we confirmed the acute, antidepressant effect of ketamine, however, our findings indicated that this effect is not related to metabolic or dopaminergic physiology in the VTA.

Keywords: Depression. microPET. Ketamine. Ventral tegmental area. Tyrosine hydroxylase.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Eixo HPA.....	18
Figura 2 – Vias monoaminérgicas	21
Figura 3 – Hodologia da área tegmental ventral.....	29
Figura 4 – Distribuição dos neurônios dopaminérgicos e glutamatérgicos na VTA...30	
Figura 5 – Mecanismo de ação do efeito antidepressivo da cetamina	33
Figura 6 – Princípios do microPET	35

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Sintomatologia do transtorno depressivo maior	15
Tabela 2 – Principais eventos estressores utilizados no protocolo CUS	25

LISTA DE ABREVIATURAS

¹⁸F-FDG – 18F-Fluorodeoxiglicose

5-HT - Serotonina

ACTH – Hormônio adrenocorticotrófico

Akt – Proteína quinase B

AMPA – Ácido α -amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazol propiônico

AMPA_r – Receptor AMPA

BDNF – Fator neurotrófico derivado do encéfalo

BLA – Amígdala basolateral

COX – Citocromo c oxidase

CRH – Hormônio liberador de corticotrofina

CUS – Estresse crônico imprevisível

eEF2 – Fator de alongação eucariótico 2

ERK – Quinases relacionadas à sinalização extracelular

FST – Teste de nado forçado

GluR1 – Receptor glutamatérgico 1

GSK-3 – Quinase de glicogênio sintase 3

HPA – [eixo] Hipotálamo-hipófise-adrenal

IF – Núcleo interfascicular

IPN – Núcleo interpeduncular

MDD – Transtorno depressivo maior

microPET – Tomografia por emissão de pósitron para pequenos animais

ml – Lemnisco medial

mTOR – *Mammalian target of rapamycin*

NAc – Núcleo accumbens

NMDA – N-metil D-aspartato

NMDAr – Receptor NMDA

PBP – Núcleo parabraquial pigmentado

PET - Tomografia por emissão de pósitron

PFC – Córtex pré-frontal

PN – Núcleo paranigral

PSD95 – Proteína de densidade pós-sináptica 95

SNc – Substância *nigra pars compacta*

SNr – Substância *nigra pars reticulada*

SPT – Teste de preferência a sacarose

SSRI – Inibidores seletivos de recaptção de serotonina

TH – Tirosina hidroxilase

Trk B – Quinase do receptor de tropomiosina B

VGLUT2 – Transportador vesicular de glutamato 2

VTA – Área tegmental ventral

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	14
1.1	Transtorno depressivo maior.....	14
1.2	A hipótese monoaminérgica.....	18
1.2.1	Serotonina	19
1.2.2	Catecolaminas	20
1.3	Tratamento farmacológico do MDD.....	22
1.4	Modelo de Depressão por Estresse Crônico Imprevisível.....	24
1.5	Área Tegmental Ventral	27
1.6	Cetamina como antidepressivo	31
1.7	Tomografia por emissão de pósitrons para pequenos animais.....	34
1.7.1	microPET para estudos do metabolismo	36
1.7.2	Metabolismo encefálico no MDD e CUS.....	37
2	JUSTIFICATIVA.....	39
3	OBJETIVOS.....	40
3.1	Objetivo Geral	40
3.2	Objetivos Específicos	40
4	METODOLOGIA, RESULTADOS E DISCUSSÃO	41
4.1	Artigo Científico I: <i>The Brain Metabolic atlas of Wistar rats – A study using ¹⁸F-Fluorodeoxyglucose</i>	41
4.2	Artigo Científico II: <i>Antidepressant Effects of Ketamine are not related to ¹⁸F-FDG Metabolism or Tyrosine Hydroxylase Immunoreactivity in the Ventral Tegmental Area of Rats</i>	62
5	CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	75
6	PERSPECTIVAS	78
	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	79
	ANEXO A – Resumos dos artigos que o doutorando participou como autor principal ou colaborador durante o período de doutorado	86
	ANEXO B – Ofício da Comissão de Ética para Uso de Animais (CEUA)	91

1 INTRODUÇÃO

1.1 Transtorno depressivo maior.

O transtorno depressivo maior (MDD – do inglês – *major depressive disorder*) é uma doença psiquiátrica que esteve presente por toda história (documentada) da humanidade. A depressão, como é conhecida popularmente nos dias atuais, já havia sido descrita por Hipócrates (460 a.C. – 377 a.C.) como *melancolia* e foi somente em 1994, com a publicação do Manual Diagnóstico e Estatístico de Transtornos Mentais – 4ª edição, que o termo “transtorno depressivo maior” foi popularizado entre os profissionais da área (DAVISON, 2006; AMERICAN PSYCHIATRIC ASSOCIATION, 2013).

“Se um medo ou desânimo durar por muito tempo, é uma afeição melancólica.”

Hipócrates (400 a.C, Aforismos, seção VI)

O MDD é uma doença caracterizada por um quadro crônico de tristeza exacerbada, sensações de vazio profundo, de desvalia pessoal, de culpa, anedonia (incapacidade de sentir prazer) e até idealização suicida. O transtorno origina-se da recorrência sistemática e diária de episódios depressivos, por no mínimo duas semanas. Os episódios depressivos são quadros psiquiátricos emocionais onde deve estar obrigatoriamente presente os sintomas de humor deprimido e a anedonia, e sua associação com dois ou mais sintomas classificará o episódio com leve, moderado ou grave (Tabela 1). Estes sintomas causam um intenso sofrimento emocional pessoal associado a prejuízos ocupacionais e sociais. Isto gera uma incapacitação funcional do indivíduo acometido por MDD e um comprometimento de sua saúde física, levando-o a utilizar com maior frequência os serviços de saúde (DEL PORTO, 1999; FAVA; KENDLER, 2000; WILLIAMS JR *et al.*, 2000).

Tabela 1 – Sintomatologia do transtorno depressivo maior (AMERICAN PSYCHIATRIC ASSOCIATION, 2013)

Psíquicos	Humor depressivo*
	Anedonia*
	Desmotivação
	Fadiga
Fisiológicos	Lentidão intelectual
	Alteração de sono
	Alteração de apetite
Comportamentais	Desinteresse sexual
	Retraimento social
	Crises de choro
	Pensamentos suicidas
	Alteração psicomotora

* Sintomas obrigatórios para diagnóstico de episódio depressivo

Segundo levantamentos realizados em 2012 pela Organização Mundial de Saúde, o MDD é atualmente a principal causa de incapacitação funcional em todo o mundo, e afeta cerca de 350 milhões de pessoas no mundo (SULLIVAN; NEALE; KENDLER, 2000; FERRARI *et al.*, 2013). Além do sofrimento emocional para o paciente, o MDD tem um grande impacto social e econômico. No ano 2000 o prejuízo econômico estimado nos Estados Unidos com a depressão foi de 83 bilhões de dólares, dos quais 26,1 bilhões foram gastos diretos em tratamento, 5,4 bilhões foram gastos relacionados ao suicídio e de 51,5 bilhões em prejuízos empresariais relacionados a funcionários diagnosticados com MDD. Neste mesmo sentido, o impacto financeiro (investimento no tratamento e o prejuízo corporativo) do MDD foi

de 118 bilhões de euros em 28 países da União Europeia no ano de 2014 (GREENBERG *et al.*, 2003; SOBOCKI *et al.*, 2006; HILLHOUSE; PORTER, 2015).

O MDD é uma doença que pode afetar pessoas de qualquer gênero, idade, etnia ou classe socioeconômica. Sua prevalência varia de 5% a 25% ao longo da vida; sendo que a incidência de MDD em mulheres (adolescentes e adultas) é duas vezes maior do que em homens. Possivelmente esta diferença é proveniente das diferenças hormonais entre os gêneros ou da carga sociocultural atribuída a cada sexo, tendo em vista que em crianças a prevalência é equilibrada (MITCHELL; VAZE; RAO, 2009; FLECK *et al.*, 2009). Cerca de 20% dos pacientes com determinadas condições patológicas graves como câncer ou acidentes irão desenvolver sintomas de MDD, devido seus caracteres agressivos ou por induzirem sequelas importantes. (AMERICAN PSYCHIATRIC ASSOCIATION, 2013). O diagnóstico de MDD pelo médico psiquiatra baseia-se na identificação dos sintomas, onde se tenha eliminado qualquer fato que possa causar tais emoções (por exemplo: luto, perda material em desastres naturais, falência financeira, hipotireoidismo, doença de Cushing, etc.). Sendo assim, é improvável que um profissional generalista não treinado seja capaz de identificar efetivamente a doença, presume-se que 30% a 60% dos casos de MDD não são diagnosticados, o que agrava ainda mais o impacto negativo desta patologia (FLECK *et al.*, 2009). Estudos epidemiológicos tem demonstrado que o risco de desenvolver o MDD é de 40-50% maior se esta doença acometer algum familiar de primeiro grau (pais ou irmãos), sendo assim há uma forte hereditariedade do MDD. Porém, a busca por alterações genéticas que conferem uma diátese hereditária pré-existente tem sido frustrada (NESTLER *et al.*, 2002).

Um estressor é um evento que ameaça de forma real ou imaginária a homeostase de um organismo. A teoria biopsicossocial sugere que a conjugação de diátese e estressores é o mecanismo desencadeador do transtorno depressivo maior (KRISHNAN; NESTLER, 2008). O estressor é percebido e interpretado pelo córtex frontal, hipocampo e a amígdala e avaliado se potencialmente nocivo; assim sendo, ativa o hipotálamo a secretar o hormônio liberador de corticotrofina (CRH –

do inglês – corticotrophin releasing hormone) que estimula o lobo anterior da hipófise a liberar o hormônio adrenocorticotrófico (ACTH – do inglês – adrenocorticotropic hormone) na corrente sanguínea. O ACTH liga-se aos receptores presentes nas glândulas adrenais e estimula a secreção de glicocorticóides (cortisol em humanos, corticosterona em roedores), levando a um aumento nos níveis de cortisol (ou corticosterona) no sangue, uma condição denominada hipercortisolemia (ou hipercorticosterolemia). Esta sequência de eventos biológicos é denominada de eixo HPA (do inglês – hypothalamic-pituitary-adrenal axis). O cortisol (ou corticosterona) estimula um potente efeito sobre o metabolismo sistêmico, e no encéfalo ele atua diretamente em diversas regiões; mas principalmente, exerce um controle de *feedback* negativo na liberação de CRH do hipotálamo (Figura 1) (BAINS; CUSULIN; INOUE, 2015).

Na maioria dos pacientes de MDD foi observado um hipercortisolemia e uma diminuição da expressão dos receptores de glicocorticóides no hipocampo, que modulam o *feedback* negativo do eixo HPA. Estes fatos originaram uma hipótese que propunha que a fisiopatogenia do MDD fosse resultado de um desbalanço do *feedback* negativo do eixo HPA, mas esta ideia foi descartada pois drogas antagonistas do CRH não foram capazes de reverter o quadro depressivo (DUMAN, 2014).

A hipótese neurobiológica mais aceita e que melhor explica a fisiopatologia do transtorno depressivo maior surgiu na década de 60, a partir do relato de um médico que descreveu em seus pacientes que após fazerem o uso de resperidona para o tratamento de hipertensão vascular, estes apresentavam um humor depressivo. Identificou-se mais tarde que a resperidona inibe os transportadores vesiculares monoaminérgicos (serotonina, noradrenalina, dopamina, etc.), e como resultado, acaba esgotando o conteúdo de monoaminas encefálicas (HILLHOUSE; PORTER, 2015).

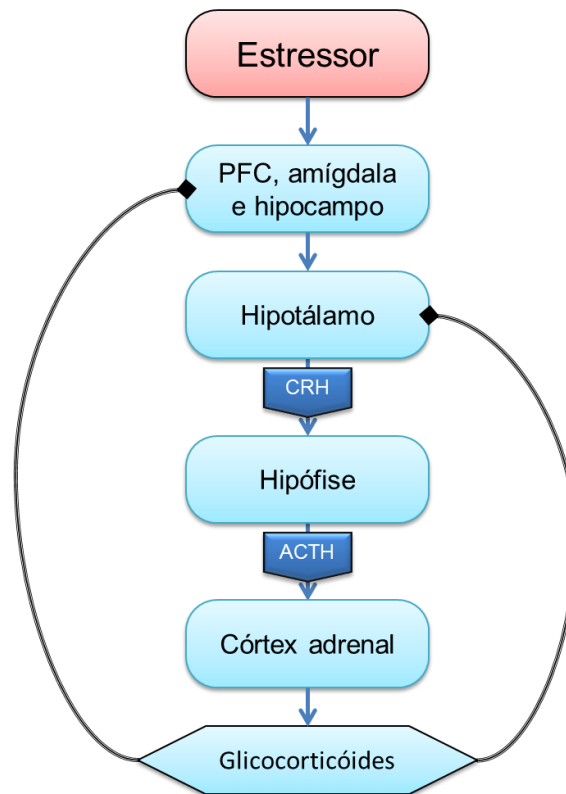


Figura 1 – **Eixo HPA**. Um evento estressor é percebido e processado pelo córtex pré-frontal (PFC), amígdala e hipocampo, que estimula o hipotálamo a liberar o hormônio liberador de corticotropina (CRH). O CRH estimula a hipófise a secretar hormônio adrenocorticotrófico (ACTH) na corrente sanguínea. O ACTH, por sua vez, atua sobre o córtex adrenal estimulando a liberação de glicocorticóides. Um mecanismo de *feedback* negativo pelos glicocorticóides atua sobre os PFC, amígdala, hipocampo e hipotálamo, inibindo suas atividades.

1.2 A hipótese monoaminérgica

Esta hipótese, sugerida há cerca de 50 anos para explicar o quadro sintomatológico do transtorno depressivo maior, propõem que há um prejuízo nos sistemas serotoninérgico, noradrenérgico e dopaminérgico encefálico. Os níveis monoaminérgicos poderiam estar alterados por um comprometimento na síntese, armazenamento ou liberação destas substâncias; ou ainda, estas poderiam permanecer inalteradas, mas as atividades dos receptores ou das proteínas sinalizadoras intracelulares pós-sinápticas poderiam estar alteradas. Algumas evidências contribuíram para reforçar esta hipótese, 1) o efeito da resperidona,

citado acima 2) a reversão do quadro depressivo após a cessação do uso de resperidona, 3) o efeito antidepressivo observados por inibidores das monoamina oxidases (MAO), enzima responsável pela degradação de monoaminas e 4) o mecanismo de ação de drogas antidepressivas atuais (HILLHOUSE; PORTER, 2015).

1.2.1 Serotonina

No encéfalo os neurônios secretores de serotonina (5-HT – 5-hidroxitriptamina) originam-se dos núcleos da rafe. Estes núcleos têm importantes projeções serotoninérgicas para centros límbicos (estriado, amígdala e núcleo accumbens) e para todo córtex cerebral (Figura 2); no MDD estes núcleos apresentam um comprometimento da cascata de síntese da 5-HT. Foi observado que o conteúdo de serotonina e do ácido 5-hidroxiindolacético, um metabolito de serotonina, no encéfalo de vítimas de suicídio encontrava-se diminuído quando comparado a grupos controle. Adicionalmente, os níveis de 5-HT e de seus metabólitos encontram-se diminuídos na urina e no líquido cefalorraquidiano de pacientes que sofrem de distúrbios afetivos. Estudos *post mortem* neurobiológicos de encéfalos de pacientes acometidos por MDD demonstram que há uma diminuição dos receptores 5-HT_{1A} (inibitório) hipocámpais e um aumento na expressão do receptor 5-HT_{2A} (excitatório) no córtex cerebral, como um mecanismo compensatório à diminuição de serotonina (MURPHY; CAMPBELL; COSTA, 1978; RESSLER; NEMEROFF, 2000; ROSA-NETO *et al.*, 2004; DREVETS *et al.*, 2007; SHELTON *et al.*, 2009).

Contudo, o MDD é uma patologia de neuroquímica complexa e não depende apenas do balanço serotoninérgico. Apesar das tentativas de isolar o 5-HT, a deficiência de serotonina sozinha não é capaz de explicar a fisiopatologia da depressão; os baixos níveis de 5-HT associado a alterações em outros sistemas de neurotransmissão devem ser considerados para a etiologia do transtorno depressivo maior (KALIA, 2005).

1.2.2 Catecolaminas

O *locus coeruleus* é o principal núcleo fonte de neurônios noradrenérgicos no encéfalo. Os axônios noradrenérgicos se projetam para o córtex cerebral, hipocampo e núcleos talâmicos (Figura 2). Foi observado que em pacientes de MDD há um aumento de noradrenalina no líquido cefalorraquidiano, mas apesar do envolvimento da noradrenalina na fisiopatogenia do MDD, os dados atuais ainda são controversos, algumas pesquisas apontam um aumento da cascata sinalizadora de noradrenalina, enquanto outras mostram uma diminuição desta (RESSLER; NEMEROFF, 2000). Por outro lado, estudos *post mortem* de pacientes deprimidos vítimas de suicídios apresentam consistentemente um aumento da densidade dos receptores β -adrenérgicos (excitatório) no córtex, e a expressão de tirosina hidroxilase (TH), uma enzima da via de síntese da noradrenalina, está aumentada do *locus coeruleus* de indivíduos deprimidos (ZHU *et al.*, 1999; GOS *et al.*, 2008; HILL *et al.*, 2012).

A área tegmental ventral (VTA – do inglês – *ventral tegmental area*) é a região dopaminérgica mais proeminente na fisiopatologia do MDD, pois está intimamente envolvida no circuito de motivação e recompensa do encéfalo. Esta região projeta axônios para o núcleo accumbens, córtex frontal e amígdala (Figura 2). Os níveis de ácido homovanílico, um metabolito de dopamina, estão diminuídos no líquido cefalorraquidiano de pacientes suicidas. Alguns estudos demonstram um aumento da atividade dopaminérgica nos receptores D2 (inibitório) no putamen, em contrapartida, foram encontradas reduções da atividade dopaminérgica nos receptores D1 (excitatório) no estriado de pacientes com MDD (MEYER *et al.*, 2006; CANNON *et al.*, 2009) (SHER *et al.*, 2006) (PITCHOT *et al.*, 2001). Achados mais recentes, com modelos animais, sugerem que haja uma alteração da atividade de marca-passo da VTA e da dopamina no MDD, e que estas sejam características fisiológicas e neuroquímicas desta patologia (FRIEDMAN *et al.*, 2014; GUNAYDIN *et al.*, 2014).

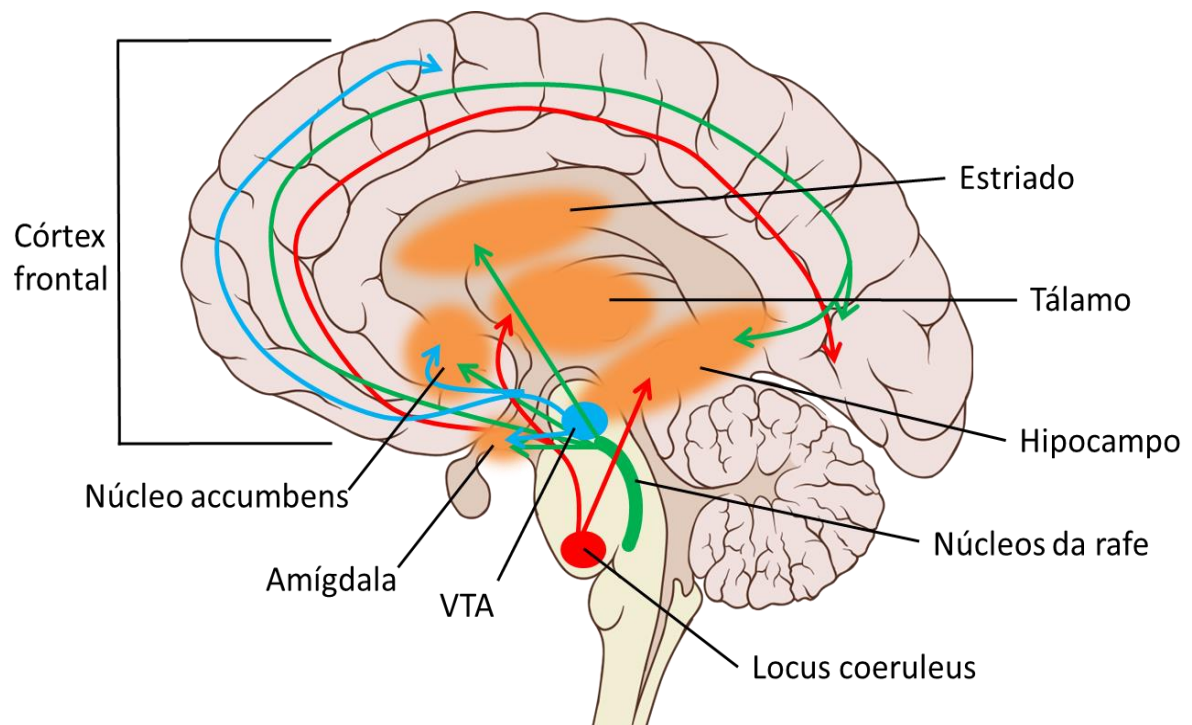


Figura 2 – **Vias monoaminérgicas**. Em verde as vias serotoninérgicas, que partem dos núcleos da rafe e projetam para o córtex cerebral, estriado e núcleo accumbens. Em vermelho as vias noradrenérgicas, que partem do locus coeruleus e projetam para o córtex cerebral, tálamo e hipocampo. Em azul as vias dopaminérgicas, que partem da área tegmental ventral (VTA) e projetam para o córtex frontal, amígdala e núcleo accumbens.

Vale ressaltar que uma parte significativa das técnicas utilizadas para acessar as funções encefálicas de humanos consiste em estudos *post mortem*, e esta modalidade apresenta importantes limitações e geralmente traz variáveis de difícil controle, sendo assim, destes dados coletados podem apresentar algum viés. Contudo, apesar destas limitações, alguns estudos microneuroanatômicos e histológicos *post-mortem* demonstraram reduções na substância cinzenta, diminuição da densidade glial e alterações no formato do soma de neurônios encontrados no córtex pré-frontal, hipocampo e córtex cingulado anterior, regiões envolvidas nas sensações de culpa, de desvalia e de recompensa, sentimentos estes que estão intimamente relacionados ao MDD. (RAJKOWSKA *et al.*, 1999; KRISHNAN; NESTLER, 2008; GITTINS; HARRISON, 2011).

1.3 Tratamento farmacológico do MDD

As primeiras drogas antidepressivas surgiram em meio à expansão da psicofarmacologia da década de 1950. Entre elas está a família de fármacos **inibidores das monoamina oxidases (MAO)**. As MAOs são enzimas responsáveis pelo catabolismo de moléculas monoaminérgicas. Ao inibir a ação da enzima, estes fármacos provocam um aumento da quantidade destes neurotransmissores no botão pré-sináptico. Estes fármacos foram muito utilizados, mas apresentavam importantes efeitos adversos; atualmente, variantes dos fármacos originais ainda estão disponíveis, mas perderam espaço para as novas e melhores opções farmacológicas (HILLHOUSE; PORTER, 2015).

Os **antidepressivos tricíclicos (TCA** – do inglês – *tricyclic antidepressant*) surgiram contemporaneamente aos inibidores da MAO, e recebem seu nome devido aos três anéis atômicos presentes na sua estrutura molecular. Os TCAs agem principalmente bloqueando transportadores pré-sinápticos de recaptação de serotonina e de noradrenalina e os receptores pós-sinápticos α_{1-2} -adrenérgicos. Porém, a inibição dos transportadores de recaptação de 5-HT e noradrenalina é a ação responsável pelo efeito antidepressivo dos TCAs em resposta ao aumento da disponibilidade destes neurotransmissores monoaminérgicos na fenda sináptica. Esta família de fármacos ainda está em uso atualmente, podendo ser usada em casos de transtorno obsessivo-compulsivo, transtorno de estresse pós-traumático, fibromialgia, entre outros (HILLHOUSE; PORTER, 2015).

Atualmente, os **inibidores seletivos de recaptação de serotonina (SSRI** – do inglês – *selective serotonin reuptake inhibitor*) são a classe de antidepressivos mais prescritos. O primeiro fármaco desta natureza foi lançado em 1988, a fluoxetina. Como o nome sugere, os SSRIs bloqueiam a ação das proteínas pré-sinápticas recaptadoras de serotonina, aumentando seu tempo na fenda sináptica. Estes apresentam uma seletividade pelos transportadores de recaptação de serotonina de 20-1500 vezes maior que os transportadores de dopamina, adicionalmente, os SSRIs não estimulam a liberação pré-sináptica de 5-HT ou

noradrenalina. Todavia, alguns efeitos colaterais incluem náuseas, insônia e disfunções sexuais (HILLHOUSE; PORTER, 2015).

Em todas as alternativas farmacológicas uma importante característica merece ser apontada. Estas drogas levam de duas a quatro semanas para apresentarem efeitos antidepressivos em pacientes com transtorno depressivo maior, e mesmo assim, cerca de um terço dos pacientes são resistentes ao tratamento. Neste hiato entre o início do tratamento e o aparecimento dos efeitos antidepressivo o índice de desistência ao tratamento é alto, e em pacientes com idealizações suicidas este tempo é decisivo para a terapêutica. Outros fármacos, antidepressivos atípicos, foram lançados no mercado como alternativa terapêutica. Há inibidores de recaptção de dopamina-noradrenalina e inibidores de recaptção serotonina-noradrenalina. Estes exibem uma boa tolerância terapêutica, e são belas alternativas para pacientes que não se adaptam aos antidepressivos típicos (FAVA; KENDLER, 2000; HILLHOUSE; PORTER, 2015).

Observa-se que a cetamina, uma droga antagonista de receptores glutamatérgicos NMDA, exerce um efeito antidepressivo e antissuicida quase imediatos e duradouros após uma única dose. O efeito deste fármaco inicia dentro de duas horas após sua administração e mantém o efeito por até 72 horas. Estes achados sugerem uma nova classe de fármacos antidepressivos e novas hipóteses sobre a fisiopatogenia do transtorno depressivo maior que serão apresentadas mais adiante (BERMAN *et al.*, 2000; LI *et al.*, 2011)

1.4 Modelo de Depressão por Estresse Crônico Imprevisível

Alguns modelos experimentais em roedores foram propostos para mimetizar o MDD. Os modelos do tipo genéticos e cirúrgicos baseiam-se na inversão dos princípios neuroquímicos das drogas utilizadas no controle da doença e na observação do quadro sintomático após uma intervenção. Estes modelos neuroquímicos são de extrema valia, contudo, muitas vezes falham em relação aos principais fatores ambientais que induzem o MDD (DEL PORTO, 1999; FLECK *et al.*, 2009; HILL *et al.*, 2012). Deste modo, o modelo experimental mais empregado para indução do MDD é o modelo de Estresse Crônico Imprevisível (CUS – do inglês – *chronic unpredictable stress*), que busca mimetizar em roedores o estresse crônico da vida, que é tido como o principal desencadeador do MDD (WILLNER, 2005; BANASR *et al.*, 2007; LI *et al.*, 2010; VENZALA *et al.*, 2013; RAZAFSHA *et al.*, 2013)

O protocolo CUS, também conhecido por *chronic mild stress* ou ainda por *unpredictable chronic mild stress*, foi desenvolvido na década de 80 como o intuito de transpor os eventos estressantes de humanos para roedores. Os principais eventos estressores utilizados no modelo experimental de MDD estão apresentados na Tabela 2. O caráter “imprevisível” é gerado pela ordem aleatória e as variações de intensidade dos eventos estressores empregados; podendo também modificar o tempo de submissão e frequência dos estressores. Neste protocolo os animais são expostos aos eventos estressores por, no mínimo, 10 dias consecutivos, contudo, os resultados mais consistentes são observados em protocolos que ultrapassem os 20 dias de exposição (KATZ, 1982; WILLNER, 2005; BANASR *et al.*, 2007).

Ainda que a depressão apresente um amplo espectro de alterações comportamentais e fisiológicas que não possam ser reproduzíveis integralmente em modelos animais, foram descritas na literatura científica várias semelhanças entre os sintomas clínicos do MDD e o quadro sintomatológico observado no protocolo CUS (CRYAN; HOLMES, 2005; HILL *et al.*, 2012). O estresse crônico em modelos animais é capaz de reduzir a arborização dendrítica dos neurônios do córtex pré-frontal e do hipocampo, diminuindo parâmetros morfológicos como a relação

dendritos/neurônio no córtex pré-frontal medial, o comprimento das ramificações dendríticas e a densidade de espinhos dendríticos de neurônios do córtex pré-frontal medial que recebem aferências da amígdala basolateral (SHANSKY; MORRISON, 2009). Corroborando com estes achados, observou-se que ratos expostos a um protocolo de CUS ao longo de três semanas apresentam também diminuição da densidade de espinhos dendríticos nos neurônios piramidais da camada V do córtex pré-frontal (LI *et al.*, 2010; LI *et al.*, 2011).

Tabela 2 – Principais eventos estressores utilizados no protocolo CUS.

<u>Estressor</u>	<u>Referência</u>
Restrição de água e/ou comida	(BANASR <i>et al.</i> , 2007; CREMA <i>et al.</i> , 2010; LI <i>et al.</i> , 2011; QUAN <i>et al.</i> , 2011a; LIN <i>et al.</i> , 2013; TYE <i>et al.</i> , 2013; VENZALA <i>et al.</i> , 2013)
Inversão de fotoperíodo	(BANASR <i>et al.</i> , 2007; LI <i>et al.</i> , 2011; QUAN <i>et al.</i> , 2011a; QUAN <i>et al.</i> , 2011b; LIN <i>et al.</i> , 2013; TYE <i>et al.</i> , 2013; VENZALA <i>et al.</i> , 2013)
Inclinação (45°) da caixa	(BANASR; DUMAN, 2008; CREMA <i>et al.</i> , 2010; LI <i>et al.</i> , 2011; QUAN <i>et al.</i> , 2011b; LIN <i>et al.</i> , 2013; TYE <i>et al.</i> , 2013; VENZALA <i>et al.</i> , 2013)
Frio (4°C)	(BANASR <i>et al.</i> , 2007; BANASR; DUMAN, 2008; CREMA <i>et al.</i> , 2010; LIN <i>et al.</i> , 2013)
Isolamento	(BANASR <i>et al.</i> , 2007; BANASR; DUMAN, 2008; CREMA <i>et al.</i> , 2010; LI <i>et al.</i> , 2011; TYE <i>et al.</i> , 2013)
Luz estroboscópica	(BANASR <i>et al.</i> , 2007; BANASR; DUMAN, 2008; CREMA <i>et al.</i> , 2010; LI <i>et al.</i> , 2011; LIN <i>et al.</i> , 2013; TYE <i>et al.</i> , 2013; VENZALA <i>et al.</i> , 2013)
Rotação da caixa	(BANASR <i>et al.</i> , 2007; BANASR; DUMAN, 2008; LI <i>et al.</i> , 2011)
Odor aversivo	(BANASR <i>et al.</i> , 2007; BANASR; DUMAN, 2008; LI <i>et al.</i> , 2011; VENZALA <i>et al.</i> , 2013)
Superlotação	(BANASR <i>et al.</i> , 2007; LI <i>et al.</i> , 2011; TYE <i>et al.</i> , 2013)
Maravalha úmida	(BANASR <i>et al.</i> , 2007; LIN <i>et al.</i> , 2013; TYE <i>et al.</i> , 2013)
Restrição motora	(CREMA <i>et al.</i> , 2010; VENZALA <i>et al.</i> , 2013)
Choque inescapável	(QUAN <i>et al.</i> , 2011a; QUAN <i>et al.</i> , 2011b)
Nado forçado	(BANASR <i>et al.</i> , 2007; CREMA <i>et al.</i> , 2010; QUAN <i>et al.</i> , 2011a; QUAN <i>et al.</i> , 2011b)
Beliscão na cauda	(QUAN <i>et al.</i> , 2011a; QUAN <i>et al.</i> , 2011b)
Ruído branco	(LIN <i>et al.</i> , 2013; TYE <i>et al.</i> , 2013; VENZALA <i>et al.</i> , 2013)

Em relação às células gliais e os modelos experimentais de depressão, detectou-se que a lesão astrocítica induzida pela administração de ácido α -aminoadípico no córtex pré-frontal - uma toxina específica para astrócitos - foi capaz de induzir um comportamento depressivo semelhante ao produzido pelo modelo de depressão por estresse crônico, apoiando a hipótese de que a diminuição da atividade astrocitária, com conseqüente diminuição do aporte energético neuronal e desbalanço nas funções de recaptação de neurotransmissores e manutenção do equilíbrio eletrolítico na fenda sináptica, contribuem para o desenvolvimento dos sintomas relacionados com a depressão (BANASR; DUMAN, 2008; GOSELIN *et al.*, 2009).

Os níveis de serotonina, assim como no MDD em humanos, estão diminuídos nos encéfalos de ratos submetidos ao protocolo CUS, sendo esta diminuição mais observada no córtex pré-frontal e no estriado e também há um aumento da atividade da MAO. Por outro lado, existem estudos com resultados contrários, onde não foram encontradas as diferenças citadas anteriormente neste mesmo modelo; esta discrepância está, provavelmente, relacionada às diferenças metodológicas para a mensuração dos marcadores. Foi observado também um aumento da expressão de receptores 5-HT_{2A} (excitatório) e uma diminuição dos receptores 5-HT_{1A} (inibitório), porém ainda não está definido se esta alteração sobre os receptores é em resposta ao estresse ou um mecanismo compensatório aos baixos níveis de serotonina. (BEKRIS *et al.*, 2005; RASHEED *et al.*, 2008; BHUTANI; BISHNOI; KULKARNI, 2009; AHMAD *et al.*, 2010; LAUGERAY *et al.*, 2010; HILL *et al.*, 2012).

A alteração mais consistente sobre o sistema noradrenérgico no encéfalo de ratos expostos ao protocolo CUS é o aumento na expressão dos receptores β -adrenérgicos (excitatório) corticais, assim como é observado em pacientes com MDD. O receptor β -adrenérgico apresenta uma regulação inversa à presença de noradrenalina, sendo assim, aponta a uma diminuição dos níveis desta catecolamina no encéfalo. Contribuindo com esta ideia, foi observada uma diminuição do RNA mensageiro para tirosina hidroxilase no locus coeruleus. Porém, as análises de noradrenalina no modelo CUS ainda são controversas. Muitos estudos indicam

queda nos níveis de noradrenalina, mas também há uma quantidade substancial de estudos que demonstram que os níveis de noradrenalina permanecem inalterados durante a execução deste protocolo (HARRO *et al.*, 1999; PAPP *et al.*, 2002; RASHEED *et al.*, 2008; BHUTANI; BISHNOI; KULKARNI, 2009; HILL *et al.*, 2012).

O encéfalo de ratos expostos ao protocolo CUS apresenta uma diminuição dos níveis de dopamina, mais especificamente no córtex pré-frontal e no hipocampo. Os níveis de dopamina estriatal parecem estar sujeitos às alterações temporais ao longo da execução do protocolo CUS, uma vez que ratos submetidos à cerca de sete dias deste protocolo apresentam diminuição dos níveis de dopamina estriatal, enquanto os animais expostos por cerca de 10 dias apresentaram níveis estriatais desta catecolamina semelhantes aos animais controle e animais submetidos a protocolos CUS de longa duração (42-56 dias) apresentaram aumentos nos níveis de dopamina nesta região encefálica. Adicionalmente, a atividade dos receptores dopaminérgicos D1 (excitatórios) está elevada, enquanto os receptores dopaminérgicos D2 (inibitório) permanecem inalterados. Isto é exatamente o oposto do que é encontrado em humanos, sendo assim, são necessários mais trabalhos para caracterizar melhor o sistema dopaminérgico no modelo CUS (BEKRIS *et al.*, 2005; YI *et al.*, 2008; BHUTANI; BISHNOI; KULKARNI, 2009; JOHNSON; YAMAMOTO, 2009; AHMAD *et al.*, 2010; RASHEED *et al.*, 2010; HILL *et al.*, 2012).

1.5 Área Tegmental Ventral

A área tegmental ventral (VTA – do inglês – *ventral tegmental area*) é uma população neuronal na base do mesencéfalo, reconhecida pela sua função no circuito de motivação e recompensa. No início da década de 80 esta região foi identificada como um importante centro dopaminérgico do sistema nervoso central, e desde então, tem sido estudado seu envolvimento em comportamentos motivacionais, hedônicos, e sociais (GRACE; BUNNEY, 1980; GUNAYDIN *et al.*, 2014). Anatomicamente, a VTA pode ser dividida em duas grandes porções, lateral e

medial, dada a sua distinta hodologia. A partir da porção lateral, os neurônios dopaminérgicos se projetam para o núcleo accumbens *shell* lateral; os neurônios da porção medial conectam-se ao núcleo accumbens *shell* medial, ao núcleo accumbens *core*, à amígdala basolateral e ao córtex pré-frontal (Figura 3). Considerando a sua heterogeneidade citoarquitetônica, a VTA pode ser dividida em diversos núcleos: núcleo paranigral (PN – do inglês – paranigral nucleus), núcleo parabraquial pigmentoso (PBP), núcleo interfascicular (IF) e o núcleo tegmental rostromedial (Figuras 3 e 4). Lateralmente a VTA, estão outros importantes centros dopaminérgicos do mesencéfalo: a substância *nigra pars* compacta (SNc) e a substância *nigra pars* reticulada (SNr), e ainda há o lemnisco medial. Na linha média, ventralmente a VTA, está o núcleo interpeduncular (IPN – do inglês – interpeduncular nucleus) (Figura 3) (YAMAGUCHI *et al.*, 2011; LAMMEL; LIM; MALENKA, 2014; PAXINOS; WATSON, 2014).

A VTA é composta por três subpopulações de neurônios. A primária, e mais abundante, é a população dopaminérgica que abrange 60-65% dos neurônios. A subpopulação secundária é GABAérgica que ocupa cerca de 35% dos neurônios, e a terciária, com cerca de 5%, é glutamatérgica. Mas, há ainda um fator de complexidade nesta região. Foi observado que alguns neurônios marcados com tirosina hidroxilase (TH), uma enzima limitante da síntese de dopamina, também expressavam o transportador vesicular de glutamato 2 (VGluT2), o que sugere que estes neurônios possam co-liberar dopamina e glutamato (YAMAGUCHI *et al.*, 2011; MORALES; ROOT, 2014; POLTER; KAUER, 2014).

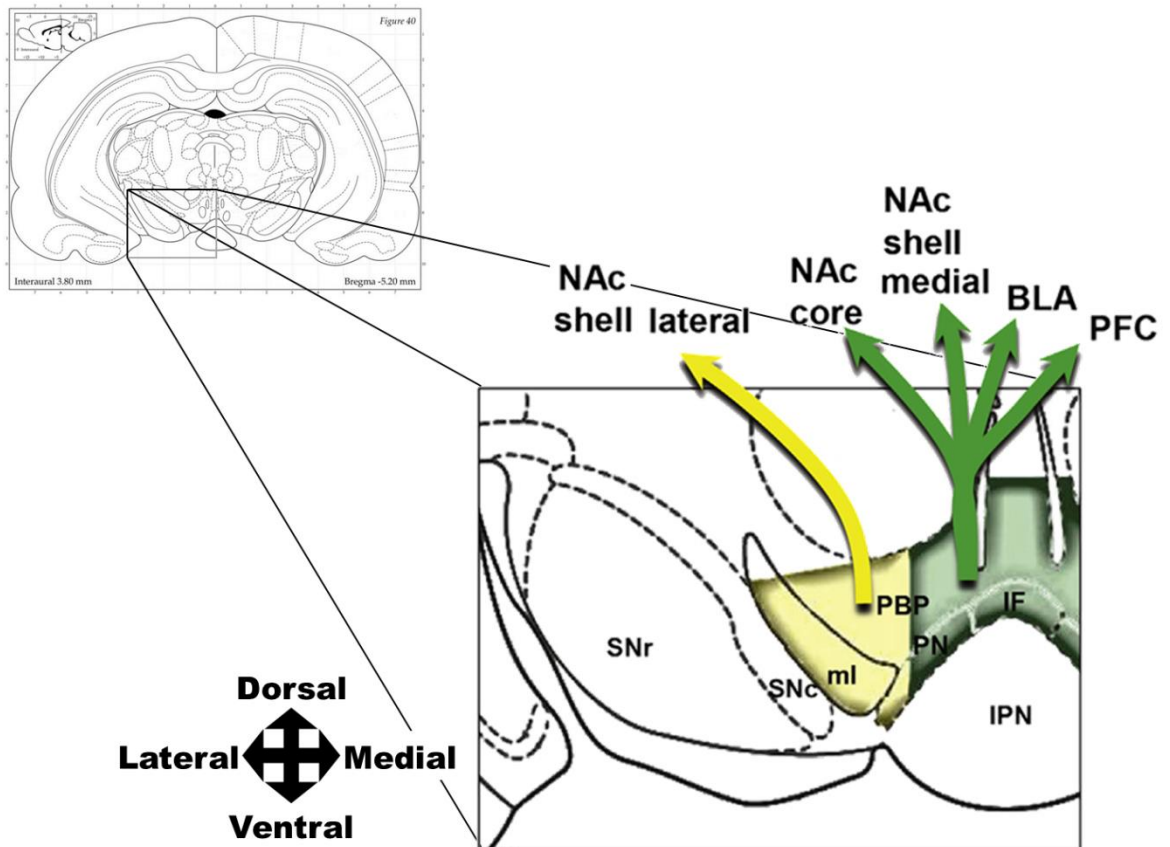


Figura 3 – Hodologia da área tegmental ventral. Em amarelo a porção lateral da VTA e em verde a porção medial. Note a localização da VTA na base do mesencéfalo e sua distinta hodologia nas porções lateral e medial, os axônios que partem em direção ao NAc (núcleo accumbens) e a BLA (amígdala basolateral) formam projeções mesolímbicas, enquanto os axônios projetados para o PFC (córtex pré-frontal) formam projeções mesocorticais. IF, núcleo interfascicular; IPN, núcleo interpeduncular; ml, lemnisco medial; PBP, núcleo parabraquial pigmentado;; PN, núcleo paranigral; SNc, substancia *nigra* pars compacta; SNr, substancia *nigra* pars reticulada.(Adaptado de Paxinos 2014 e Lammel 2014)

A VTA é o ponto de partida do circuito de motivação e recompensa, sendo assim, é razoável considerarmos que sua função esteja comprometida na fisiopatologia do transtorno depressível maior. A região recebe aferências do hipocampo e de núcleos pontinos, processa a informação e, através de um mecanismo de marca-passo, transmite os impulsos para as regiões envolvidas com a motivação (córtex pré-frontal) e a recompensa (núcleo accumbens). Nesta região, em modelos de depressão, foi descrito aumento do nível de tirosina hidroxilase, e estudos recentes constataram que nestes modelos de depressão a taxa de disparos encontra-se alterada; sendo possível reverter o quadro depressivo destes animais ao modular a taxa de disparos da VTA (TYE *et al.*, 2013; GUNAYDIN *et al.*, 2014; FRIEDMAN *et al.*, 2014).

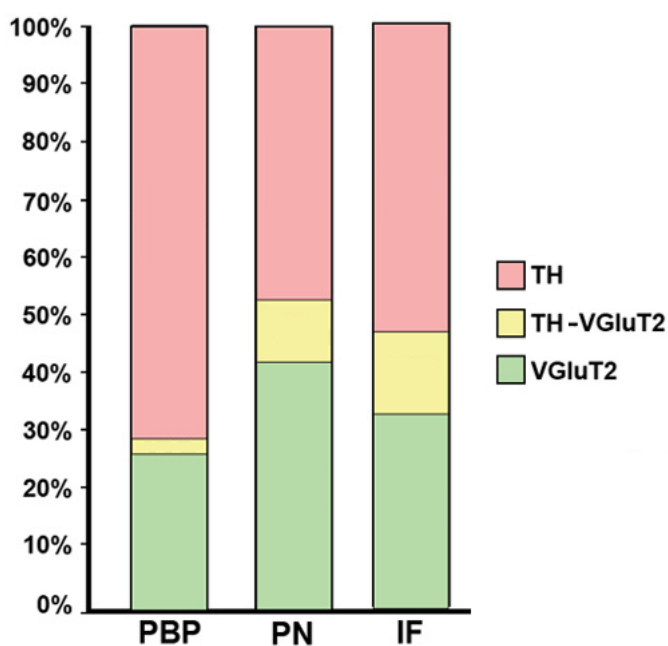


Figura 4 – Distribuição dos neurônios dopaminérgicos e glutamatérgicos na VTA. TH são neurônios imunorreativos para tirosina hidroxilase e não expressam VGluT2. TH-VGluT2 são neurônios imunorreativos para TH e co-expressam VGluT2, VGluT2 são neurônios que expressam a VGluT2 mas não são imunorreativos para TH. Note a heterogeneidade dos núcleos, enquanto o PBP (núcleo parabraquial pigmentado) apresenta uma pequena quantidade (~5%) neurônios imunorreativos para TH-VGluT2, enquanto no PN (núcleo paranigral) e no IF (núcleo interfascicular) este nível está em torno de 10-15%. Note também que neste gráfico não são apresentados dados de neurônios GABAérgicos. (Adaptado de Yamaguchi 2011)

1.6 Cetamina como antidepressivo

A descoberta do efeito antidepressivo da cetamina é um dos maiores saltos da psicofarmacologia da última década. A cetamina, que atua antagonizando os receptores glutamatérgicos NMDA, originalmente usada como um agente anestésico, foi muito utilizada em humanos durante as décadas de 1960 e 1970, atualmente é empregado em larga escala na clínica veterinária e pediatria. Contudo, essa droga vem chamando a atenção da comunidade científica em virtude de estudos da última década (KRYSTAL; SANCORA; DUMAN, 2013). Pesquisas que investigam o efeito antidepressivo da cetamina datam da década de 1990, mas foi em um estudo realizado por Berman et al., 2000, que observou-se a possibilidade de utilizar a cetamina em um ambiente clínico. Neste estudo randomizado e duplo-cego, nove pacientes com MDD receberam infusões intravenosas de cetamina (0,5 mg/kg) ou salina por 40 minutos. Os pesquisadores observaram que os voluntários que haviam recebido a infusão de cetamina apresentaram melhora em seus escores na escala de Hamilton para avaliação da depressão em menos de quatro horas após o início da administração de cetamina, e os escores continuaram a melhorar por até três dias após a infusão (BERMAN *et al.*, 2000). Este efeito antidepressivo, rápido, duradouro, gerado por uma única administração de cetamina em um ensaio clínico impulsionou novas pesquisas que avaliam o sistema glutamatérgico no MDD e a elaboração de novas hipóteses sobre a fisiopatogenia da depressão.

A teoria mais bem estabelecida sugere que ao bloquear os receptores NMDA, o glutamato liga-se mais intensamente aos receptores AMPA. Esta ligação leva a um aumento da atividade da rota da *mammalian target of rapamycin* (mTOR) que: 1) aumenta a expressão de receptores AMPA no botão pós-sináptico, alterando a densidade de receptores NMDA/AMPA glutamatérgicos; 2) aumenta a concentração de botões sinápticos, pois a ativação da mTOR eleva os níveis de proteínas sinápticas como a sinapsina I, PSD95 e GluR1 (LI *et al.*, 2010; KRYSTAL; SANCORA; DUMAN, 2013; NAUGHTON *et al.*, 2014) (Figura 5). O bloqueio dos receptores NMDA pela cetamina causa um decréscimo da ativação da quinase do

fator de alongação eucariótico 2 (eEF2), que gradativamente leva a uma diminuição de fosforilação da eEF2 e, conseqüentemente, reinstaura a tradução do fator neurotrófico derivado do encéfalo (BDNF). A tradução do BDNF ativa a cascata de sinalização pela quinase do receptor de tropomiosina B (TrK B), que leva a uma ativação das quinases relacionadas a sinalização extracelular (ERK) e da proteína quinase B (Akt) e suprimindo a quinase de glicogênio sintase 3 (GSK-3). Essas sinalizações ativam a mTOR, levando a um aumento das proteínas sinápticas citadas acima (Figura 5). Estas proteínas auxiliam na remodelagem dos botões sinápticos, gerando assim, os efeitos antidepressivos comportamentais nos animais modelos de depressão e, possivelmente, seja o mecanismo que gera os efeitos benéficos sobre o humor dos pacientes deprimidos (NAUGHTON *et al.*, 2014).

Em respeito aos receptores NMDA, estes estão presentes em quase todas as células neuronais e fazem parte da família de receptores ionotrópicos glutamatérgicos, este receptor é composto por quatro subunidades que estão ancoradas no botão sináptico pela proteína de densidade pós-sináptica 95 (PSD95), Para sua ativação, além de necessitar da ligação do glutamato, o receptor NMDA necessita da ligação de uma molécula de glicina concomitantemente e de uma despolarização prévia da membrana. Esta despolarização libera um íon de magnésio que bloqueia o canal, permitindo assim a entrada de sódio e, em menor escala, cálcio para o interior da célula e a saída de potássio. A cetamina atua bloqueando o canal, sobre o mesmo sítio de ligação do íon de magnésio (MION; VILLEVIEILLE, 2013). Estudos continuam avaliando os efeitos antidepressivos de inibidores de receptores NMDA e investigando outras vias de administração de cetamina, para produzir uma rápida resposta antidepressiva em pacientes que sofrem de MDD (OLFSON; MARCUS; SHAFFER, 2006; PRICE *et al.*, 2009; LARA; BISOL; MUNARI, 2013). Alguns dos achados mais notáveis do uso de cetamina podem ser observados na clínica médica recente, onde temos o registro de um intenso efeito antidepressivo e antissuicida, cerca de uma hora após a administração endovenosa de 0,5 mg/kg de cetamina em pacientes bipolares ou com depressão maior (AAN HET ROT *et al.*, 2010; ZARATE JR *et al.*, 2012).

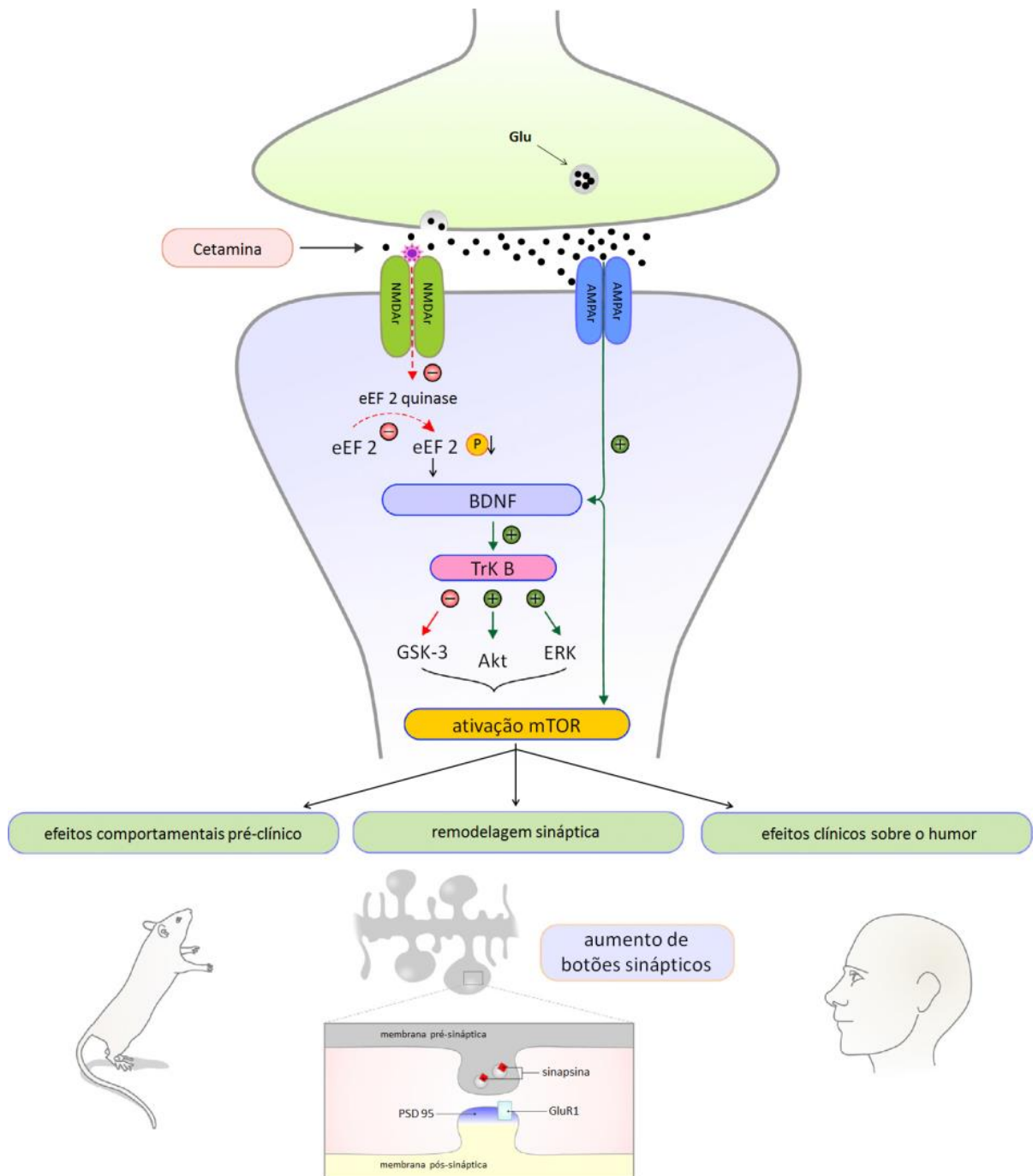


Figura 5 – Mecanismo de ação do efeito antidepressivo da cetamina. O glutamato (Glu) é liberado e, estando os receptores NMDA (NMDAr) bloqueados pela cetamina, o Glu liga-se aos receptores AMPA (AMPAr). Isto inibe a quinase que fosforila o fator de alongação eucariótico 2 (eEF2), retomando a atividade do fator neurotrófico derivado do encéfalo (BDNF). A ativação do BDNF ativa a quinase do receptor de tropomiosina B (Trk B), que inibe a atividade da quinase de glicogênio sintase 3 (GSK-3) e ativa a proteína quinase B (Akt) e as quinases relacionadas a sinalização extracelular (ERK). A ação da GSK-3, Akt e ERK ativam a *mammalian target of rapamycin* (mTOR) e assim podemos observar os efeito antidepressivos e de remodelamento sináptico. (Adaptado de Naughton 2014)

1.7 Tomografia por emissão de pósitrons para pequenos animais

Recentemente em nossa universidade foi adquirido um equipamento de tomografia por emissão de pósitrons para pequenos animais (microPET) (Triumph® II microPET LabPET-4®, TriFoil Imaging), este foi instalado no Centro de Pesquisas Pré-clínica do Instituto do Cérebro do Rio Grande do Sul – INSCER-PUCRS com o intuito de fortalecer e modernizar as pesquisas científicas neste campo do conhecimento. O microPET, apesar de seu tamanho ser reduzido, funciona exatamente como a tomografia por emissão de pósitrons (PET – do inglês *positron emission tomography*) em humanos, sem perda de resolução. O PET é uma técnica de medicina nuclear, com ele é possível mapear temporal-espacialmente a distribuição de moléculas marcadas com radionuclídeos (LANCELOT; ZIMMER, 2010).

Um grande limitante da maior parte de procedimentos científicos tradicionais era a necessidade de eutanasiar os animais para fazer as mensurações que avaliem a funcionalidade do encéfalo, dificultando estudos longitudinais. Esta nova técnica desenvolvida possibilita determinar a distribuição de moléculas *in vivo* nos tecidos, permitindo análises repetidas de um mesmo animal para estudos longitudinal, e talvez mais importante, possibilitando a realização de múltiplas avaliações sobre os processos biológicos e bioquímicos em mesmo animal utilizando diferentes rádio-traçadores (VIRDEE *et al.*, 2012).

Os rádio-traçadores são os fatores determinantes durante uma avaliação de microPET, estes são moléculas previamente conhecidas nas quais foram conjugadas radionuclídeos emissores de pósitrons produzidos em um ciclotron. Quando o rádio-traçador é injetado em um animal, este vai seguir a distribuição normal da molécula utilizada e acumular-se em diferentes regiões corporais conforme sua farmacodinâmica. Enquanto isso, o radionuclídeo conjugado decai e libera pósitrons que reagem com elétrons, em um processo chamado aniquilação, e emanam dois fótons gama com energia de 511 keV em direções opostas, que são então captados pelos detectores no equipamento do microPET. Um computador

calcula a probabilidade de dois eventos a 180° percebidos pelos detectores serem de um mesmo evento de aniquilação, retraça o percurso dos fótons e reconstrói a distribuição molecular do rádio-traçador espacialmente. Os rádio-traçadores irão distribuir-se pelo corpo e acumular-se nas regiões onde tenham mais afinidade ou onde estejam sendo mais requisitados. Aquelas regiões, então, irão emitir mais fótons gama e estarão mais visíveis na reconstrução da imagem. Adicionalmente, por ser uma radiação de forma controlada ainda é possível quantificar a atividade radioativa (Figura 6) (LANCELOT; ZIMMER, 2010).

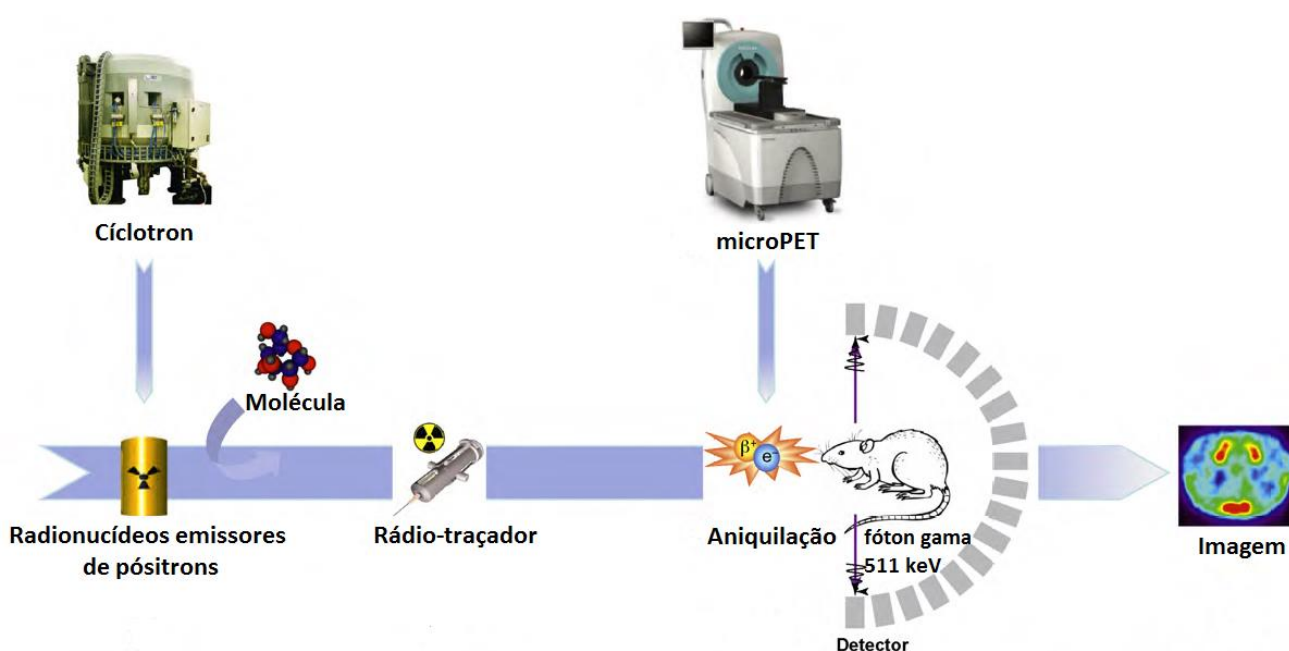


Figura 6 – Princípios do microPET. O cíclotron, um acelerador de partículas, produz radionuclídeos que emitem pósitron. Estes radionuclídeos são conjugados a moléculas e tornam-se um rádio-traçador. Para o escaneamento do microPET o rádio-traçador é administrado a um animal de pequeno porte que é colocado, anestesiado, dentro do equipamento. O rádio-traçador irá acumular nos tecidos a serem estudados, e o decaimento do seu radionuclídeos libera os pósitrons. Estes pósitrons percorrem alguns milímetros dentro do tecido até colidirem com um elétron. Nesta colisão as partículas são aniquiladas e liberam dois raios de fótons gama em direções opostas, com energia de 511 keV. Estes fótons são captados pelo anel de detectores no equipamento. Com base na percepção temporal dos fótons, um computador calcula a rota dos fótons e reconstrói uma imagem tridimensional que mostra a distribuição temporal-espacial da molécula emissora de pósitrons (Adaptado de Lancelot 2010).

1.7.1 microPET para estudos do metabolismo

Um dos maiores desafios da neurociência é identificar as diferenças metabólicas no encéfalo. A identificação do metabolismo é realizada tradicionalmente através da mensuração de metabólitos que estejam presentes em qualquer fase do metabolismo (captação, glicólise, ciclo de Krebs e cadeia respiratória) utilizando técnicas bioquímicas, histoquímicas e imunoistoquímicas para avaliar estes metabólitos. Porém, todas estas técnicas são extremamente invasivas, e geralmente necessitam a eutanásia do animal para retirada do tecido encefálico. Adicionalmente, se for necessário uma avaliação longitudinal, o número de animais utilizados pode duplicar, triplicar, ou mais dependendo de quantas repetições da técnica necessitem ser realizadas ao longo do experimento. Para a avaliação da atividade metabólica pelo microPET foi desenvolvido o 18-Fluorodeoxiglicose (^{18}F -FDG), um rádio-traçador análogo a glicose com a finalidade de aferir o metabolismo de glicose. Com cerca de 95% da energia encefálica derivada da oxidação aeróbica da glicose, o ^{18}F -FDG tornou-se o rádio-traçador mais utilizado atualmente para avaliar o metabolismo encefálico. O 18-Fluorodeoxiglicose é um análogo de glicose, que tem conjugado o radionuclídeo [^{18}F] emissor de pósitrons na posição 2' da molécula de glicose substituindo um grupo hidroxila. Uma vez dentro da célula o ^{18}F -FDG é fosforilado e isto evita que o rádio-traçador seja excretado da célula, adicionalmente, a retirada da hidroxila para a conjugação do [^{18}F] impede a continuação da rota glicolítica, sendo assim o ^{18}F -FDG fica retido no citosol neuronal até o decaimento completo da radioatividade. Desta forma, a distribuição de ^{18}F -FDG é um bom indicativo da demanda metabólica celular (WIENHARD, 2002; SOUTHWORTH *et al.*, 2003). Para o procedimento ^{18}F -FDG-microPET, o rádio-traçador é injetado no animal pela veia caudal, por exemplo, e então este é colocado no equipamento sob anestesia e a mensuração e reconstrução da imagem são feitas. Este procedimento é minimamente invasivo (somente um injeção) e dentro de alguns minutos o animal retoma consciência plena, estando apto para outras avaliações no próprio microPET ou para análises comportamentais, bioquímicas e/ou histológicas.

1.7.2 Metabolismo encefálico no MDD e CUS

A avaliação do metabolismo de glicose utilizando o ^{18}F -FDG-microPET em pacientes com o transtorno depressivo maior não são o foco das investigações, em sua grande maioria, estes estudos utilizam rádio-traçadores que marcam os receptores ou transportadores de dopamina e serotonina. Foi com o auxílio destes estudos que hoje sabemos das alterações sobre os receptores monoaminérgicos descrito no início desta tese. Contudo, estes tipos de rádio-traçadores não são o foco deste trabalho, eles são perspectivas futuras após a implementação e validação do ^{18}F -FDG. Não há alterações marcantes sobre o metabolismo encefálico no MDD, os estudos que avaliem a distribuição de ^{18}F -FDG no encéfalo de pacientes com o transtorno depressivo maior são bastante divergentes. As alterações mais comuns são uma diminuição do metabolismo de glicose nos lobos insulares bilaterais, nos núcleos caudado-putamen e no giro cingulado direito, ademais, observa-se também uma diminuição da ativação do tálamo e cerebelo em pacientes com MDD (SU *et al.*, 2014).

Em modelos animais de depressão a avaliação do metabolismo é mais diversificada, analisando vários marcadores. Dentre todos possíveis marcadores, as técnicas mais utilizadas para mensuração do metabolismo neuronal são as avaliações bioquímicas e histoquímicas da enzima citocromo c oxidase (COX). A COX é uma enzima limitante da cadeia transportadora de elétrons da mitocôndria, e sua atividade está diretamente ligada ao metabolismo celular. Estudos com modelos animais para o MDD apontam que o núcleo da rafe, área preóptica medial e da amígdala medial e cortical aumentam a atividade enzimática da COX com o estresse crônico, mas no locus coeruleus a atividade diminui. Em contrapartida, em animais suscetíveis*, o tálamo, o hipocampo, o córtex retrosplenial, e os núcleos pontinos estão mais ativados (HEVNER; LIU; WONG-RILEY, 1995; VILLARREAL *et al.*, 2002; HARRO *et al.*, 2011; HARRO *et al.*, 2014; DETKA *et al.*, 2015). Existem poucos estudos que avaliem a distribuição de ^{18}F -FDG no encéfalo de animais submetidos ao protocolo CUS. Em um estudo foi observado que em ratos expostos ao protocolo

CUS, a área amígdalohipocampal diminuiu sua captação do rádio-traçador. Outro estudo mostrou que, após serem expostos ao protocolo CUS, os animais aumentaram o metabolismo de glicose no córtex auditivo esquerdo e diminuíram no córtex piriforme esquerdo, no colículo inferior esquerdo e na substância cinzenta periaquedutal (HU *et al.*, 2010; VIRDEE *et al.*, 2012; LIN *et al.*, 2013).

Um ponto técnico a ser levantado, é a falta de um estudo que mapeie detalhadamente a distribuição do ^{18}F -FDG pelo encéfalo de um rato Wistar adulto, normal. O rato Wistar é um modelo animal valioso para os estudos pré-clínicos, sendo um roedor amplamente utilizado em diferentes campos das ciências biomédicas. Um estudo que padronize esta distribuição é essencial para pesquisas futuras que venham a utilizar o microPET, inclusive pesquisas avaliando o transtorno depressivo maior.

* A susceptibilidade é outra forma de avaliar um animal modelo para MDD. Neste caso, os animais são classificados como suscetíveis ou resilientes, conforme seu comportamento, à indução de um quadro similar de depressão. Esta avaliação é um análogo a diátese em humanos (predisposição ao MDD). Quanto mais suscetível, maior a probabilidade de um animal apresentar um quadro depressivo.

2 JUSTIFICATIVA

As mudanças da vida cotidiana estão impactando profundamente a saúde mental dos seres humanos. O aumento da incidência do transtorno depressivo maior (MDD), além de prejudicar o paciente, está sobrecarregando a sociedade e a economia mundial. Com base nos principais sintomas do MDD, anedonia e desmotivação, é presumível que haja um envolvimento da área tegmental ventral (VTA) na fisiopatogenia deste distúrbio. A VTA é uma região do mesencéfalo creditada como o ponto de início do circuito de motivação e recompensa do encéfalo. Da VTA partem projeções dopaminérgicas, seu principal neurotransmissor, para outras áreas encefálicas, mas esta região também tem em sua composição uma fração de neurônios glutamatérgicos. Estes neurônios glutamatérgicos constituem um alvo interessante para a ação da cetamina. Sendo assim, é interessante estudar a influência da cetamina sobre o comportamento, o perfil dopaminérgico e o metabolismo de glicose na VTA em animais submetidos ao protocolo de estresse crônico imprevisível (CUS). Entretanto, é necessário primeiramente a padronização de um protocolo de utilização de ^{18}F -fluorodeoxiglicose (^{18}F -FDG) no equipamento de microPET. Adicionalmente, é válida a confecção de um atlas metabólico detalhado do encéfalo de ratos Wistar, machos, adultos, saudáveis, utilizando o ^{18}F -FDG e comparação desta avaliação a métodos tradicionais de mensuração de metabolismo, como as técnicas histoquímicas e bioquímicas para detecção da COX. Deste modo, obteremos um melhor entendimento a respeito da fisiopatogenia do MDD, um distúrbio psiquiátrico que aflige uma grande parte da população mundial; e conheceremos de forma mais detalhada as vias de ação de um fármaco promissor para o tratamento desta patologia.

3 OBJETIVOS

Pré-requisito: Padronizar a técnica de ^{18}F -fluorodeoxiglicose (^{18}F -FDG) para análise de metabolismo encefálico utilizando o equipamento de tomografia por emissão de pósitron para pequenos animais (microPET).

3.1 Objetivo Geral

Avaliar as alterações comportamentais, neurometabólicas e histofisiológica dopaminérgica da área tegmental ventral (VTA) de ratos Wistar submetidos ao protocolo depressor por estresse crônico imprevisível (CUS) e tratados agudamente com cetamina.

3.2 Objetivos Específicos

1. Artigo científico um

- (1) Elaborar um atlas detalhado da captação de (^{18}F -FDG) no encéfalo de ratos Wistar utilizando a técnica do microPET;
- (2) Correlacionar os dados do ^{18}F -FDG-microPET à estudos com avaliações bioquímicas e histoquímicas da enzima citocromo c oxidase (COX).

2. Artigo científico dois

- (1) Avaliar o comportamento símil-depressivo, por meio dos testes do campo aberto, nado forçado e de preferência por sacarose em ratos Wistar submetidos a um protocolo de CUS e tratados agudamente com cetamina;
- (2) Verificar as alterações metabólicas encefálicas utilizando ^{18}F -FDG pela técnica de microPET na VTA;
- (3) Verificar as alterações da histofisiologia dopaminérgica da VTA, com uso da técnica imunohistoquímica para tirosina hidroxilase (TH).

4 METODOLOGIA, RESULTADOS E DISCUSSÃO

A metodologia, os resultados e a discussão serão apresentados em forma de artigos científicos.

4.1 Artigo Científico I: *The Brain Metabolic atlas of Wistar rats – A study using ¹⁸F-Fluorodeoxyglucose.*

Artigo em fase de elaboração.

The brain metabolic atlas of Wistar rats - A study using ^{18}F -Fluorodeoxyglucose

AUTHORS

Pedro Porto Alegre **Baptista**^{a,*}, Samuel **Greggio**^b, Gianina Teribele **Venturin**^b, Isadora Lopes **Alves**^c, Cristina Maria Moriguchi **Jeckel**^b, Jaderson Costa **DaCosta**^b, Régis Gemerasca **Mestriner**^a, Léder Leal **Xavier**^a.

^a Laboratório de Biologia Celular e Tecidual, Departamento de Ciências Morfofisiológicas, Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul, Porto Alegre - RS, Brazil.

^b Instituto do Cérebro do Rio Grande do Sul – INSCER-PUCRS, Porto Alegre - RS, Brazil.

^c Nuclear Medicine and Molecular Imaging Department, University Medical Center Groningen, Groningen – Netherlands.

*CORRESPONDING AUTHOR

Pedro Porto Alegre Baptista, MSc.

Departamento de Ciências Morfofisiológicas

Faculdade de Biociências

PUCRS

Avenida Ipiranga, 6681

Prédio 12, Sala 104

Porto Alegre, RS, Brasil

CEP:90619-900

e-mail: pedro.baptista@acad.pucrs.br

phone: +55 (51) 3320-3545

ABSTRACT

Mapping out the precise metabolic profile of the brain has been a challenge. The metabolic marker cytochrome c oxidase (COX) is one of the most classical and respected histochemical techniques employed, which eventually led to a Nobel Prize of Physiology or Medicine. However, it presents some very important technical limitations. Luckily, modern technologies help researchers overcome some of these difficulties. The small animal positron emission tomography (microPET) offers a way to evaluate the distribution of labeled molecules throughout the body *in vivo*. To examine the metabolic pattern of the brain with the microPET a glucose analogous has been developed, the ^{18}F -fluorodeoxyglucose (FDG), which is currently the most used metabolic tracer for brain imaging. In this research, we sought out to provide a more detailed map out the distribution of FDG uptake in the brain of Wistar rats, and additionally, to compare to previously published works which mapped out the distribution of COX in the rat brain. For this study we used four Wistar rats, adults, males. The animals were injected with 1mCi of FDG through the caudal vein, and then they underwent a 30 minute period of conscious tracer uptake. The animals were scanned for a 1-hour period in the microPET equipment, where they were individually anesthetized and placed on a heated pad, in a head-prone position. The images were reconstructed and were spatially normalized into a FDG template. The COX studies selected were the five most relevant studies according to the Web of Knowledge database which met the inclusion and exclusion criteria. We evaluated a total of 56 brain regions. Firstly, we tested for laterality and found no difference. Second, we compared our results to the five COX studies, and found only one to be correlated ($r=0.56$; $P=0.02$). Also, we noticed some characteristics worth mentioning since FDG has a predilection for gray matter, thus (1) the cortex areas should be clearly visible, (2) white matter areas and ventricles should present a fainter intensity of uptake, and (3) the basal ganglia and midbrain should have a homogeneous uptake. This study, to the best of our knowledge, is the first to quantitatively map the FDG distributions in Wistar rats, and we trust it will aid future researches in the same topic.

Keywords: microPET, ^{18}F -fluorodeoxyglucose, Wistar rats, rat brain atlas, brain metabolism; cytochrome oxidase.

1. INTRODUCTION

The rat brain is divided in over 900 regions [1]. To identify metabolic differences between these regions is one of the most thrilling challenges in neuroscience [2,3,4,5,6,7,8,9,10].

To examine this demand, classical studies use cytochrome c oxidase (COX) histochemistry as a metabolic marker, since COX is rate-limiting enzyme in the mitochondrial electron transport chain, it is directly linked to ATP production [11,12]. Analyzing the recent neuroscience history, this histochemical technique was very important to understand the metabolism and physiology of nervous system in rats, monkeys, and other vertebrates [2,3,13,14,15]. COX has been an essential tool to understand the physiology of visual processing, eventually leading Hubel and Wiesel to a Nobel Prize of Physiology or Medicine in 1981 [14,15,16]. The data obtained from histochemical methods, such as COX, have very fine details and can show alterations at cellular levels. However, these studies present some very important technical limitations: 1- the subjectivity and expertise from the researcher in qualitative analysis; 2- the influence of brain section thickness on the reaction; 3- the enzyme reaction time; 4- the fixation and post-fixation time, 5- the presence of histological artifacts bias, 6- the discouragement of comparison of data obtained from immunohistochemistry performed in different dates, 7- the impossibility to perform an *in vivo* analysis, and 8- the single assessment of the tissue [17,18,19].

A modern tool for assessing the distribution of labeled molecules *in vivo*, the small animal positron emission tomography (microPET), helps solve some issues from the histochemical techniques. The microPET has the following advantages: 1- it is an *in vivo* analysis, 2- the tissue remains intact and functional, 3- the measurements are quantitative, 4- the possibility of repeated assessments on the same animal. For the microPET, the glucose-analogous radiotracer ¹⁸F-fluorodeoxyglucose (FDG) was developed and it is currently the most used radiotracer to estimate the energetic metabolism profile in the brain tissue [7,20,21]. There are several studies analyzing FDG uptake of different rat brain regions under a plethora of experimental designs [22,8,6,9,10,23], however, there are only a few studies utilizing Wistar rats and there is no studies in the literature showing an atlas of FDG uptake in adult, male, healthy Wistar rat brain.

Thus, the aim of this study is to provide a more complete brain metabolic atlas, based on FDG uptake, from one of the most used animal model in neuroscience, the adult, male, healthy Wistar rat. Additionally, we will present comparison of our results with other similar metabolic studies using COX.

2. MATERIALS AND METHODS

2.1. Animals

For this study four Wistar rats, 90 days old, and males were used. The animals were obtained from the Centro de Reprodução e Experimentação de Animais de Laboratório (CREAL) – UFRGS. The animals were housed in a rat vivarium at the Centro de Modelos Biológicos Experimentais (CeMBE) – PUCRS on ventilated racks with controlled temperature and humidity. They were kept in a 12-hour light-dark cycle, with water and food *ad libitum*.

All procedures were in accordance with the Guide for the Care and Use of Laboratory Animals adopted by the National Institute of Health (USA), and with the university's ethical committee, Comissão de Ética de Uso de Animais (CEUA) – PUCRS under the protocol: CEUA 12/00297-PUCRS.

2.2. ^{18}F -fluorodeoxyglucose Production

The ^{18}F -fluoride ions were produced using an on-site cyclotron (PET Trace 16 MeV; GE Medical System) and transferred to an automated synthesis system (Fastlab GE). The synthesis of ^{18}F -fluorodeoxyglucose (FDG) was performed according to the Hamacher method under sterile conditions and following the guidelines on current Good Radiopharmacy Practice (cGRPP) in the preparation of radiopharmaceuticals. FDG was tested for sterility, pyrogenicity, pH, radionuclidic identity and purity, radiochemical identity and purity, residual solvents and membrane filter integrity on each production run [24].

2.3. ^{18}F -fluorodeoxyglucose microPET Scan

The animals were individually anesthetized using a mixture of isoflurane and medical oxygen (3-4%) and 1 mCi of FDG was administered through the tail vein. Then, the animals were returned to the home cage for a 30-min period for conscious tracer uptake. This step was performed to insure best FDG uptake in freely moving rats and to avoid the problem of confounding anesthetic effects [21,25].

After the uptake period, the rats were placed in a head-first prone position and scanned with the TriumphTM MicroPET (LabPET-4, TriFoil Imaging, Northridge, CA, USA) under inhalatory isoflurane anesthesia (2-3%). Throughout these procedures, the animals were kept on a heated imaging platform. For radiotracer uptake readings, sixty-minute list mode static images were acquired with the field of view (FOV; 3.75 cm) centered on the rat's head [10,22].

2.4. Image acquisition and quantification

All data were reconstructed using a 3D ordered subsets expectation-maximization (3D-OSEM) algorithm with 20 iterations and no attenuation correction. Each reconstructed microPET image was spatially normalized to an 18F-FDG PET template already in MNI space in the Fusion Toolbox of PMOD v3.5 (PMOD Technologies, Zurich, Switzerland). Activity values were normalized for injected dose and animal body weight and therefore expressed in standard uptake values (SUVs) [10,22]. Mean SUVs for each region were extracted from a pre-defined volume of interests (VOIs) template.

The areas determined by the VOI template were: nucleus accumbens bilaterally, amygdala bilaterally, caudate-putamen bilaterally, auditory cortex bilaterally, cingulate cortex bilaterally, entorhinal cortex bilaterally, frontal association cortex bilaterally, insular cortex bilaterally, medial prefrontal cortex bilaterally, motor cortex bilaterally, orbitofrontal cortex bilaterally, parietal cortex bilaterally, retrosplenial cortex bilaterally, somatosensory cortex bilaterally, visual cortex bilaterally, antero-dorsal hippocampus bilaterally, posterior hippocampus bilaterally, hypothalamus bilaterally, olfactory nucleus bilaterally, superior colliculus bilaterally, inferior colliculus bilaterally, midbrain bilaterally, ventral tegmental area bilaterally, cerebellar grey matter bilaterally, cerebellar white matter bilaterally, thalamus bilaterally, periaqueductal grey, pons, septum, and medulla. A total of 56 regions analyzed.

2.5. Cytochrome c oxidase studies selection

The COX studies used for the comparison were the five most relevant studies according to the Web of Science database in response to the following keywords: “cytochrome c oxidase”; “rat brain”. From the results, the studies were only included if they fell within the inclusion criteria: 1- English language; 2- rat model; 3- male; 4- adult; 5- presence of control group; 6- absolute or approximate values given; 7- five or more brain regions given. Also, the results had to fall out the exclusion criteria: 1- Non-English language; 2- non-rat; 3- female or mixed; 4- pup, juvenile or old; 5- presence of invasive procedure or sham surgery (example: electrode implantation, etc.); 6- relative value (example: in percentage, etc.); 7- under five brain regions or too specific delimitation (example: region CA1, CA2, CA3 of the hippocampus).

A brief description of the selected studies can be found in table 1.

2.6. Statistical Analysis

To evaluate differences between right and left laterality, student's paired t-test was employed. To compare our study to the data obtained from the COX studies, the regions were ranked according to the given values and a non-parametric spearman test was used to individually compare the COX studies to our FDG results. When $P \leq 0.05$ it was considered statistically significant. All statistical analyses were performed using the SPSS 16.0 software.

3. RESULTS

The figures show consecutive images in coronal (Figure 1), sagittal (Figure 2) and transversal (Figure 3) planes used for the qualitative analysis using the color scale adopted by the National Institute of Health – USA (NIH). In the qualitative analysis of the images, we can observe higher intensity in the regions corresponding to the cerebral cortex, particularly in most rostral portion (Figures 1, 2, 3 – black arrows). The regions corresponding to the corona radiata and ventricles show less intensity (Figures 1, 2, 3 – white arrows). Also, the regions regarded as the basal ganglia, midbrain, and cerebellum show a homogeneous intensity (Figure 1, 2, 3 – gray arrows).

All the results from the FDG-microPET assessment and the comparison to the COX histochemical data are presented in Table 2 (Forebrain), Table 3 (Limbic system), Table 4 (Midbrain), and Table 5 (Hindbrain). In the tables there are the mean SUV and the standard deviation for each area bilaterally, the average SUV for the region, the position within a ranking from most to least uptake, and the findings concerning the COX for each of the five selected studies.

The laterality analysis showed no statistical difference. The spearman's correlations exhibited a significant agreement between of our study to Shumake et al.'s [12] ($r = 0.565$; $P = 0.023$).

4. DISCUSSION

In order to map the FDG uptake in the rat brain, we provided a detailed description of the reconstructed images acquired from the FDG-microPET assessment. We perform a detailed qualitative analysis of our results, it is relevant, since visual description and evaluation of data is paramount before quantification, it provides an overall evaluation of the quality of the technical procedure [17].

When comparing right and left sides of the regions no difference was found. Laterality is well documented in neuroscientific literature, especially in PET studies [8,9,10,26]; however, it is important to consider that the procedure is carried out with an anesthetized animal, and this difference could be more prominent in awoken animals.

By comparing our FDG-microPET analysis to COX biochemical and histochemical studies, it is possible to observe a significant correlation only to the data obtain from the study of Shumake et al. [12] (Table 6). The disagreement of our results to the other four COX studies could be explain by different reasons, for example, (1) the COX studies were performed is different rat strains, also (2) the COX biochemical and histochemical studies represent a potential brain metabolism, but they are an *ex vivo* assays, while FDG-microPET is a more realistic *in vivo* assessment. Furthermore (3) two studies COX perform a semi-quantitatively evaluation using densitometry, however, it is not a so precise approach to evaluate biochemical activity [17].

A detailed explanation of the differences in FDG uptake found is not in the goal of this discussion. However, some interesting points should be mentioned. In adult, male Wistar rat FDG has higher affinity for the gray matter [20] thus, (1) the regions comprising the cortices should be clearly observable and, as we detected, the frontal cortex should present a higher uptake. In the same sense, (2) the uptake should be less intense in regions which are mostly of white matter, such as the corona radiata and corpus callosum, and inside the ventricles. Also, another important aspect is (3) the homogenous uptake in the portions of the basal ganglia, midbrain, and cerebellum. Comparing our results to COX studies it is possible to observe that similarly to FDG, COX also has a distinct predilection for gray matter [2,10], it is one more reason to reinstate that studies comparing FDG with COX or other metabolic markers are necessary.

¹⁸F-fluorodeoxyglucose is the most used metabolic tracer for *in vivo* microPET studies and it is of crucial importance to map out its distribution in the Wistar brain and compare to other classical techniques which map metabolic activity, such as COX. To the best of our knowledge,

this is the first study to quantitatively map the distribution of FDG in the Wistar rat brain and comparing it with relevant studies in the COX literature. We trust that it will aid and enrich future neuroscience studies.

ACKNOWLEDGEMENT

The authors would like to thank the Brazilian funding agencies CNPq, CAPES, and FAPERGS for their support of this research. Dr. Léder Xavier and Dr. Jaderson Costa DaCosta are CNPq researchers. The authors declare they have no conflict of interest.

5. REFERENCES

- [1] PAXINOS, G.; WATSON, C. **The rat brain in stereotaxic coordinates**. 7. ed. San Diego: Elsevier, 2014.
- [2] HARLEY, C. A.; BIELAJEW, C. H. A comparison of glycogen phosphorylase a and cytochrome oxidase histochemical staining in rat brain. **The Journal of Comparative Neurology**, v. 322, p. 377-389, 1992.
- [3] HEVNER, R. F.; LIU, S.; WONG-RILEY, M. T. T. A metabolic map of cytochrome oxidase in the rat brain: histochemical, densitometric and biochemical studies. **Neuroscience**, v. 65, n. 2, p. 313-342, 1995.
- [4] PARTATA, W. A. et al. Distribution of glycogen phosphorylase and cytochrome oxidase in the central nervous system of the turtle *Trachemys dorbigni*. **Comparative Biochemistry and Physiology Part A**, v. 124, p. 112-122, 1999.
- [5] PADILLA, E. et al. Mesolimbic effects of the antidepressant fluoxetine in Holtzman rat, a genetic strain with increased vulnerability to stress. **Brain Research**, v. 1387, p. 71-84, 2011.
- [6] JANG, D.-P. et al. Effects of fluoxetine on the rat brain in the forced swimming test: a [¹⁸F]-FDG micro-PET imaging study. **Neuroscience Letters**, v. 451, p. 60-64, 2009.
- [7] WIENHARD, K. Measurement of glucose consumption using [¹⁸F]fluorodeoxyglucose. **Methods**, v. 27, p. 218-225, 2002.
- [8] HU, H. et al. Behavioral and [¹⁸F]-fluorodeoxyglucose micro positron emission tomography imaging study in a rat chronic mild stress model of depression. **Neuroscience**, v. 169, p. 171-181, 2010.

- [9] LIN, Z. et al. Effects of curcumin on glucose metabolism in the brains of rats subjected to chronic unpredictable stress: a 18F-FDG micro-PET study. **BCM Complementary & Alternative Medicine**, v. 13, p. 202, 2013.
- [10] MIRRIONE, M. M. et al. Increased metabolic activity in the septum and habenula during stress is linked to subsequent expression of learned helplessness behavior. **Frontiers in Human Neuroscience**, v. 8, p. 1-8, 2014.
- [11] WONG-RILEY, M. T. T. Cytochrome oxidase: an endogenous metabolic marker for neuronal activity. **Trends in Neurosciences**, v. 12, n. 3, p. 94-101, 1989.
- [12] SHUMAKE, J. et al. Metabolic mapping of the effects of the antidepressant fluoxetine in the brains of congenitally helpless rats. **Brain Research**, v. 1343, p. 218-225, 2010.
- [13] VILLARREAL, J. S. et al. Water maze training in aged rats: effects on brain metabolic capacity and behavior. **Brain Research**, v. 939, p. 43-51, 2002.
- [14] HORTON, J.; HUBEL, D. Regular patchy distribution of cytochrome oxidase staining in primary visual-cortex of macaque monkey. **Nature**, v. 292, n. 5825, p. 762-764, 1981.
- [15] HUBEL, D.; WIESEL, T. Receptive fields, binocular interaction and functional architecture in cats visual cortex. **Journal of Physiology - London**, v. 160, n. 1, p. 106-154.2, 1962.
- [16] HUBEL, D. H. et al. Binocular stereoscopy in visual areas V-2, V-3, and V-3A of the macaque monkey. **Cerebral Cortex**, v. 25, n. 5, p. 959-971, 2015.
- [17] XAVIER, L. L. et al. A simple and fast densitometric method for the analysis of tyrosine hydroxylase immunoreactivity in the substantia nigra pars compacta and in the ventral tegmental area. **Brain Research Protocols**, v. 16, p. 58-64, 2005.
- [18] WANG, C.-J. et al. Survivin expression quantified by image pro-plus compared with visual assessment. **Applied Immunohistochemistry and Molecular Morphology**, v. 17, p. 530-535, 2009.
- [19] LI, J. et al. Quantitative evaluation of microscopic injury with diffusion tensor imaging in a rat model of diffuse axonal injury. **European Journal of Neuroscience**, v. 33, p. 933-945, 2011.
- [20] SOUTHWORTH, R. et al. Tissue-specific differences in 2-fluoro-2-deoxyglucose metabolism beyond-6-P: a 19F NMR spectroscopy study in the rat. **NMR in Biomedicine**, v. 16, p. 494-502, 2003.
- [21] LANCELOT, S.; ZIMMER, L. Small-animal positron emission tomography as a tool for neuropharmacology. **Trends in Pharmacological Sciences**, v. 31, p. 411-417, 2010.
- [22] BAPTISTA, P. P. A. et al. Antidepressant Effects of Ketamine are not Related to 18F-FDG Metabolism or Tyrosine Hydroxylase Immunoreactivity in the Ventral Tegmental Area of

Wistar Rats. **Neurochemical Research**, v. 1592, 2015.

- [23] DELEYE, S. et al. Towards a reproducible protocol for repetitive and semi-quantitative rat brain imaging with 18F-FDG: exemplified in a memantine pharmacological challenge. **NeuroImage**, v. 96, p. 276-287, 2014.
- [24] HAMACHER, K.; COENEN, H. H.; STOCKLIN, G. Efficient stereospecific synthesis of no-carrier-added 2-[18F]-fluoro-2-deoxy-D-glucose using aminopolyether supported nucleophilic substitution. **Journal of Nuclear Medicine**, v. 27, p. 235-238, 1986.
- [25] FUEGER, B. J. et al. Impact of animal handling on the results of 18F-FDG PET studies in mice. **Journal of Nuclear Medicine**, v. 47, p. 999-1006, 2006.
- [26] YOSHIZAWA, H. et al. Characterizing the normative profile of 18F-FDG PET brain imaging: sex difference, aging effect, and cognitive reserve. **Psychiatry Research: Neuroimaging**, v. 221, p. 78-85, 2014.
- [27] PRINCE, J. A.; YASSIN, M. S.; ORELAND, L. Normalization of cytochrome-c oxidase activity in the rat brain by neuroleptics after chronic treatment with PCP or methamphetamine. **Neuropharmacology**, v. 36, n. 11/12, p. 1665-1678, 1997.

Figure 1 – Reconstructed images from the FDG-microPET on coronal plane. Black arrows point to areas of cortical FDG uptake, white arrows point to regions corresponding to the corona radiata and ventricles, and the gray arrows point to the midbrain. At the base there is a compass to aid the spatial orientation of the images.

Figure 2 – Reconstructed images from the FDG-microPET on sagittal plane. Black arrows point to areas of cortical FDG uptake, white arrows point to regions corresponding to the corona radiata and ventricles, and the gray arrows point to the midbrain. At the base there is a compass to aid the spatial orientation of the images.

Figure 3 – Reconstructed images from the FDG-microPET on transverse plane. Black arrows point to areas of cortical FDG uptake, white arrows point to regions corresponding to the corona radiata and ventricles, and the gray arrows point to the midbrain. At the base there is a compass to aid the spatial orientation of the images.

Table 1 – A description of the selected COX studies.

Table 2 – A detailed description of the data from our study and from the COX studies selected for the regions of the forebrain. A = values acquired by averaging two or more areas which correspond to the brain regions delimited by the microPET software, SUV = standard uptake value, SD = standard deviation.

Table 3 – A detailed description of the data from our study and from the COX studies selected for the regions of the limbic system. A = values acquired by averaging two or more areas which correspond to the brain regions delimited by the microPET software, SUV = standard uptake value, SD = standard deviation.

Table 4 – A detailed description of the data from our study and from the COX studies selected for the regions of the midbrain. A = values acquired by averaging two or more areas which correspond to the brain regions delimited by the microPET software, SUV = standard uptake value, SD = standard deviation.

Table 5 – A detailed description of the data from our study and from the COX studies selected for the regions of the hindbrain. A = values acquired by averaging two or more areas which correspond to the brain regions delimited by the microPET software, SUV = standard uptake value, SD = standard deviation.

Table 6 – A description of the Spearman's correlations for FDG and COX rankings. * = $P \leq 0.05$.

Table 1 – COX studies.

First author	Year	Rat strain	Quantification unit	Values presentation	Reference
Prince JA	1997	Sprague-Dawley	Gray-scale Value	Approximate	[27]
Shumake J	2010	Sprague-Dawley	micromole/minute/ gram wet tissue	Absolute	[12]
Padilla E	2011	Holtzman	micromole/minute/ gram wet tissue	Absolute	[5]
Hevner RF	1995	Sprague-Dawley	Optical density	Approximate	[3]
Villarreal JS	2002	Fischer 344	micromole/minute/ gram tissue weight	Absolute	[13]

Obs.: Absolute – the values were obtained from the text of the manuscript; Approximate – the values were estimated from the graphs of the manuscript.

Table 2 – Forebrain

Brain Regions	Side		Present Study			Prince et al.		Shumake et al.		Padilla et al.		Hevner et al.		Villarreal et al.		
	SUV	SD	Mean SUV	Rank	Value	Rank	Value	Rank	Value	Rank	Value	Rank	Value	Rank	Value	Rank
Auditory Cortex	L	4.432	0.537		-		-		-		-		-		-	
	R	4.154	0.458	4.293	21											
Cingulate Cortex	L	5.006	0.669	5.058	12	-	286.60 ^A	3	258.65 ^A	3	-	-	282.00	2		
	R	5.111	0.587													
Entorhinal Cortex	L	4.343	0.564	4.301	20	-	-		-		-		192.00	8		
	R	4.259	0.530													
Frontal Association Cortex	L	3.432	0.396	3.430	29	113.50 ^A	9	237.60 ^A	11	241.25 ^A	7	-	232.50 ^A	7		
	R	3.429	0.386													
Insular Cortex	L	4.903	0.478	4.818	15	-	-	-	220.95 ^A	11	-	-	-			
	R	4.732	0.407													
Medial Prefrontal Cortex	L	6.157	0.584	6.120	1	-	260 ^A	7	239.70 ^A	8	-	-	-			
	R	6.083	0.629													
Motor Cortex	L	3.711	0.529	3.725	26	-	-		-		-		-			
	R	3.740	0.475													
Orbitofrontal Cortex	L	5.273	0.568	5.256	9	-	-	-	241.77 ^A	6	-	-	-			
	R	5.240	0.613													
Parietal Cortex	L	3.826	0.608	3.683	27	-	-		-		-		274.50 ^A	4		
	R	3.540	0.696													
Retrosplenial Cortex	L	3.769	0.468	3.731	25	111 ^A	10	-	309.00	1	-	-	-			
	R	3.693	0.438													
Somatosensory Cortex	L	4.263	0.466	4.161	24	-	-		-		-		-			
	R	4.060	0.452													
Visual Cortex	L	3.515	0.542	3.384	30	121 ^A	5	-	-		0.060	1	-			
	R	3.253	0.617													

Table 3 – Limbic System

Brain Regions	Side		Present Study			Prince et al.		Shumake et al.		Padilla et al.		Hevner et al.		Villarreal et al.		
	SUV	SD	Mean SUV	Rank	Value	Rank	Value	Rank	Value	Rank	Value	Rank	Value	Rank	Value	Rank
Nucleus Accumbens	L	5.414	0.611													
	R	5.486	0.597	5.450	4	117.00	6	273.00	4	234.40 ^A	9	-	-	-	-	-
Amygdala	L	4.123	0.554	4.183	23	-	-	232.50 ^A	14	254.26 ^A	4	-	-	235.50 ^A	5	
	R	4.243	0.612													
Caudate-Putamen	L	5.594	0.561	5.623	2	133.00	1	334.80	2	-	-	0.060	1	284.00	1	
	R	5.651	0.626													
Hippocampus Antero-Dorsal	L	5.343	0.613	5.365	7	-	-	204.60 ^A	15							
	R	5.387	0.583							247.35 ^A	5	0.040	2	233 ^A	6	
Hippocampus Posterior	L	4.880	0.548	4.901	14	108.33 ^A	12	235.20 ^A	13							
	R	4.923	0.545													
Hypothalamus	L	4.434	0.457	4.462	18	-	-	243.50 ^A	10	-	-	-	-	-	-	-
	R	4.491	0.455													
Olfactory Nucleus	L	5.044	0.623	5.059	11	-	-	-	-	-	-	0.040	2	-	-	-
	R	5.074	0.635													
Septum	-	5.057	0.414	5.057	13	123.00	4	265.60 ^A	6	221.05 ^A	10					
Thalamus	L	5.379	0.477	5.402	6	111.25 ^A	11	267.05 ^A	5	-	-	0.035	3	-	-	-
	R	5.425	0.510													

Table 4 - Midbrain

Brain Regions	Side	Present Study			Prince et al.		Shumake et al.		Padilla et al.		Hevner et al.		Villarreal et al.	
		SUV	SD	Mean SUV	Value	Rank	Value	Rank	Value	Rank	Value	Rank	Value	Rank
Midbrain	L	5.168	0.423											
	R	5.208	0.516	5.188	-	10	256.80 ^A	8	-	-	-	-	-	-
Inferior Colliculus	L	5.367	0.326	5.429	116.00	5	345.10	1	-	0.040	2	-	-	
	R	5.492	0.436											
Superior Colliculus	L	5.403	0.520	5.517	124.00	3	252.20 ^A	9	-	0.060	1	-	-	
	R	5.632	0.509											
Ventral Tegmental Area	L	4.551	0.443	4.546	98.00	13	148.20	16	181.30	-	-	-	-	
	R	4.541	0.491											
Periaqueductal Gray	-	5.297	0.451	5.297	-	8	235.90	12	267.90	-	-	-	-	

Table 5 - Hindbrain

Brain Regions	Side	Present Study		Prince et al.		Shumake et al.		Padilla et al.		Hevner et al.		Villarreal et al.		
		SUV	SD	Mean SUV	Rank	Value	Rank	Value	Rank	Value	Rank	Value	Rank	
Cerebellar Grey Matter	L	3.667	0.271	3.604	28	123.00	3	-	-	-	0.025	4	280.66 ^A	3
	R	3.541	0.294											
Cerebellar White Matter	L	4.624	0.302	4.568	16	-	-	-	-	-	-	-	51.00	9
	R	4.511	0.310											
Pons	-	4.278	0.445	4.278	22	114.00	8	-	-	-	-	-	-	-
Medulla	-	4.462	0.491	4.462	19	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Table 6 – FDG vs. COX ranking correlation Results.

Spearman's Correlation Coefficient	Prince et al.	Shumake et al.	Padilla et al.	Hevner et al.	Villarreal et al.
<i>r</i> Value	0.32	0.56*	-0.06	0.35	0.25
<i>P</i> Value	0.28	0.023	0.84	0.39	0.51

Figure 1

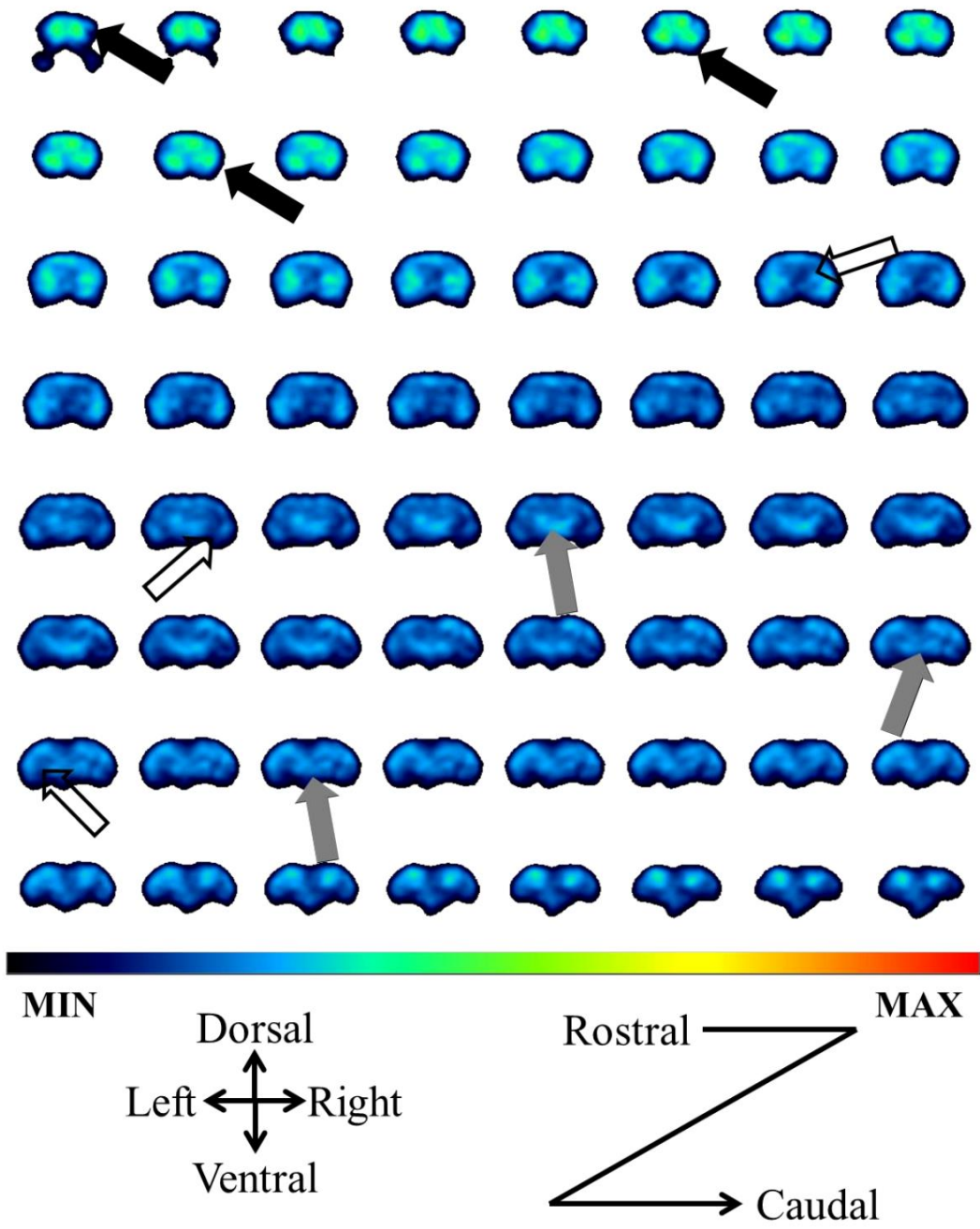


Figure 2

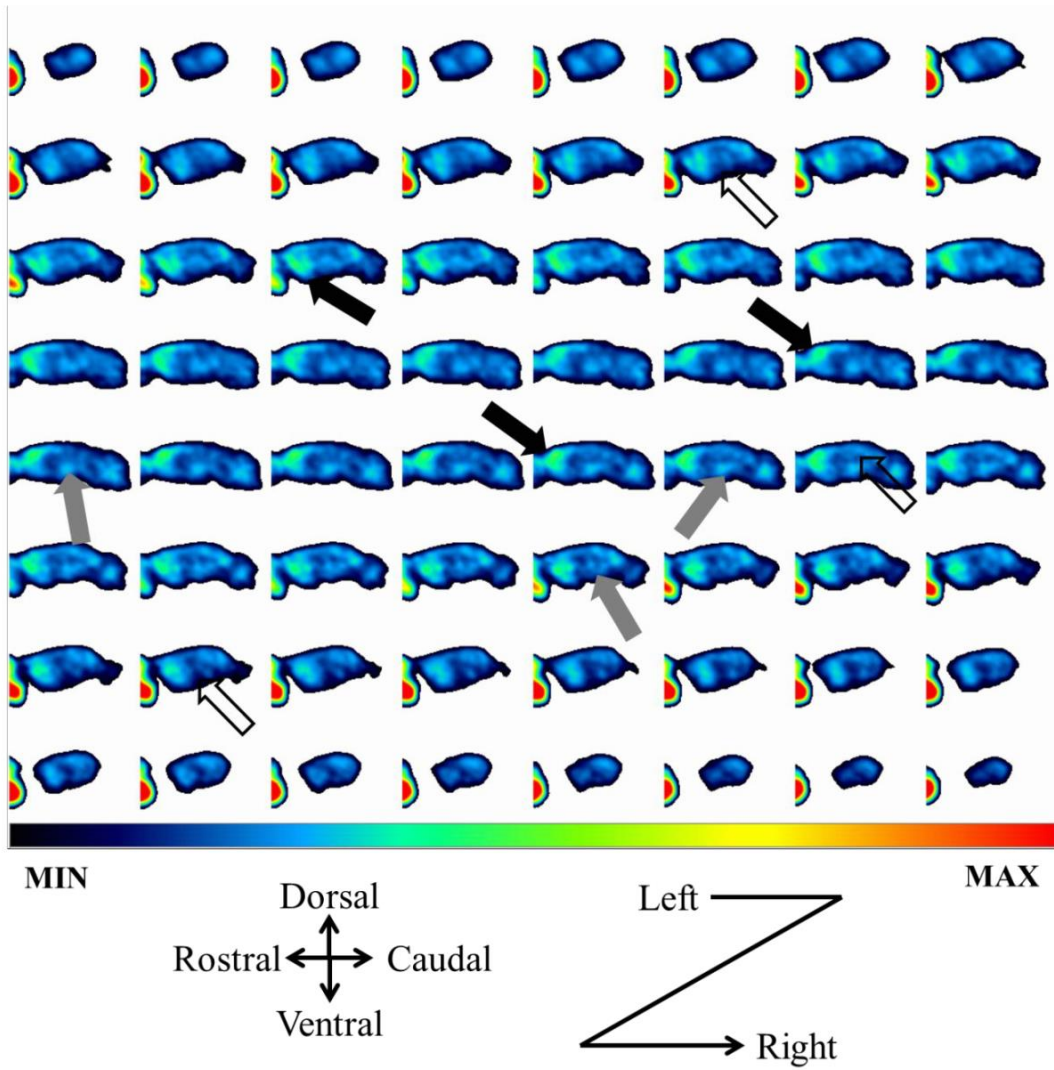
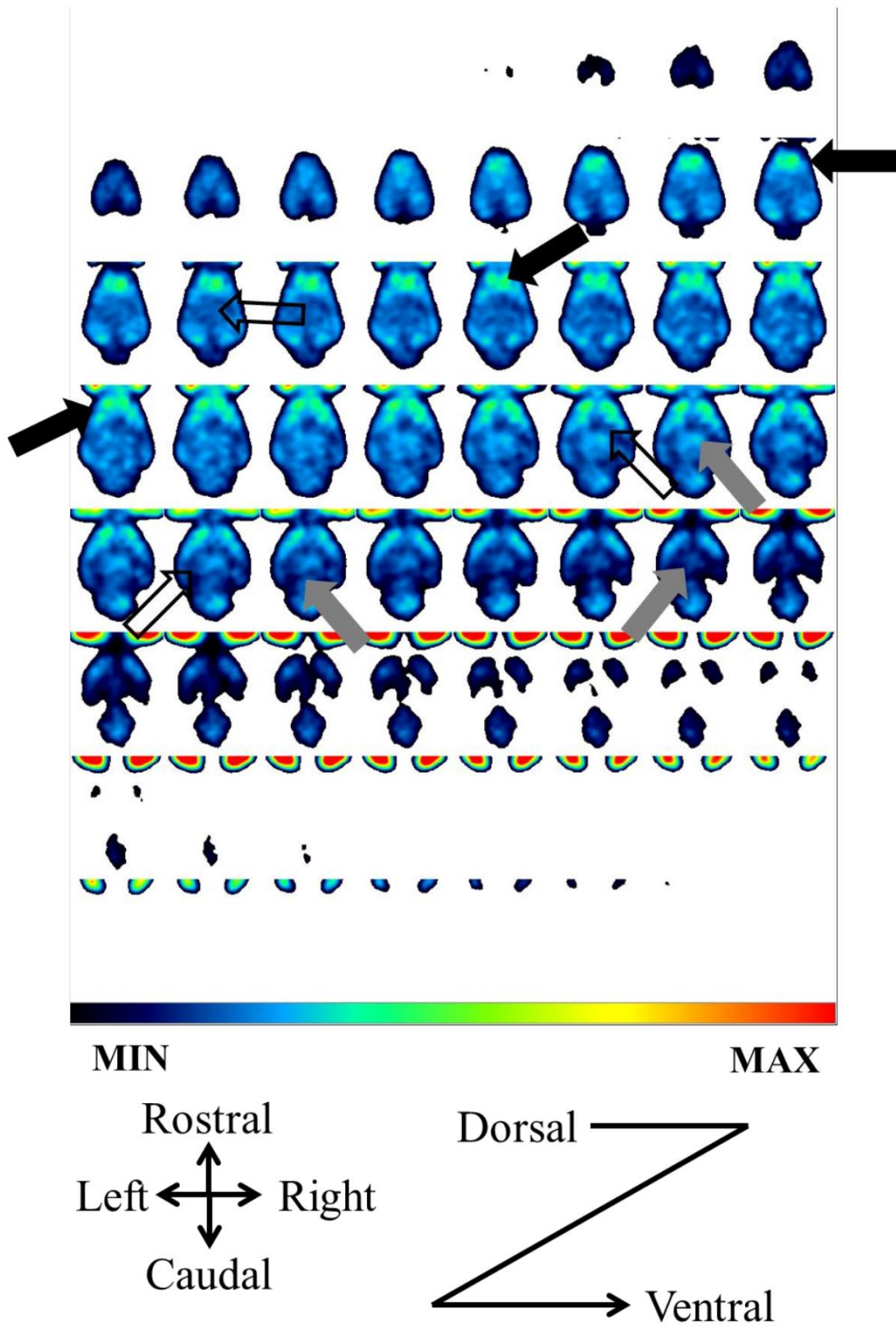


Figure 3



4.2 Artigo Científico II: *Antidepressant Effects of Ketamine are not related to ¹⁸F-FDG Metabolism or Tyrosine Hydroxylase Immunoreactivity in the Ventral Tegmental Area of Rats*

Publicado no periódico *Neurochemical Research*, 40: 1153-1164 (2015)

Antidepressant Effects of Ketamine Are Not Related to ^{18}F -FDG Metabolism or Tyrosine Hydroxylase Immunoreactivity in the Ventral Tegmental Area of Wistar Rats

Pedro Porto Alegre Baptista¹  · Lisiani Saur¹ · Pamela Bambrilla Bagatini¹ · Samuel Greggio² · Gianina Teribele Venturin² · Sabrina Pereira Vaz¹ · Kelly dos Reis Ferreira¹ · Juliana Silva Junqueira¹ · Diogo Rizzato Lara¹ · Jaderson Costa DaCosta² · Cristina Maria Moriguchi Jeckel² · Régis Gemerasca Mestriner¹ · Léder Leal Xavier^{1,2}

Received: 24 November 2014/Revised: 16 March 2015/Accepted: 6 April 2015/Published online: 17 April 2015
© Springer Science+Business Media New York 2015

Abstract Major depressive disorder (MDD) is an important health problem that is often associated to stress. One of the main brain regions related to MDD is the ventral tegmental area (VTA), a dopaminergic center, part of the reward and motivation circuitry. Recent studies show that changes to VTA dopaminergic neurons are associated with depression and treatment. Ketamine has recently shown a fast, potent antidepressant effect in acute, sub-anesthetic doses. Thus, our aims were to elucidate if ketamine would be able to revert depression-like behaviors induced by a chronic unpredictable stress (CUS) protocol and if it could cause alterations to metabolism and tyrosine hydroxylase (TH)-immunoreactivity in VTA. For this, 48 Wistar rats were divided into four groups: control + saline (CTRL + SAL), control + ketamine (CTRL + KET), CUS + saline (CUS + SAL), CUS + ketamine (CUS + KET). The CUS groups underwent 28 days of CUS protocol. Saline or ketamine (10 mg/kg) was administered intraperitoneally once on day 28. The behavior was assessed by the sucrose preference test, the open field test, and the forced swim test. Glucose brain metabolism was assessed and quantified with microPET. TH-immunoreactivity was assessed by estimating neuronal density and regional and cellular

optical densities. A decrease in sucrose intake in the CUS groups and an increase in immobility was rapidly reverted by ketamine ($p < 0.05$). No difference was observed in the open field test. There was no alteration to VTA metabolism and TH-immunoreaction. These results suggest that the depressive-like behavior induced by CUS and the antidepressant effects of ketamine are unrelated to changes in neuronal metabolism or dopamine production in VTA.

Keywords Depression · Ketamine · MicroPET · Tyrosine hydroxylase · Ventral tegmental area

Introduction

Major depressive disorder (MDD) is a psychiatric illness affecting 300–350 million people worldwide that baffles doctors and researchers because of its complexity. Despite scientific efforts, the cause or origin of MDD remains unknown [17, 27, 64, 66]. As there is no apparent precise organic alteration, it is classified as a mood disorder characterized by chronic feelings of sadness, hopelessness, and self-worthlessness, often leading to suicidal thoughts and behaviors [3, 62]. In the attempt to understand the condition, researchers are currently investigating many brain regions, such as the prefrontal cortex, amygdala, and cingulate cortex. However, the core symptoms of MDD, anhedonia and lack of motivation, are typically associated with the reward and motivation circuitry, specifically, with an important dopaminergic center, the ventral tegmental area (VTA) [8, 48, 66].

The VTA, located in the ventral part of the mesencephalon, consists mainly of dopaminergic neurons (60–65 %) [48]. It is believed to be the initial region in the reward and motivation system and, interestingly enough, it

✉ Pedro Porto Alegre Baptista
pedropoa@gmail.com; pedro.baptista@acad.pucrs.br

¹ Laboratório de Biologia Celular e Tecidual e Laboratório de Neuroquímica e Psicofarmacologia, Departamento de Ciências Morfofisiológicas, Faculdade de Biociências, Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul (PUCRS), Avenida Ipiranga, 6681, Prédio 12, Sala 104, Porto Alegre, RS CEP 90619-900, Brazil

² Centro de Pesquisa Pré-Clínica e Centro de Produção de Radiofármacos, Instituto do Cérebro do Rio Grande do Sul – INSCER-PUCRS, Porto Alegre, Brazil

has projections to and from the same brain areas associated with MDD. The VTA can be divided in two distinct portions, lateral and medial. The neurons from the lateral portion (lVTA) project to the nucleus accumbens lateral shell, while the medial portion (mVTA) has dopaminergic neurons projecting to the nucleus accumbens medial shell, the nucleus accumbens core, the basolateral amygdala, and the medial prefrontal cortex [29]. A biochemical assessment of the dopaminergic system of preclinical models of MDD using the chronic unpredictable stress (CUS) protocol is well described [21]. As a whole, in the entire brain, dopamine level is decreased after CUS protocol [7, 15]. In the frontal cortex and hippocampus, several studies have found a similar dopaminergic decrease produced by chronic stress [2, 13, 51], while in other areas, such as the striatum and amygdala, the dopaminergic levels remain unaltered or are decreased [26, 51]. Experimental evidence and the complex connections between the VTA and different brain regions affected by depression confirm that VTA plays a central role in the pathophysiology of MDD [19, 20, 61, 67].

Traditional treatments for MDD rely predominantly on selective serotonin reuptake inhibitors (SSRI) and on other monoaminergic-based drugs which increase the availability of serotonin and/or noradrenaline in the synaptic cleft in the same brain regions that receive the output from the dopaminergic VTA pathways [12, 29, 46, 66]. However, with traditional antidepressants, the therapeutic effects are usually observed 2–4 weeks after the start of the treatment [41, 55]. This scenario has begun to change with rapid-acting antidepressants, such as the *N*-Methyl-D-Aspartate (NMDA) receptor antagonist ketamine [28, 31, 45]. Several clinical trials have shown a rapid and robust effect in mood and suicidality of treatment-refractory depressed patients, although the mechanism of action is not fully understood [6, 14, 42, 49, 73]. One of the most significant characteristics of antidepressant ketamine is the time window of the therapeutic effect. In preclinical trials using rodents, the behavioral antidepressant effect can be seen to persist from 20 min to 48 h, to 4, 6, 8 days, up to 2 weeks post-injection [9, 10, 35, 37]. However, the reliability of the effects after 1 week is still under discussion. The molecular alterations include a plethora of analyses of synaptic-related proteins, phosphorylation, neurotrophic factors, among others, which vary from 30 min to 72 h after ketamine administration [9, 10, 31, 70, 71]. The discovery of ketamine as a fast-acting antidepressant is one of the most important advances in modern psychopharmacology for treating MDD.

Despite the clear involvement of the VTA and the reward circuit in MDD, few studies have documented dopaminergic changes of VTA neurons in depression and

its treatments. Thus, the aim of this study was to evaluate the behavioral changes, glucose metabolism and immunoreactivity for tyrosine hydroxylase (TH) in the VTA of animals submitted to a depression-inducing protocol, CUS, treated or not with ketamine.

Experimental Procedures

Animals

In this study 48 male Wistar rats, 3 months of age, were acquired from the Centro de Reprodução e Experimentação de Animais de Laboratório (CREAL)—UFRGS. The animals were housed in a rat *vivarium*, three per cage, on a ventilated rack with controlled temperature and humidity. They were kept in a 12-h dark-light cycle, with food and water ad libitum. The animals were divided into four groups of twelve: 1—Control + Saline (CTRL + SAL); 2—Control + Ketamine (CTRL + KET); 3—CUS + Saline (CUS + SAL); and 4—CUS + Ketamine (CUS + KET). All procedures were in accordance with the guide for the care and use of laboratory animals adopted by the National Institute of Health (USA), and with the university's ethical committee, Comissão de Ética de Uso de Animais da Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul (CEUA 12/00297-PUCRS).

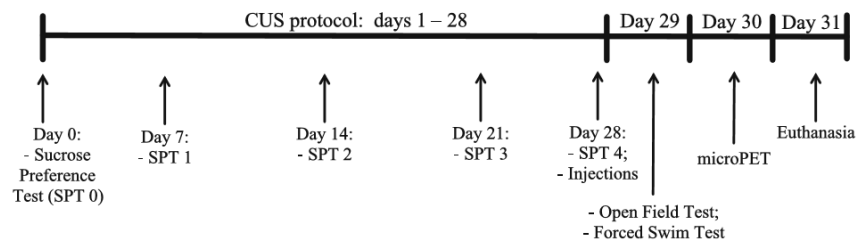
CUS Protocol

The animals were exposed to a sequence of variable, mild stressors for 28 days continually. This procedure has been demonstrated to induce depressive-like behavioral changes [21, 50, 53, 65]. A total of eight different stressors were employed, twice daily, one during the light cycle and one in the dark cycle throughout the 28 day time period. The stressors included tail pinching, 45° inclination of the housing cage, 24 h food deprivation, 24 h water deprivation, 12 h food and water deprivation, social isolation, crowding, and dark during light cycle. The control groups did not undergo the CUS protocol (Fig. 1—Timeline).

Drug Administration

On the 28th day of the experiment, after the last stressor, the animals received a single, intraperitoneal (i.p.) injection of 10 mg/kg of ketamine (Cristália, Brazil) or 0.5 ml of 0.9 % saline solution. The ketamine dose chosen was based on previous studies that have shown behavioral and biochemical alterations befitting an antidepressant effect [28, 31].

Fig. 1 Timeline depicting the experimental procedure. CUS chronic unpredictable stress, SPT sucrose preference test



Behavioral Analysis

Sucrose Preference Test (SPT)

To test for anhedonic behavior, two water bottles were placed in the housing cage, one with normal tap water and one with a 1 % sucrose solution. The bottles were left for 12 h overnight, then the consumption in milliliters of both bottles was measured and the percentage of sucrose solution from total intake was calculated. Prior to this test, there were no stressors that would directly affect liquid consumption. The first trial, SPT 0, was used as baseline for the animals, at this point none of the experimental procedures had been carried out, then the following trials were performed on day 7 (SPT 1), day 14 (SPT 2), day 21 (SPT 3), and on day 28 (SPT 4) after the drug injections [9].

Open Field Test (OF)

For the evaluation of overall locomotion, each animal was individually placed in a circular chamber, 30 cm radius \times 40 cm height, and its locomotion was recorded for 3 min, which is considered the “novelty” phase of the OF, when the depressed animal present locomotor alterations. The recordings were then run through the Anymaze software for analysis. Distanced traveled, distanced traveled by minute, average speed, time in center zone, and time in periphery zone were calculated for this study. This test was performed 12–15 h after the ketamine or saline injections [16, 24].

Forced Swim Test (FST)

The evaluation of “hopeless” behavior was conducted by individually placing each animal in a tank, 20 cm radius, with warm water. The tank was filled to the point where the animal was unable to reach the bottom or the border and was, therefore, forced to swim. The animal’s behavior was recorded for 3 min. The recordings were later analyzed and averaged for latency for first immobile episode, total

immobile time, and climbing by two trained researchers. This test was performed on the afternoon following (16–20 h later) the injections [11, 24, 57].

^{18}F -FDG MicroPET Scan

The rats ($n = 4$ for each experimental group) were transported to the preclinical imaging facility 12 h before the microPET scans. On day 30, the animals were individually anesthetized using a mixture of isoflurane and medical oxygen (3–4 % induction and 2–3 % maintenance dose) and 1 mCi of ^{18}F -FDG was administered through the tail vein. Then, the animals were returned to the home cage for a 30 min period of conscious tracer uptake. After the uptake period, the rat was placed in a head-first prone position and scanned with the TriumphTM microPET (LabPET-4, TriFoil Imaging, Northridge, CA, USA) under inhalatory anesthesia. Throughout these procedures, the animals were kept on a pad heated to 36 °C. For radiotracer readings, 60-min list mode static acquisitions were acquired with the field of view (FOV; 3.75 cm) centered on the rat’s head. All data were reconstructed using a 3D ordered subsets expectation-maximization (3D-OSEM) algorithm with 20 iterations and no attenuation correction. Each reconstructed microPET image was spatially normalized into an ^{18}F -FDG template using brain normalization in PMOD v3.5 and the Fusion Toolbox (PMOD Technologies, Zurich, Switzerland). An MRI rat brain VOI template was used to overlay the normalized images, previously coregistered to the microPET image database. The glucose metabolism in the VTA region was expressed as standard uptake values (SUVs) [58, 59, 68].

Euthanasia and Sample Extraction

The animals were deeply anaesthetized with sodium thiopental i.p. then perfused transcardially with 200 ml of 0.9 % saline solution followed by 200 ml of 4 % paraformaldehyde (PF) in PBS solution. The brains were dissected carefully from the animal’s skull then placed in a 4 % PF solution for post-fixation for 4 h. To cryoprotect

the tissue, after the post-fixation, the brains were placed in a 30 % sucrose solution and left until it sank (2–3 days). Once cryoprotected, the brains were flash frozen in isopentane cooled in liquid nitrogen, and then stored in $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ until immunohistochemistry.

TH Immunohistochemistry

Coronal sections (50 μm) from the VTA were obtained from each brain using a cryostat (Leica, Germany) at $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$, and one in every three sections was collected in PB saline (PBS), pH 7.4. The mesencephalic area that comprises the VTA was identified according to Paxinos and Watson's Atlas (1998), between the following coordinates: interaural 4.2 mm, bregma -4.8 mm, and interaural 1.96 mm, bregma -7.04 mm. The free-floating sections were post-fixed in 4 % PF for 15 min. To block endogenous peroxidase activity, the sections were pre-treated with 3 % hydrogen peroxide in PBS for 30 min at room temperature. Thereafter, the sections were washed with PBS and treated with 2 % bovine serum albumin (BSA) in PBS containing 0.4 % Triton X-100 (PBS-Tx) for 30 min, and incubated with monoclonal TH antibody produced in mice (Sigma), diluted 1:3000 in PBS-Tx for 48 h at $4\text{ }^{\circ}\text{C}$. Sections were then washed in PBS-Tx and incubated with anti-mouse IgG produced in goat (Sigma) diluted 1:500 in PBS-Tx for 2 h at room temperature. Sections were washed in PBS, and incubated with peroxidase anti-peroxidase (PAP) mouse (Sigma) diluted 1:500 in PBS for 1 h 30 min at room temperature.

The immunohistochemical reaction was revealed in a medium containing 0.06 % DAB dissolved in PBS for 10 min, and then 1 μL of 3 % hydrogen peroxide per mL of DAB was added to the DAB medium for another 10 min. The sections were rinsed in PBS, dehydrated in series of increasing ethanol concentrations (70, 90 and 100 %), cleared with xylene and covered with Entellan and coverslips.

TH+ Neuronal Density Estimation

The number of TH+ cells per mm^2 in the VTA was estimated using an Olympus BX 50 microscope coupled to an Opton camera and Image Pro-Plus software (Image Pro-Plus 6.1, Media Cybernetics, Silver Spring, USA).

For the analysis, five sections from each animal were analyzed. One digitalized image (4 \times) from each VTA section was acquired bilaterally. Altogether, ten images were analyzed per animal. Two virtual squares measuring $4219.1\text{ }\mu\text{m}^2$ were overlaid the images, one on the lateral portion and one on the medial portion of the VTA, these are the areas of interest (AOI) (Fig. 6d). The TH+ cells located inside the AOI or intersected by the lower and/or

left borders were counted, those cells outside or intersected by the upper and/or right borders were discarded.

This analysis revealed the densities of the lateral and medial portion of the VTA. For the full VTA, density values of the corresponding lateral and medial portions were averaged.

TH Immunoreactivity Optical Density Evaluation

The intensity of TH+ immunoreactivity was measured using semi-quantitative densitometric analysis [56, 69] with Image Pro-Plus software. The same images used for TH+ neuronal density estimation were used in the analysis of regional optical density (OD). The images were converted to an 8-bit gray scale (256 gray levels) and two AOIs ($4219.1\text{ }\mu\text{m}^2$) were overlaid on each image, one in the lateral and one in medial portion of the VTA. For full VTA, the OD the values of the corresponding lateral and medial portions were averaged.

For the analysis of cellular OD, four digitalized images (20 \times) were obtained from each section bilaterally. Altogether 20 images were analyzed from each animal. Of the four digitalized images, two were from the lateral portion and two from the medial portion of the VTA. The images were converted to gray scale and one AOI measuring $10.7\text{ }\mu\text{m}^2$ was placed over one TH+ cell soma in each image (Fig. 6h). The values for each lateral and medial portion were an average of the corresponding images. The OD value for the full VTA was obtained by averaging the corresponding lateral and medial values.

All lighting conditions and magnifications were kept constant during the process of capturing the images. Blood vessels and other artifacts were avoided and the background correction was performed according to a previously described formula [69].

Statistical Analysis

Data was assessed for normality using the Kolmogorov–Smirnov test and a parametric profile was observed. For the statistical analysis we used two-way repeated measures ANOVA with three independent factors: CUS (two levels), ketamine (two levels), and time (five levels) for the following dependent variables: 1—sucrose % intake, 2—total liquid intake, 3—sucrose intake, 4—distance traveled by minute (note: the time factor of this variable has three levels). Additionally, we used a two-way ANOVA with two independent factors (CUS and ketamine) with two levels each for the following dependent variables were: 1—distance traveled, 2—average speed, 3—time in center, 4—time in periphery, 5—latency to first immobile episode, 6—time immobile, 7—climbing, 8—glucose metabolism, 9—neuronal density, 10—regional OD, and 11—cellular

OD. Statistical difference was considered significant when $p < 0.05$. All data are expressed as mean \pm SEM. The statistical analysis was conducted using SPSS Statistics 17.0 software.

Results

Behavior

Sucrose Preference Test (SPT)

Figure 2a shows the relative intake per week, considering the CUS protocol was initiated at week 0 (SPT 0) and ketamine and saline treatment were performed at week 4 (SPT 4). All four groups have roughly the same average, 90–96 % of relative sucrose intake, with no alterations to the total liquid intake (Fig. 2b). In SPT 2 both groups that underwent the CUS protocol decreased their intake (CUS + SAL: 83.57 %, $p < 0.01$; CUS + KET: 77.40 %, $p < 0.01$), and the CTRL groups plateaued between 98 and 100 %. In SPT 3 the results maintain the same pattern (CUS + SAL: 87.48 %, $p < 0.01$; CUS + KET: 79.09 %, $p < 0.01$). In SPT 4, after the injection of ketamine, the CUS + KET group restored the relative intake to normal levels, 90.90 %, and the CUS + SAL group showed a further decrease in relative sucrose intake (76.22 %, $p < 0.001$). Furthermore, in Fig. 2c we observe that the CUS-groups have a lower sucrose intake in SPT 2

(CUS + SAL: 0.51 g/kg, $p < 0.05$; CUS + KET: 0.33 g/kg, $p < 0.05$) when compared to SPT 0 and both CTRL-groups. In SPT 3 the CUS-groups have a lower sucrose intake (CUS + SAL: 1.09 g/kg, $p < 0.05$; CUS + KET: 1.03 g/kg, $p < 0.05$) when compared to the CTRL-groups, and the CTRL groups present a larger sucrose intake (CTRL + SAL: 1.77 g/kg, $p < 0.05$; CTRL + KET: 1.87 g/kg, $p < 0.05$) when compared to SPT 0. Finally, after ketamine injection, in SPT 4, there is a general decrease in sucrose intake in all groups (CTRL + SAL: 0.63 g/kg, $p < 0.05$; CTRL + KET: 0.77 g/kg, $p < 0.05$; CUS + SAL: 0.40 g/kg, $p < 0.05$; CUS + KET: 0.36 g/kg, $p < 0.05$). This data suggests that, after 2 weeks of CUS, the animals developed anhedonia and ketamine was able to rapidly reverse this behavior.

Open Field Test (OF)

In the open field test there was no statistical difference between the groups in any of the analyzed locomotor parameters (Fig. 3). The lack of difference in the time in the center and time in the periphery indicates that the animals that underwent the CUS protocol did not exhibit anxiety, which would have been seen if the animals had increased the time in periphery (Fig. 3c, d). Also, the animals which received ketamine showed no signs of sedation by the drug, as there was no alteration to the distance traveled and average speed (Fig. 3a, c) [38, 47]. No statistical difference was observed in the distance traveled by minute (Fig. 3b).

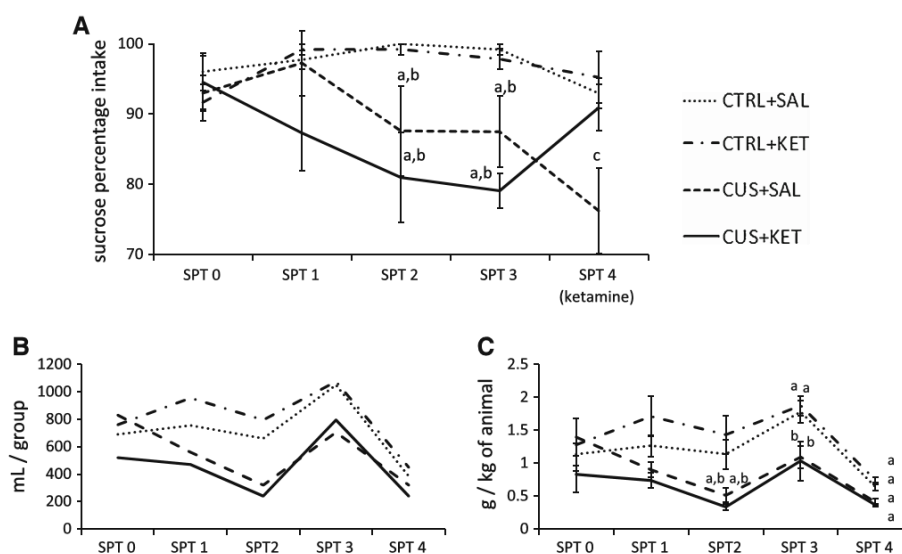


Fig. 2 Sucrose preference test Effect of CUS and ketamine on the consumption of sucrose solution in percentage throughout the experimental procedure. **a** Sucrose preference test, **b** total liquid intake, and **c** sucrose intake. ^a $p < 0.05$ when compared to SPT 0 time

period in the same group; ^b $p < 0.05$ when compared to the CTRL + SAL and CTRL + KET groups in the same time period; and ^c $p < 0.05$ when compared to all other groups in the same time period

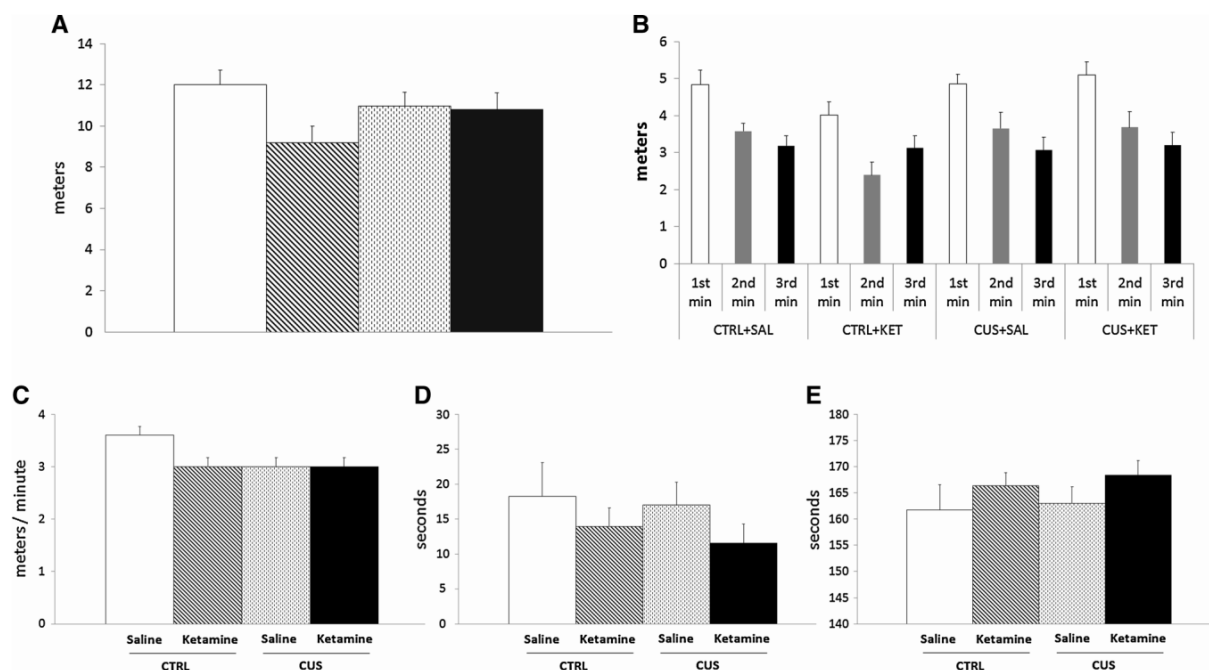


Fig. 3 Open field test Effect of CUS and ketamine on the open field test. **a** Distance traveled, **b** Distance traveled by minute, **c** average Speed, **d** time in center, and **e** time in periphery

Forced Swim Test (FST)

In the latency to first immobile episode (Fig. 4a), the CUS protocol was able to decrease the latency until the first immobile episode and that decrease was not reverted by ketamine (CTRL + SAL: 67.58 s; CTRL + KET: 70.41 s; CUS + SAL: 41.66 s, $p < 0.001$; CUS + KET: 43.25 s, $p < 0.001$). When examining the total time immobile (Fig. 4b), the CUS + SAL group increased the amount of time immobile ($p < 0.05$) and that increase was promptly reverted by ketamine (CTRL + SAL: 36.74 s; CTRL + KET: 33.18 s; CUS + SAL: 60.17 s; CUS + KET: 38.99 s). In the assessment of climbing behavior (Fig. 4c) we see that the climbing time diminished in the CUS groups (CTRL + SAL: 60.5 s; CTRL + KET: 62.25 s; CUS + SAL: 37.41 s, $p < 0.001$; CUS + KET: 46 s, $p < 0.001$). This indicates that the CUS protocol evoked hopelessness in the animal models and that ketamine was partially able to rapidly reverse it (under 20 h).

MicroPET

In order to study changes in brain glucose metabolism induced by CUS, as well as the effect of ketamine on rats that underwent the CUS protocol, the animals were injected

with ^{18}F -FDG and scanned using a microPET system. The mean ^{18}F -FDG SUVs for the VTA region in each group were calculated and compared. No statistically significant differences in ^{18}F -FDG SUVs were observed between the groups for the VTA region (Fig. 5a).

TH Immunohistochemistry

In the qualitative analysis of TH immunohistochemistry, the neuronal somata presented a round to fusiform shape and the nucleus appeared as a clear, oval shaped form that occupies most of the somata space. In this parameter, no evident difference could be observed between the groups.

In order to confirm the qualitative analysis, quantitative (estimation of neuronal density) and semi-quantitative evaluations (regional and cellular optical density—OD) were employed. There was no statistical difference between the groups in neuronal density, regional OD, and cellular OD in the medial, lateral, or full VTA (Fig. 6a–c). This suggests that CUS failed to disrupt the normal immunohistochemical profile of TH in the VTA, and likewise, the basis of ketamine's antidepressant effect is probably unrelated to changes in dopaminergic systems of VTA.

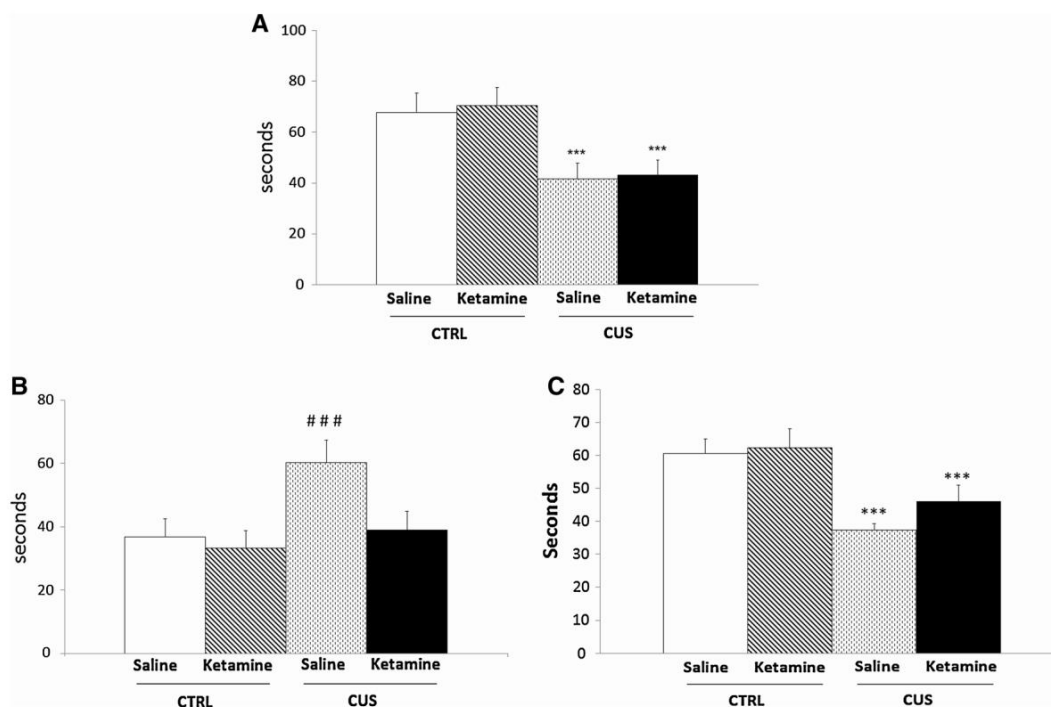
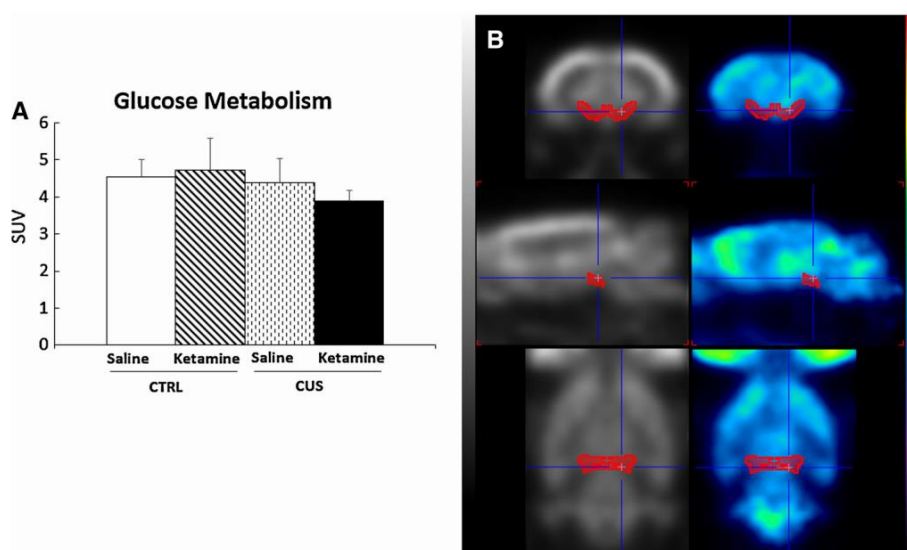


Fig. 4 Forced swim test Effect of CUS and ketamine on the forced swim test. **a** Latency until the first immobile episode, **b** total time immobile, **c** Climbing. ^{***} $p < 0.001$ when compared to CTRL + SAL and CTRL + KET groups; ^{###} $p < 0.001$ when compared to all other groups

Fig. 5 MicroPET. Effects of CUS and ketamine on glucose metabolism for the VTA region. **a** ¹⁸F-FDG uptake in the VTA region and **b** ¹⁸F-FDG rat template in coronal (*top-left*), sagittal (*mid-left*), and transverse (*bottom-left*) views and sample individual scan normalized into a template in coronal (*top-right*), sagittal (*mid-right*), and transverse (*bottom-right*) views. The VTA, in red, was defined using a rat-ROI-template based on Paxinos coordinates in the PMOD software (Color figure online)



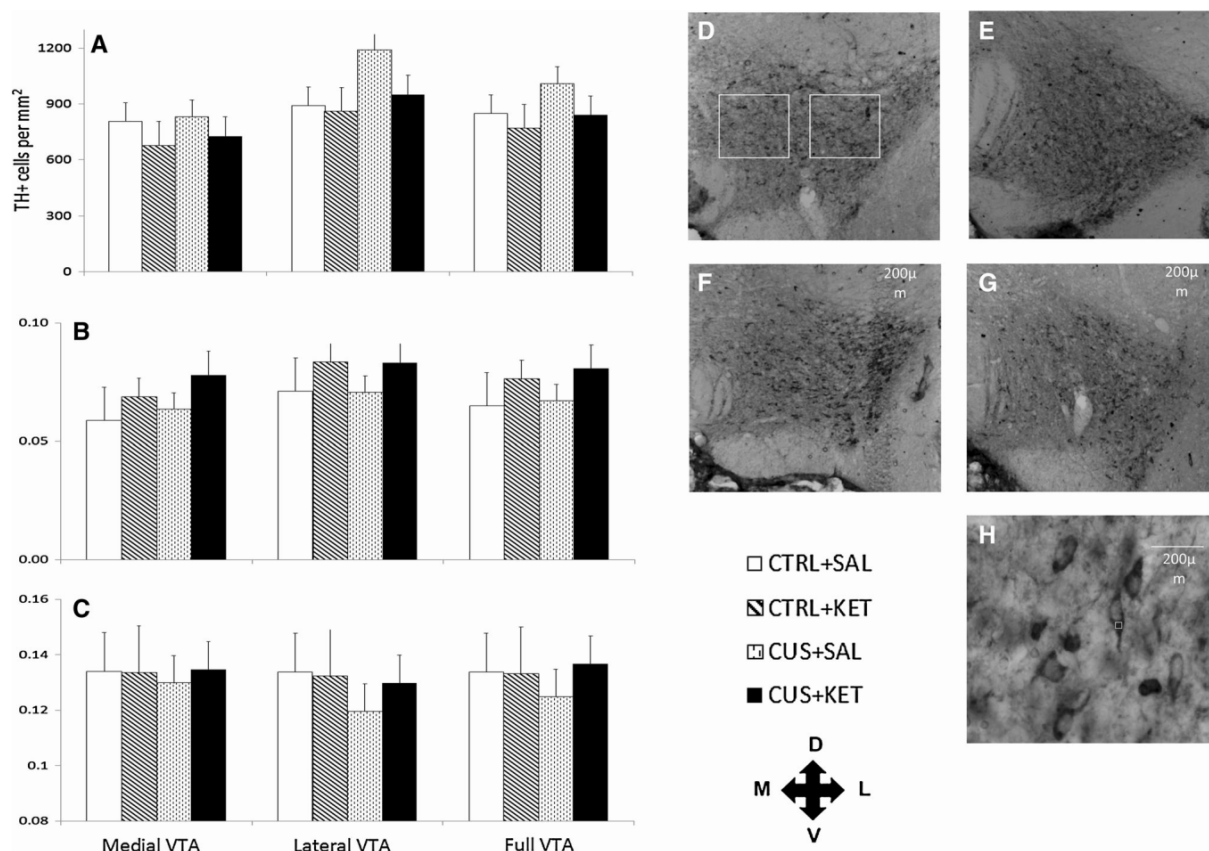


Fig. 6 TH Immunohistochemistry. Effect of CUS and ketamine on TH immunohistochemistry. **a** Neuronal density, **b** regional OD and **c** cellular OD. Digitalized images of the VTA in 4 \times , **d** CTRL + SAL

group, **e** CTRL + KET group, **f** CUS + SAL group, and **g** CUS + KET group; and **h** in 20 \times , the **square** represents the AOI for cellular OD

Discussion

Some technical considerations should be mentioned in our study. The first is related to the light period used in our study. Recent research has shown that the light cycle can influence the outcome of depressive-like behavior. During the dark period, CUS-depressed male rats are more prone to increase their locomotion in the OF and show no depressed behavior; while during the light period, the depressed behavior is observed and there are no alterations to locomotion during the OF [24]. For this reason our research was conducted during the light period.

The second is related to the stress/depression protocol used in our study. We used a well-established experimental model to induce depression, the CUS protocol [21, 50, 65]. However, despite being widely accepted, the CUS protocol suffers from variability regarding the length of exposure to stress. From our results with the repetitive SPT, we observed that anhedonia initiated after 14 days (Fig. 2).

Corroborating with our result, a previous study tested several exposure times for depression onset and found it only occurred with a protocol of at least 15 days [5]. Also, two studies that performed repetitive SPT found depression-related alterations within 10 days of the CUS protocol, however, the SPT protocols in these experiments were different from the one we used [34, 63]. The evidence suggests that the onset of depression in a CUS animal model only occurs after at least 2 weeks of chronic stress.

The rapid antidepressant effect of the single dose of ketamine was clearly seen in our behavioral tests. In the SPT the intake of the sweet palatable solution returned to baseline levels during the same night in which ketamine was administered in the CUS + KET group (Fig. 2a–c), which is consistent with findings from other researchers [31, 32, 65]. The SPT showed the onset of depression started 2 weeks after the beginning of the CUS protocol [5, 63], and also showed the recovery from the anhedonic state within hours after ketamine injection [31]. This reinforces

the rapid antidepressant effect of ketamine that has been widely studied for the past decade [28, 44]. We can see in the sucrose preference test and in the sucrose intake graphs (Fig. 2a, c) that there is a losing interest in sucrose on the CUS groups while on the CTRL groups the intake of sucrose is stable, whereas in the total liquid intake graph (Fig. 2b) the data shows no alteration on liquid consumption. These suggest that the animals in the CUS groups are actively choosing tap water over the sucrose solution, and confirm the inexistence of any pre-existing spatial preference. A previous study, with similar results, has suggested this outcome [1].

Because of its traditional use as an anesthetic drug, we used the open field test to see whether this low dose of ketamine would have any effect on normal behavior in the animals. Our results showed no statistical difference between the groups in distance traveled or average speed (Fig. 3a, c), none of the groups presented anxious behavior (Fig. 3d, e), and no habituation to the test (Fig. 3b). Although we do not see any statistical differences between the groups in the distance traveled by minute, there is a gradual lowering of the mean of distance traveled in function of time within the groups. This effect is most likely to be the locomotor habituation to the test; however 3 min is not enough to assess the habituation, at least 5–10 min is needed [16]. Our data are in accordance with previous studies that show no effect of CUS in the OF [9, 16, 34, 63].

In order to confirm the establishment of depression in an animal model and the antidepressant effect of a drug, it has been suggested that several behavioral tests should be performed to avoid false positive results [9, 57]. We performed all behavioral, metabolic, and immunohistochemical analyses from 12 to 72 h after ketamine injection because of ketamine's broad time window of therapeutic effect [9]. In the forced swim test, the lowering of the latency to first immobile episode in the CUS groups confirmed the onset of a depressive state (Fig. 4a) and the fact the CUS + KET group maintained an average time immobile close to that of the CTRL groups confirmed the antidepressant effect of ketamine (Fig. 4b). As previously suggested, the climbing behavior observed in our study (Fig. 4c) is associated to noradrenergic mechanisms [11]. In our histological results, we saw no changes to TH immunoreactivity, a precursor to noradrenaline and adrenaline, as well as dopamine (Fig. 6). The VTA is a site with mainly dopaminergic activity, if any alteration to noradrenaline occurred it would be further down the biochemical pathway. Although TH is a precursor of dopamine and noradrenaline, our results from the FST suggests the CUS protocol may have had some effect on noradrenaline. However, there are no grounds in our research to predict any influence of ketamine on noradrenergic projections. Other researchers have shown that

altered TH levels in the *locus coeruleus* play a major part in the physiopathology of depression [25, 75]. This is a brain region of great relevance to the understanding of depression and should be of interest in future studies. The results from the OF test discard the possibility of a motor dysfunction affecting the FST test. These data suggest that the animals in the CUS groups showed depression-like behavior and that ketamine exerted the expected rapid antidepressant effect without creating major behavioral alterations.

The VTA is connected to all brain regions associated to MDD [48]. Metabolic ^{18}F -FDG analyses in previous studies are in accordance with our findings for the VTA, where no evident alteration in glucose metabolism is observed in the VTA after CUS protocol and curcumin treatment [23, 32]. Studies have shown that ketamine's delayed behavioral antidepressant effect can last up to 7 days after a single dose, which is accompanied by biochemical, electrophysiological, and morphological alterations to neurons [9, 31, 35, 37]. We chose to perform the microPET 2 days later to avoid an acute effect of ketamine, and observe a possible sub-chronic metabolic effect during the biochemical, electrophysiological, and morphological adaptations.

Overall decrease in dopamine levels has been well described in the brain of depressed animals [21]. In some regions that receive axons projecting from the mVTA, there was a decrease in dopamine levels in the frontal cortex, and no dopamine alteration in the amygdala [13, 51]. In relation to the VTA hodology, the nucleus accumbens (NAc) is a region that deserves careful attention; it receives inputs from the mVTA and the IVTA, the mVTA projects to the NAc core and medial shell, while the IVTA projects only to the NAc lateral shell. Unfortunately, these portions of the NAc are rarely studied separately. In the literature there are conflicting results: some state that there is a decrease in dopamine levels in the NAc [2, 51, 52], whereas others show no alteration to dopamine levels in the NAc [26, 60] and only a few have shown an increase [72]. It is noteworthy that the studies showing dopamine reduction used a 7-day CUS protocol, which was shown by the data from ours and other studies to be insufficient to induce depression [5].

Another technical consideration concerns the immunohistochemistry. Previous studies from our laboratory have demonstrated that the quantification of immunoreactivity through optical density is a very reliable analysis. This procedure is sufficiently sensitive to evaluate large differences in TH expression in animal models of Parkinson's disease [18, 54] and even subtle changes to TH levels in animals with experimental Diabetes mellitus [4, 43]. Also, the quantification of the levels of TH in immunohistochemistry accompanies alterations in dopamine metabolite

levels measured by HPLC neurochemical assay [18]. Thus, our immunohistochemical results on neuronal density, and regional and cellular ODs demonstrate that there is no change in VTA dopamine levels after 4 weeks of CUS protocol. These data in association with the previously mentioned results point to a decrease in dopamine levels that can occur in the first stages of chronic mild stress (1 week), and that in the following 4 weeks of the same stress dopamine levels return to normal, indicating some kind of neurochemical adaptation to stress. Another study which proposes a model of cyclin-dependent kinase 5 (a regulator of TH phosphorylation) knock-out mice, that behave depressively, observed no alterations to total TH levels and a decrease in the levels of p-TH in the VTA [74]. However, comparisons between our study and the aforementioned study are of limited value because there are important differences between the animal models and analyses used. These data reinforced the concept that depression is more closely related to the release/binding of neurotransmitters than to neurotransmitter production [36].

A previous study suggested that ketamine was able to increase the dopaminergic release in mPFC in rats [39], but this was in the context of using ketamine as a psychotomimetic, which usually requires larger doses than those necessary to produce antidepressant effects. A later study reviewed this result and considered the findings to be controversial [33]. We observed that ketamine does not disrupt the TH immunohistochemical reaction in the VTA, which leads us to believe that the antidepressant effect is exerted on another region or neurochemical system. Because of ketamine's pharmacology, it is reasonable to assume that the antidepressant effects are probably carried out by the glutamatergic interneurons of the VTA and other brain regions [48]. It is well documented that lesions to the VTA can elicit depressive-like behavior in rats [67], but recent optogenetic studies have shown that the firing rate of the VTA dopaminergic neurons plays a key role in the depressive-like and antidepressant behavior of rats [19, 20, 61]. One possibility is that ketamine could be influencing the firing rate of these dopaminergic neurons by altering the glutamatergic transmission. Current studies suggest that neurons can corelease different neurotransmitters [22]. Studies of the VTA have shown that a considerable amount of the dopaminergic cell population (12–37 %) co-expresses TH and VGluT2 (a vesicular glutamate transporter, which accumulates glutamate in synaptic vesicles) [40]. By blocking NMDAR, ketamine might increase the reuptake of glutamate by presynaptic and glial excitatory amino acid transporters (EAATs) [30], and thus interfere with the firing rate of these cells [19]. Our data shows that neither CUS nor ketamine influence upon TH content and production, which leads us to believe that the antidepressant mechanisms are more closely related to the synaptic

transmission than dopamine production. The abovementioned approach above is our best hypothesis given our results and previous studies, and should be further studied.

Our study is, to the best of our knowledge, the first to show that the depressive-like behavior induced by a chronic stress protocol and the antidepressant effect of a low, single dose of ketamine are not related to alterations in glucose metabolism and changes in TH immunoreactivity in the VTA. This finding could be useful for future studies in the same subject.

Acknowledgments The authors would like to thank the Brazilian funding agencies CNPq, CAPES, and FAPERGS for their support of this research. Dr. Diogo Lara, Dr. Jaderson Costa da Costa, and Dr. Léder Xavier are CNPq researchers.

Conflict of interest The authors declare they have no conflicts of interest.

References

1. Agmo A, Galvan A, Talamantes B (1995) Reward and reinforcement produced by drinking sucrose: two processes that may depend on different neurotransmitters. *Pharmacol Biochem Behav* 52:403–414
2. Ahmad A, Rasheed N, Banu N, Palit G (2010) Alterations in monoamine levels and oxidative systems in frontal cortex, striatum, and hippocampus of the rat brain during chronic unpredictable stress. *Stress* 13:355–364
3. American Psychiatry Association (2014) Diagnostic and statistical manual of mental disorders: DSM-5, 1st edn. American Psychiatry Association, Washington
4. Bagatini PB, Xavier LL et al (2014) Resveratrol prevents akinesia and restores neuronal tyrosine hydroxylase immunoreactivity in the substantia nigra pars compacta of diabetic rats. *Brain Res* 1592:101–112
5. Banasr M, Valentine GW, Li X, Gourley SL, Taylor JR, Duman RS (2007) Chronic unpredictable stress decreases cell proliferation in the cerebral cortex of the adult rat. *Biol Psychiatry* 62:496–504
6. Berman RM, Cappiello A et al (2000) Antidepressant effects of ketamine in depressed patients. *Biol Psychiatry* 47(4):351–354
7. Bhutani MK, Bishnoi M, Kulkarni SK (2009) Anti-depressant like effect of curcumin and its combination with piperine in unpredictable chronic stress-induced behavioral, biochemical and neurochemical changes. *Pharmacol Biochem Behav* 92:39–43
8. Blood AJ, Iosifescu DV, Makris N, Perlis RH, Kennedy DN (2010) Microstructural abnormalities in subcortical reward circuitry of subjects with major depressive disorder. *PLoS One* 5(11):e13945
9. Browne CA, Lucki I (2013) Antidepressant effects of ketamine: mechanisms underlying fast-acting novel antidepressants. *Front Pharmacol* 4:1–18
10. Burgdorf J, Zhang X, Nicholson K et al (2013) GLYX-13, a NMDA receptor glycine-site functional partial agonist, induces antidepressant-like effects without ketamine-like side effects. *Neuropsychopharmacology* 38:729–742
11. Cryan JF, Page ME, Lucki I (2005) Different behavioral effects of the antidepressants reboxetine, fluoxetine, and moclobemide in a modified forced swim test following chronic treatment. *Psychopharmacology* 182:335–344

12. Czéh B, Simon M, Schmelting M, Hiemke C, Fuchs E (2006) Astroglial plasticity in the hippocampus of affected by chronic psychosocial stress and concomitant fluoxetine treatment. *Neuropharmacology* 31:1616–1626
13. Dang H, Chen Y et al (2009) Antidepressant effects of ginseng total saponins in the forced swimming test and chronic mild stress models of depression. *Prog Neuro-Psychopharmacol Biol Psychiatry* 33:1417–1424
14. Diazgranados N, Ibrahim L et al (2010) A randomized add-on trial of an *N*-methyl-D-aspartate antagonist in treatment-resistant bipolar depression. *Arch Gen Psychiatry* 67(8):793–802
15. Dunlop BW, Nemeroff CB (2007) The role of dopamine in the pathophysiology of depression. *Arch Gen Psychiatry* 64:327–337
16. Eisenstein SA, Clapper JR, Holmes PV, Piomelli D, Hohmann AG (2010) A role for 2-arachidonoylglycerol and endocannabinoid signaling in the locomotor response to novelty induced by olfactory bulbectomy. *Pharmacol Res* 61:419–429
17. Ferrari AJ, Charlson FJ et al (2013) Burden of depressive disorders by country, sex, age, and year: findings from the global burden of disease study 2010. *PLoS Med* 10(11):e1001547
18. Ferraz AC, Matheussi F et al (2008) Evaluation of estrogen neuroprotective effect on nigrostriatal dopaminergic neurons following 6-hydroxydopamine injection into the substantia nigra pars compacta or the medial forebrain bundle. *Neurochem Res* 33:1238–1246
19. Friedman AK, Walsh JJ et al (2014) Enhancing depression mechanisms in midbrain dopamine neurons achieves homeostatic resilience. *Science* 344:313–319
20. Gunaydin LA, Grosenick L et al (2014) Natural neural projection dynamics underlying social behavior. *Cell* 157:1535–1551
21. Hill MN, Hellems KGC, Verma P, Gorzalka BB, Weinberg J (2012) Neurobiology of chronic mild stress: parallels to major depression. *Neurosci Biobehav Rev* 36:2085–2117
22. Hnasko TS, Chuhma N et al (2010) Vesicular glutamate transport promotes dopamine storage and glutamate corelease in vivo. *Neuron* 65:643–656
23. Hu H, Su L, Xu YQ, Zhang H, Wang LW (2010) Behavioral and [¹⁸F]-fluorodeoxyglucose micro positron emission tomography imaging study in a rat chronic mild stress model of depression. *Neuroscience* 169:171–181
24. Huynh TN, Krigbaum AM, Hanna JJ, Conrad CD (2011) Sex difference and phase of light cycle modify chronic stress effects on anxiety and depressive-like behavior. *Behav Brain Res* 222:212–222
25. Itoi K, Sugimoto N (2010) The brainstem noradrenergic systems in stress, anxiety and depression. *J Neuroendocrinol* 22:355–361
26. Johnson BN, Yamamoto BK (2009) Chronic unpredictable stress augments +3,4-methylenedioxymethamphetamine-induced monoamine depletions: the role of corticosterone. *Neuroscience* 159:1233–1243
27. Krishnan V, Nestler EJ (2008) The molecular neurobiology of depression. *Nature* 455:894–902
28. Kristal JH, Sanacora G, Duman RS (2013) Rapid-actin glutamatergic antidepressant: the path to ketamine and beyond. *Biol Psychiatry* 73:1133–1141
29. Lammel S, Lim BK, Malenka RC (2014) Reward and aversion in a heterogeneous midbrain dopamine system. *Neuropharmacology* 76:351–359
30. Lang UE, Borgwardt S (2013) Molecular mechanisms of depression: perspectives on new treatment strategies. *Cell Physiol Biochem* 31:761–777
31. Li N, Lee B et al (2010) mTOR-dependent synapse formation underlies the rapid antidepressant effects of NMDA antagonists. *Science* 329:959–964
32. Lin Z, Shi L et al (2013) Effects of curcumin on glucose metabolism in the brains of rats subjected to chronic unpredictable stress: a ¹⁸F-FDG micro-PET study. *BMC Complem Alt Med* 13:202
33. Luckenbaugh DA, Niciu MJ et al (2014) Do the dissociative side effects of ketamine mediate its antidepressant effects? *J Affect Disord* 159:56–61
34. Ma X, Jiang D et al (2011) Social isolation-induced aggression potentiates anxiety and depressive-like behavior in male mice subjected to unpredictable chronic mild stress. *PLoS One* 6(6):e20955
35. Ma XC, Dang YH, Jia M et al (2013) Long-lasting antidepressant action of ketamine, but not glucocorticoid synthase kinase-3 inhibitor SB216763, in the chronic mild stress model of mice. *PLoS One* 8:e56053
36. Machado-Vieira R, Manji HK, Zarate CA (2009) The role of the tripartite glutamatergic synapse in the pathophysiology and therapeutics of mood disorders. *Neuroscientist* 15:525–539
37. Maeng S, Zarate CA Jr, Du J et al (2008) Cellular mechanisms underlying the antidepressant effects of ketamine: role of alpha-amino-3-hydroxy-5-methylisoxazole-4-propionic acid receptors. *Biol Psychiatry* 63:349–352
38. Matuszewich L, Karney JJ, Carter SR, Janasik SP, O'Brien JL, Friedman RD (2007) The delayed effects of chronic unpredictable stress on anxiety measures. *Physiol Behav* 90:674–681
39. Moghaddam B, Adams B, Verma A, Daly D (1997) Activation of glutamatergic neurotransmission by ketamine: a novel step in the pathway from NMDA receptor blockade to dopaminergic and cognitive disruptions associated with the prefrontal cortex. *J Neurosci* 17:2921–2927
40. Morales M, Root DH (2014) Glutamate neurons within the midbrain dopamine regions. *Neuroscience* 282:60–68
41. Murrough J, Charney DS (2011) Lifting the mood with ketamine. *Nat Med* 16(12):1384–1385
42. Murrough JW, Iosifescu DV et al (2013) Antidepressant efficacy of ketamine in treatment-resistant major depression: a two-site randomized controlled trial. *Am J Psychiatry* 170(10):1134–1142
43. do Nascimento PS, Lovatel GA et al (2011) Treadmill training improves motor skills and increases tyrosine hydroxylase immunoreactivity in the substantia nigra pars compacta in diabetic rats. *Brain Res* 1382:173–180
44. Naughton M, Clarke G, O'Leary OF, Cryan JF, Dinan TG (2014) A review of ketamine in affective disorders: current evidence of clinical efficacy, limitations and use and pre-clinical evidence on proposed mechanism of action. *J Affect Disord* 156:24–35
45. Olsson M, Marcus SC, Shaffer D (2006) Antidepressant drug therapy and suicide in severely depressed children and adults. *Arch Gen Psychiatry* 63:865–872
46. Ortiz J, Fitzgerald LW, Lane S, Terwillinger R, Nestler EJ (1996) Biochemical adaptations in the mesolimbic dopamine system in response to repeated stress. *Neuropsychopharmacology* 14:443–452
47. Otte D-M, Barcena de Arellano ML et al (2013) Effects of chronic D-serine elevation on animal models of depression and anxiety-related behavior. *PLoS One* 8(6):e67131
48. Polter AM, Kauer JA (2014) Stress and VTA synapses: implications for addiction and depression. *Eur J Neurosci* 39:1179–1188
49. Price RB, Nock MK, Charney DS, Mathew SJ (2009) Effects of intravenous ketamine on explicit and implicit measures of suicidality in treatment-resistant depression. *Biol Psychiatry* 66:522–526
50. Quan M, Zhang N, Wang Y, Zhang T, Yang Z (2011) Possible antidepressant effects and mechanisms of memantine in behaviors and synaptic plasticity of a depression rat model. *Neuroscience* 182:88–97
51. Rasheed N, Ahmad A, Pandey CP, Chatuverdi RK, Lohani M, Palit G (2010) Differential response of central dopaminergic

- system in acute and chronic unpredictable stress model in rats. *Neurochem Res* 35:22–32
52. Rasheed N, Tyagi E, Ahmad A, Siripurapu KB, Lahiri S, Shukla R, Palit G (2008) Involvement of monoamines and proinflammatory cytokines in mediating the anti-stress effects of *Panax quinquefolium*. *J Ethnopharmacol* 117:257–262
 53. Razafsha M, Behforuzi H et al (2013) An updated overview of animal models in neuropsychiatry. *Neuroscience* 240:204–218
 54. Rizelio V, Szawka RE et al (2010) Lesion of the subthalamic nucleus reverses motor deficits but not death of nigrostriatal dopaminergic neurons in a rat 6-hydroxydopamine-lesion model of Parkinson's disease. *Braz J Med Biol Res* 43(1):85–95
 55. Rong H, Wang G, Liu T, Wang H, Wan Q, Weng S (2010) Chronic mild stress induces fluoxetine-reversible decreases in hippocampal and cerebrospinal fluid levels of the neurotrophic factor S100B and its specific receptor. *Int J Mol Sci* 11:5310–5322
 56. Saur L, Baptista PPA et al (2014) Physical exercise increases GFAP expression and induces morphological changes in hippocampal astrocytes. *Brain Struct Funct* 219:293–302
 57. Slatery DA, Cryan JF (2012) Using the rat forced swim test to assess antidepressant-like activity in rodents. *Nat Protoc* 7(6):1009–1014
 58. Schiffer WK, Mirrione MM et al (2006) Serial microPET measures of the metabolic reaction to a microdialysis probe implant. *J Neurosci Methods* 155:272–284
 59. Su X, Cheng K (2014). Comparison of two site-specifically ¹⁸F-labelled antibodies for PET imaging of EGFR positive tumors. *Mol Pharm* 11(11):3947–3956
 60. Tata DA, Yamamoto BK (2008) Chronic stress enhances methamphetamine-induced extracellular glutamate and excitotoxicity in the rat striatum. *Synapse* 62:325–336
 61. Tye KM, Mirzabekov JJ et al (2013) Dopamine neurons modulate neural encoding and expression of depression-related behavior. *Nature* 493:537–541
 62. Uher R, Payne JL, Pavlova B, Perlis RH (2014) Major depressive disorder in DSM-5: implications for clinical practice and research of changes from DSM-IV. *Depress Anxiety* 31:459–471
 63. Venzala E, García-García AL, Elizalde N, Tordera RM (2013) Social vs. environmental stress model of depression from a behavioural and neurochemical approach. *Eur Neuropsychopharmacol* 23:697–708
 64. WHO (2012) Depression: a global crisis. World Federation for Mental Health, Occoquan, VA
 65. Willner P (2005) Chronic mild stress (CMS) revisited: consistency and behavioural-neurobiological concordance in the effects of CMS. *Neuropsychobiology* 52:90–110
 66. Willner P, Scheel-Kruger J, Belzung C (2013) The neurobiology of depression and antidepressant action. *Neurosci Biobehav Rev* 37:2331–2371
 67. Winter C, von Rumohr A et al (2007) Lesions of dopaminergic neurons in the substantia nigra pars compacta and in the ventral tegmental area enhance depressive-like behavior in rats. *Behav Brain Res* 184:133–141
 68. Wyckhuys T, Wyffels L, Langlois X, Schmidt M, Stroobants S, Staelens S (2014) The [¹⁸F] FDG μ PET readout of a brain activation model to evaluate the metabotropic glutamate receptor 2 positive allosteric modulator JNJ-42153605. *J Pharmacol Exp Ther* 350(2):375–386
 69. Xavier LL, Viola GG et al (2005) A simple and fast densitometric method for the analysis of tyrosine hydroxylase immunoreactivity in the substantia nigra pars compacta and in the ventral tegmental area. *Brain Res Protoc* 16:58–64
 70. Yang C, Li X, Wang N et al (2012) Tramadol reinforces antidepressant effects of ketamine with increased levels of brain-derived neurotrophic factor and tropomyosin-related kinase B in rat hippocampus. *Front Med* 6:411–415
 71. Yang C, Hu YM, Zhou ZQ et al (2013) Acute administration of ketamine in rats increases hippocampal BDNF and mTOR levels during forced swimming test. *Ups J Med Sci* 118:3–8
 72. Yi LT, Li JM, Li YC, Pan Y, Xu Q, Kong LD (2008) Antidepressant-like behavioral and neurochemical effects of the citrus-associated chemical apigenin. *Life Sci* 82:741–751
 73. Zarate CA Jr, Singh JB et al (2006) A randomized trial of *N*-methyl-D-aspartate antagonist in treatment-resistant major depression. *Arch Gen Psychiatry* 63(8):856–864
 74. Zhong P, Liu X et al (2014) Cyclin-dependent kinase 5 in the ventral tegmental area regulates depression-related behaviors. *J Neurosci* 34(18):6352–6366
 75. Zhu MY, Klimek V et al (1999) Elevated levels of tyrosine hydroxylase in the locus coeruleus in major depression. *Biol Psychiatry* 46(9):1275–1286

5 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Com o artigo científico I, que seja do nosso conhecimento, demonstramos pela primeira vez a distribuição quantitativa do ^{18}F -FDG no encéfalo de ratos Wistar em forma de atlas metabólico e a comparação desta com estudos prévios que avaliem COX.

A partir da padronização da técnica de ^{18}F -FDG-microPET elaboramos um atlas do metabolismo encefálico de ratos Wistar. Assim, temos uma descrição visual da técnica, que é imprescindível para quantificação da captação de ^{18}F -FDG; sendo três pontos importantes levantados: 1-Uma vez que o ^{18}F -FDG tem uma predileção pela substância cinzenta do encéfalo, (SOUTHWORTH *et al.*, 2003) as regiões correspondentes aos córtices devem estar bem marcadas na imagem; 2-Em contrapartida, as regiões da coroa radiata e dos ventrículos por serem substância branca e líquido cefalorraquidiano concentram menos ^{18}F -FDG e aparecem em menor intensidade; 3-Sobre a linha média do encéfalo, na região correspondente aos núcleos da base, ao mesencéfalo e ao cerebelo a distribuição de ^{18}F -FDG se apresenta de uma forma homogênea.

O microPET é atualmente a técnica mais fidedigna para avaliar o metabolismo encefálico, uma vez que o exame é realizado *in vivo*. Mas por outro lado, não oferece a mesma precisão microanatômica que técnicas histológicas. Comparamos nossos dados de ^{18}F -FDG a dados previamente publicados que avaliem o COX, um marcador histoquímico clássico para metabolismo. Observamos que nossos dados se correlacionaram com um estudo (SHUMAKE *et al.*, 2010), mas não com os outros quatro estudos selecionados, provavelmente devido à diferença de linhagem dos animais, ou por diferenças inerentes às técnicas do tipo *ex vivo* e *in vivo*.

Os dados acima, ainda que não se apliquem diretamente a depressão e ao seu tratamento, foram indispensáveis na implementação e na padronização da segunda análise; e viabilizaram a produção do artigo científico II.

No artigo científico II, avaliamos o comportamento depressivo de ratos Wistar expostos ao protocolo CUS, e a reversão desta depressão quando tratados agudamente com cetamina. Ademais, avaliamos o metabolismo de glicose na VTA através do ^{18}F -FDG-microPET, e o conteúdo dopaminérgico da mesma região utilizando a técnica de imunistoquímica para TH. Neste estudo observamos a rápida ação da cetamina em reverter o quadro símil-depressivo induzido pelo protocolo CUS nos modelos animais dentro de algumas horas, e a sustentação deste efeito por até, pelo menos, 24 horas. Resultados semelhantes foram observados em pesquisas que utilizem o protocolo CUS e a cetamina (LI *et al.*, 2011; KRYSTAL; SANCORA; DUMAN, 2013; NAUGHTON *et al.*, 2014). Além disso, observamos que a expressão de TH na VTA permanece inalterada durante os experimentos, o que não indica alterações da síntese de dopamina na fisiopatogenia do MDD.

Através dos testes de preferência a sacarose (SPT – do inglês – *sucrose preference test*) realizados conseguimos observar claramente uma diminuição constante da busca pela solução açucarada pelos ratos que estavam sendo submetidos ao protocolo CUS. Estes animais foram diminuindo seu interesse por uma substância que outrora lhes davam prazer, o que pode ser entendido como anedonia nos ratos. Depois da aplicação da cetamina, a queda de consumo de sacarose observada nos animais depressivos foi revertida no mesmo dia da administração farmacológica da droga (BANASR *et al.*, 2007; BANASR; DUMAN, 2008; LI *et al.*, 2010). A manifestação deste rápido efeito antidepressivo é um grande avanço na psicofarmacologia, tendo em vista que os tratamentos atuais para depressão com inibidores seletivos de recaptção de serotonina podem levar até quatro semanas para surtir efeito clínico (DEL PORTO, 1999; FAVA; KENDLER, 2000). Ademais, ao realizarmos o SPT semanalmente pudemos observar em que momento, durante a execução do protocolo CUS, que os animais começaram apresentar o quadro anedônico. Embora este dado não contribua diretamente em um contexto clínico, este fortalece o embasamento do protocolo CUS como um modelo ideal para a replicação do MDD na pesquisa científica básica.

O teste de nado forçado (FST – do inglês – *forced swim test*) é o teste mais recomendado para avaliar o efeito antidepressivo de diferentes fármacos (SLATTERY; CRYAN, 2012). Durante o FST o rato pode exercer uma de três ações: 1) nadar, 2) permanecer imóvel e 3) escalar. Cada tipo de antidepressivo influencia o FST de uma maneira diferente, rendendo combinações únicas entre as três variáveis. Em nosso estudo observamos que o protocolo CUS diminuiu a latência dos animais até o primeiro episódio imóvel e aumentou o tempo de imobilidade dos animais; a cetamina foi capaz de reverter o aumento do tempo de imobilidade causado pelo protocolo CUS nos ratos, enquanto as outras variáveis permaneceram inalteradas. Esta combinação ainda não havia sido relatada na literatura com nenhum outro antidepressivo. (CRYAN; PAGE; LUCKI, 2005).

No nosso estudo não observamos alterações no metabolismo de glicose nem nos níveis de TH na VTA, no entanto, é amplamente aceito que durante na depressão os níveis gerais de dopamina estejam reduzidos no encéfalo (HILL *et al.*, 2012). Isto sugere que os mecanismos que estão comprometidos na depressão não estão relacionados com a síntese de dopamina, ao menos na VTA. Este achado reforça a hipótese de que as reduções de atividade dopaminérgica observadas no MDD estejam mais intimamente relacionadas à variações na liberação/ligação da dopamina do que propriamente à variações na síntese deste neurotransmissor (MACHADO-VIEIRA; MANJI; ZARATE, 2009). Do mesmo modo, a cetamina também não exerceu efeito sobre a imunorreatividade para TH. Com estes estudos aprimoramos um pouco mais o conhecimento a respeito das alterações fisiológicas e neuroquímicas que acompanham o MDD e sobre a atuação da cetamina como um antidepressivo rápido. Ademais, as técnicas de imageamento padronizadas em nossa Universidade, por esta tese, abrem portas para próximos estudos e contribuem de forma crucial para o melhor entendimento da fisiopatogenia de diferentes patologias que possam ser mimetizadas em roedores.

PERSPECTIVAS

- Realizar a correlação do ^{18}F -FDG-microPET pareada a avaliações bioquímicas e histoquímicas da COX.
- Avaliar as alterações do metabolismo de glicose em diferentes regiões encefálicas de animais submetidos ao protocolo CUS, utilizando-se do ^{18}F -FDG-microPET, e tratados agudamente com cetamina;
- Avaliar a distribuição de outros radio-traçadores, por meio do microPET, no encéfalo de animais submetidos ao protocolo CUS e tratados agudamente com cetamina;
- Avaliar a expressão de: GluN2A e GluN2B, subunidades dos receptores NMDA; GluR1 e GluR2, subunidades dos receptores AMPA; Sinapsina I e PSD95, proteínas sinápticas, na VTA e outras regiões encefálicas de animais submetidos ao protocolo CUS e tratados agudamente com cetamina;
- Avaliar o envolvimento das células gliais na fisiopatologia do MDD e cetamina.
- Avaliar os efeitos comportamentais, neurometabólicos e histofisiológicos da administração crônica de cetamina.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AAN HET ROT, M. et al. Safety and Efficacy of Repeated-Dose Intravenous Ketamine for Treatment-Resistant Depression. **Biological Psychiatry**, v. 67, p. 139-145, 2010.

AHMAD, A. et al. Alterations to monoamine levels and oxidative systems in the frontal cortex, striatum and hippocampus of the rat brain during chronic unpredictable stress. **Stress**, v. 13, p. 355-364, 2010.

AMERICAN PSYCHIATRIC ASSOCIATION. **Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders: DSM-5**. 5th. ed. Arlington, VA, EUA: American Psychiatric Publishing, 2013.

BAINS, J. S.; CUSULIN, J. I. W.; INOUE, W. Stress-related synaptic plasticity in the hypothalamus. **Nature Reviews Neuroscience**, v. 16, p. 377-388, 2015.

BANASR, M. et al. Chronic Unpredictable Stress Decreases Cell Proliferation in the Cerebral Cortex of the Adult Rat. **Biological Psychiatry**, v. 62, p. 496-504, 2007.

BANASR, M.; DUMAN, R. S. Glial loss in the prefrontal cortex is sufficient to induce depressive-like behaviors. **Biological Psychiatry**, v. 64, p. 863-870, 2008.

BEKRIS, S. et al. Behavioural and neurochemical effects induced by chronic mild stress applied to two different rat strains. **Behavioural Brain Research**, v. 161, p. 45-59, 2005.

BERMAN, R. M. et al. Antidepressant effects of ketamine in depressed patients. **Biological Psychiatry**, v. 47, p. 351-354, 2000.

BHUTANI, M. K.; BISHNOI, M.; KULKARNI, S. K. Anti-depressant like effect of curcumin and its combination with piperine in unpredictable chronic stress-induced behavioral, biochemical and neurochemical changes. **Pharmacology, Biochemistry, and Behavior**, v. 92, p. 39-43, 2009.

CANNON, D. M. et al. Dopamine type-1 receptor binding in major depressive disorder assessed using emission tomography and [11C]NNC-112. **Neuropsychopharmacology**, v. 34, p. 1277-1287, 2009.

CREMA, L. et al. Na, K ATPase activity is reduced in amygdala of rats with chronic stress-induced anxiety-like behavior. **Neurochemical Research**, v. 35, p. 1787-1795, 2010.

- CRYAN, J. F.; HOLMES, A. The ascent of mouse: advances in modeling human depression and anxiety. **National Review of Drug Discovery**, v. 4, p. 775-790, 2005.
- CRYAN, J. F.; PAGE, M. E.; LUCKI, I. Differential behavioral effects of the antidepressants reboxetine, fluoxetine, and moclobemide in a modified forced swim test following chronic treatment. **Psychopharmacology**, v. 182, p. 335-344, 2005.
- DAVISON, K. Historical aspects of mood disorders. **Psychiatry**, v. 5, p. 115-118, 2006.
- DEL PORTO, J. A. Conceito e diagnóstico. **Revista Brasileira de Psiquiatria**, v. 21, p. S6-11, 1999.
- DETKA, J. et al. Brain glucose metabolism in an animal model of depression. **Neuroscience**, v. 295, p. 198-208, 2015.
- DREVETS, W. C. et al. Serotonin-1A receptor imaging in recurrent depression: replication and literature review. **Nuclear Medicine and Biology**, v. 34, p. 865-877, 2007.
- DUMAN, R. S. Neurobiology of stress, depression, and rapid acting antidepressants: remodeling synaptic connections. **Depression and Anxiety**, v. 00, p. 1-6, 2014.
- FAVA, M.; KENDLER, K. S. Major Depressive Disorder. **Neuron**, v. 28, p. 335-341, 2000.
- FERRARI, A. J. et al. Burden of depressive disorders by country, sex, age, and year: Findings from the Global Burden of Disease Study 2010. **PLoS Medicine**, v. 10, n. 11, p. e1001547, 2013.
- FLECK, M. P. et al. Revisão das diretrizes da Associação Médica Brasileira para o tratamento da depressão (versão integral). **Revista Brasileira de Psiquiatria**, v. 31 (Suppl I), p. S7-17, 2009.
- FRIEDMAN, A. K. et al. Enhancing depression mechanisms in midbrain dopamine neurons achieves homeostatic resilience. **Science**, v. 344, p. 313-319, 2014.
- FRIEDMAN, A. K. et al. Enhancing depression mechanisms in midbrain dopamine neurons achieves homeostatic resilience. **Science**, v. 344, p. 313-319, 2014.
- GITTINS, R. A.; HARRISON, P. J. A morphometric study of glia and neurons in the anterior cingulate cortex in mood disorder. **Journal of Affective Disorders**, v. 133, p. 328-332, 2011.
- GOS, T. et al. Tyrosine hydroxylase immunoreactivity in the locus coeruleus is elevated in violent suicidal depressive patients. **European Archives of Psychiatry and Clinical Neuroscience**, v. 258, p. 513-520, 2008.

GOSSELIN, R. D. et al. Region specific decrease in glial fibrillary acidic protein immunoreactivity in the brain of a rat model of depression. **Neuroscience**, v. 159, p. 915-925, 2009.

GRACE, A. A.; BUNNEY, B. S. Nigral dopamine neurons: intracellular recording and identification with L-dopa injection and histofluorescence. **Science**, v. 210, p. 654-656, 1980.

GREENBERG, P. E. et al. The economic burden of depression in the United States: How did it change between 1990 and 2000? **The Journal of Clinical Psychiatry**, v. 64, p. 1465-1475, 2003.

GUNAYDIN, L. A. et al. Natural neural projection dynamics underlying social behavior. **Cell**, v. 157, p. 1535-1551, 2014.

HARRO, J. et al. Chronic mild unpredictable stress after noradrenergic denervation: attenuation of behavioral and biochemical effects of DSP-4 treatment. **European Neuropsychopharmacology**, v. 10, p. 5-16, 1999.

HARRO, J. et al. Mapping patterns of depression-related brain regions with cytochrome oxidase histochemistry: relevance of animal affective systems to human disorders, with a focus on resilience to adverse events. **Neuroscience and Biobehavioral Reviews**, v. 35, p. 1876-1889, 2011.

HARRO, J. et al. Revealing the cerebral regions and networks mediating vulnerability to depression: oxidative metabolism mapping of the rat brain. **Behavioural Brain Research**, v. 267, p. 83-94, 2014.

HEVNER, R. F.; LIU, S.; WONG-RILEY, M. T. T. A metabolic map of cytochrome oxidase in the rat brain: histochemical, densitometric and biochemical studies. **Neuroscience**, v. 65, n. 2, p. 313-342, 1995.

HILL, M. N. et al. Neurobiology of chronic mild stress: Parallels to major depression. **Neuroscience and Biobehavioral Reviews**, v. 36, p. 2085-2117, 2012.

HILLHOUSE, T. M.; PORTER, J. H. A brief history of the development of antidepressant drugs: from monoamines to glutamate. **Experimental and Clinical Psychopharmacology**, v. 23, p. 1-21, 2015.

HU, H. et al. Behavioral and [F-18] fluorodeoxyglucose micro positron emission tomography imaging study in a rat chronic mild stress model of depression. **Neuroscience**, v. 169, p. 171-181, 2010.

JOHNSON, B. N.; YAMAMOTO, B. K. Chronic unpredictable stress augments +3,4-methylenedioxymethamphetamine-induced monoamine depletions: the role of corticosterone. **Neuroscience**, v. 159, p. 180-189, 2009.

KALIA, M. Neurobiological basis of depression: an update. **Metabolism Clinical and Experimental**, v. 54 (Suppl 1), p. 24-27, 2005.

KATZ, R. Animal model of depression: pharmacological sensitivity of a hedonic deficit. **Pharmacology Biochemistry and Behavior**, v. 16, p. 965-968, 1982.

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

KRYSTAL, J. H.; SANCORA, G.; DUMAN, R. S. Rapid-acting glutamatergic antidepressants: the path to ketamine and beyond. **Biological Psychiatry**, v. 73, p. 1133-1141, 2013.

LAMMEL, S.; LIM, B. K.; MALENKA, R. C. Reward and aversion in a heterogeneous midbrain dopamine system. **Neuropharmacology**, v. 76, p. 351-359, 2014.

LANCELOT, S.; ZIMMER, L. Small-animal positron emission tomography as a tool for neuropharmacology. **Trends in Pharmacological Sciences**, v. 31, p. 411-417, 2010.

LARA, D. R.; BISOL, L. W.; MUNARI, L. R. Antidepressant, mood stabilizing and procognitive effects of very low dose sublingual ketamine in refractory unipolar and bipolar depression. **International Journal of Neuropsychopharmacology**, v. 16, p. 2111-2117, 2013.

LAUGERAY, A. et al. Peripheral and cerebral metabolic abnormalities of the tryptophan-kynurenine pathway in a murine model of major depression. **Behavioral Brain Research**, v. 210, p. 84-91, 2010.

LI, N. et al. mTOR-Dependent Synapse Formation Underlies the Rapid Antidepressant Effects of NMDA Antagonists. **Science**, v. 329, p. 959-964, 2010.

LI, N. et al. Glutamate N-methyl-D-aspartate receptor antagonists rapidly reverse behavioral and synaptic deficits caused by chronic stress exposure. **Biological Psychiatry**, v. 69, p. 754-761, 2011.

LIN, Z. et al. Effects of curcumin on glucose metabolism in the brains of rats subjected to chronic unpredictable stress: a ¹⁸F-FDG micro-PET study. **BCM Complementary & Alternative Medicine**, v. 13, p. 202, 2013.

MACHADO-VIEIRA, R.; MANJI, H. K.; ZARATE, C. A. The role of the tripartite glutamatergic synapse in the pathophysiology and therapeutics of mood disorders. **Neuroscientist**, v. 15, p. 525-539, 2009.

MEYER, J. H. et al. Elevated monoamine oxidase A levels in the brain: an explanation for the monoamine imbalance of major depression. **Archives of General Psychiatry**, v. 63, p. 1209-1216, 2006.

MION, G.; VILLEVIEILLE, T. Ketamine pharmacology: an update (pharmacodynamics and molecular aspects, recent findings). **CNS Neuroscience & Therapeutics**, v. 19, p. 370-380, 2013.

MITCHELL, A. J.; VAZE, A.; RAO, S. Clinical diagnosis of depression in primary care: a meta-analysis. **Lancet**, v. 374, p. 609-619, 2009.

MORALES, M.; ROOT, D. H. Glutamate neurons within the midbrain dopamine regions. **Neuroscience**, v. 282, p. 60-68, 2014.

MURPHY, D. L.; CAMPBELL, L.; COSTA, J. L. **Psychopharmacology**: a generation of progress. Nova Iorque: Raven, 1978. 1235-1247 p.

NAUGHTON, M. et al. A review of ketamine in affective disorders: current evidence of clinical efficacy, limitations of use and pre-clinical evidence in proposed mechanisms of action. **Journal of Affective Disorders**, v. 156, p. 24-35, 2014.

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

OLFSON, M.; MARCUS, S. C.; SHAFFER, D. Antidepressant drug therapy and suicide in severely depressed children and adults. A case-control study. **Archives of General Psychiatry**, v. 63, p. 865-872, 2006.

PAPP, M. et al. Behavioral and biochemical studies of citalopram and WAY 100635 in rat chronic mild stress model. **Pharmacology Biochemistry and Behavior**, v. 72, p. 465-474, 2002.

PAXINOS, G.; WATSON, C. **The rat brain in stereotaxic coordinates**. 7. ed. San Diego: Elsevier, 2014.

PITCHOT, W. et al. Reduced dopaminergic activity in depressed suicides. **Psychoneuroendocrinology**, v. 26, p. 331-335, 2001.

POLTER, A. M.; KAUER, J. A. Stress and VTA synapses: implications for addiction and depression. **European Journal of Neuroscience**, v. 39, p. 1179-1188, 2014.

PRICE, R. B. et al. Effects of intravenous ketamine and explicit and implicit measures of suicidality in treatment-resistant depression. **Biological Psychiatry**, v. 66, p. 522-526, 2009.

QUAN, M. et al. Impairments of behavior, information flow between thalamus and cortex, and prefrontal cortical synaptic plasticity in an animal model of depression. **Brain Research Bulletin**, v. 85, p. 109-116, 2011b.

QUAN, M. N. et al. Possible antidepressant effects and mechanisms of memantine in behaviors and synaptic plasticity of a depression rat model. **Neuroscience**, v. 182, p. 88-97, 2011a.

RAJKOWSKA, G. et al. Morphometric evidence for neuronal and glial prefrontal cell pathology in major depression. **Biological Psychiatry**, v. 45, p. 1085-1098, 1999.

RASHEED, N. et al. Involvement of monoamines and proinflammatory cytokines in mediating the anti-stress effects of Panax quinquefolium. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 117, p. 257-262, 2008.

RASHEED, N. et al. Differential response of central dopaminergic system in acute and chronic unpredictable stress models in rats. **Neurochemical Research**, v. 35, p. 22-32, 2010.

RAZAFSHA, M. et al. An updated overview of animal models in neuropsychiatry. **Neuroscience**, v. 240, p. 204-218, 2013.

RESSLER, K. J.; NEMEROFF, C. B. Role of serotonergic and noradrenergic systems in the pathophysiology of depression and anxiety disorders. **Depression and Anxiety**, v. 12 (Suppl. 1), p. 2-19, 2000.

ROSA-NETO, P. et al. Measurement of brain regional alpha-[11C]methyl-L-tryptophan trapping as a measure of serotonin synthesis in medication-free patients with major depression. **Archives of General Psychiatry**, v. 61, p. 556-563, 2004.

SHANSKY, R. M.; MORRISON, J. H. Stress-induced dendritic remodeling in the medial prefrontal cortex: effects of circuit, hormones and rest. **Brain Research**, v. 1293, p. 108-113, 2009.

SHELTON, R. C. et al. Elevated 5-HT 2A receptors in postmortem prefrontal cortex in major depression is associated with reduced protein kinase A. **Neuroscience**, v. 158, p. 1406-1415, 2009.

SHER, L. et al. Lower cerebrospinal fluid homovanillic acid levels in depressed suicide attempters. **Journal of Affective Disorders**, v. 90, p. 83-89, 2006.

SHUMAKE, J. et al. Metabolic mapping of the effects of the antidepressant fluoxetine in the brains of congenitally helpless rats. **Brain Research**, v. 1343, p. 218-225, 2010.

SLATTERY, D. A.; CRYAN, J. F. Using the rat forced swim to assess antidepressant-like activity in rodents. **Nature Protocols**, v. 7, p. 1009-1014, 2012.

SOBOCKI, P. et al. Cost of depression in Europe. **Journal of Mental Health and Psychiatry and Economy**, v. 9, p. 87-98, 2006.

SOUTHWORTH, R. et al. Tissue-specific differences in 2-fluoro-2-deoxyglucose metabolism beyond-6-P: a ¹⁹F NMR spectroscopy study in the rat. **NMR in Biomedicine**, v. 16, p. 494-502, 2003.

SU, L. et al. Cerebral metabolism in major depressive disorder: a voxel-based meta-analysis of positron emission tomography studies. **BMC PSYCHIATRY**, v. 14, p. 321, 2014.

SULLIVAN, P. F.; NEALE, M. C.; KENDLER, K. S. Genetic epidemiologic of major depression: review and meta-analysis. **American Journal of Psychiatry**, v. 157, p. 1552-1562, 2000.

TYE, K. M. et al. Dopamine neurons modulate neural encoding and expression of depression-related behaviour. **Nature**, v. 493, p. 537-541, 2013.

VENZALA, E. et al. Social vs. environmental stress models of depression from a behavioural and neurochemical approach. **European Neuropsychopharmacology**, v. 23, p. 697-708, 2013.

VILLARREAL, J. S. et al. Water maze training in aged rats: effects on brain metabolic capacity and behavior. **Brain Research**, v. 939, p. 43-51, 2002.

VIRDEE, K. et al. Applications of positron emission tomography in animal models of neurological and neuropsychiatric disorders. **Neuroscience and Biobehavioral Reviews**, v. 36, p. 1188-1216, 2012.

WIENHARD, K. Measurement of glucose consumption using [18F]fluorodeoxyglucose. **Methods**, v. 27, p. 218-225, 2002.

WILLIAMS JR, J. W. et al. A systematic review of newer pharmacotherapies for depression in adults: evidence report summary. **Annals of Intern Medicine**, v. 132, p. 743-756, 2000.

WILLNER, P. Chronic mild stress (CMS) revisited: consistency and behavioural-neurobiological concordance in the effects of CMS. **Neuropsychopharmacology**, v. 52, p. 90-110, 2005.

YAMAGUCHI, T. et al. Mesocorticolimbic glutamatergic pathway. **Journal of Neuroscience**, v. 31, p. 8476-8490, 2011.

YI, L. T. et al. Antidepressant-like behavioral and neurochemical effects of the citrus-associated chemical apigenin. **Life Science**, v. 82, p. 741-751, 2008.

ZARATE JR, C. A. et al. Replication of Ketamine's Antidepressant Efficacy in Bipolar Depression: A Randomized Controlled Add-On Trial. **Biological Psychiatry**, v. 71, p. 939-946, 2012.

ZHU, M. Y. et al. Elevated levels of tyrosine hydroxylase in the locus coeruleus in major depression. **Biological Psychiatry**, v. 46, p. 1275-1286, 1999.

ANEXO A – Resumos dos artigos que o doutorando participou como autor principal ou colaborador durante o período de doutorado.

- Artigo publicado no periódico *Pharmacology Biochemistry and Behavior* em 2013.

Pharmacology, Biochemistry and Behavior 104 (2013) 113–118



Contents lists available at SciVerse ScienceDirect

Pharmacology, Biochemistry and Behavior

journal homepage: www.elsevier.com/locate/pharmbiochembeh



Physical exercise down-regulated locomotor side effects induced by haloperidol treatment in Wistar rats

Pedro Porto Alegre Baptista ^{a,*}, Priscylla Nunes de Senna ^b, Mariana Fontoura Paim ^a, Lisiani Saur ^a, Martina Blank ^c, Patricia do Nascimento ^b, Jocemar Ilha ^b, Mônica Ryff Moreira Vianna ^c, Régis Gemerasca Mestriner ^{a,d}, Matilde Achaval ^b, Léder Leal Xavier ^a

^a Laboratório de Biologia Celular e Tecidual, Departamento de Ciências Morfofisiológicas, Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brazil

^b Laboratório de Histofisiologia Comparada, Departamento de Ciências Morfológicas, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brazil

^c Laboratório de Biologia e Desenvolvimento do Sistema Nervoso, Departamento de Ciências Morfofisiológicas, Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brazil

^d Faculdade de Enfermagem, Nutrição e Fisioterapia, Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brazil

ARTICLE INFO

Article history:

Received 30 August 2012

Received in revised form 30 November 2012

Accepted 23 December 2012

Available online 2 January 2013

Keywords:

Exercise

Antipsychotics

Dopamine

Parkinsonism

Akinesia

Gait

ABSTRACT

Extra-pyramidal symptoms (EPS) such as akinesia, dystonia, gait alteration and tremors are observed when dopamine D2-receptors are blocked by pharmacological agents such as haloperidol. These alterations produce a Parkinson disease-like state (PLS). Physical exercise has been proven to improve gait and locomotor symptoms in Parkinson's disease; we sought to elucidate the effects of physical exercise on PLS induced by chronic administration of haloperidol in rats. We used 48 rats distributed into four groups: Control, Exercise, Haloperidol, and Hal + Exe. All the animals received a daily injection of saline or haloperidol for 30 days, and the exercise groups underwent a daily 30-minute exercise protocol for 20 days. The animals were subjected to the ink-paw test, bar test and open-field test throughout the training period. The haloperidol-induced akinesia increased throughout the days of injections, but exercise was shown to alleviate it. The assessment showed shortened stride length and increased stance width with the use of haloperidol, which were significantly alleviated by exercise. These results indicate that exercise could be an interesting approach towards reducing unwanted EPS caused by haloperidol.

© 2013 Elsevier Inc. All rights reserved.

1. Introduction

Extrapyramidal symptoms (EPS) are a collection of motor side-effects that can arise with the use of dopamine D2-receptor blockers. Drugs of this nature are widely used in the treatment of psychotic illnesses such as schizophrenia and bipolarity (Inada et al., 2002). Haloperidol is an example of a dopamine antagonist and, although it belongs to the first generation of antipsychotics drugs (APD), it is still the reference treatment for schizophrenia (McCue et al., 2006). EPS presents a very specific set of motor deficits such as tremors, akinesia, dystonia and gait alterations (Lieberman et al., 2005; Miyamoto et al., 2005), which greatly resemble the motor characteristics observed in Parkinson's Disease (PD) patients and animal models (Amende et al., 2005; Guillot et al., 2008; Kurz et al., 2007). For this reason, APD is said to cause Parkinsonism (Peluso et al., 2012) or, as it will be referred to in this study, a Parkinson's-like state (PLS).

Physical exercise is widely prescribed to PD patients in an attempt to improve motor control and enhance life quality (Uitti, 2012). Treadmill training, in particular, has been shown to greatly improve the gait

quality of PD patients (Herman et al., 2008) and in PD animal models (Pothakos et al., 2009). On the other hand, very little has been written about gait alterations in PLS induced by APD, with some studies merely mentioning the presence of a gait deficit in this state (Hansen et al., 1997; Lieberman et al., 2005). Additionally, previous studies have shown that physical exercise has some beneficial effects on EPS induced by haloperidol in rats (Teixeira et al., 2011).

Given that APD induces PLS, generating important gait alterations that are not completely understood, and that physical exercise has a beneficial effect on EPS (Herman et al., 2008; Uitti, 2012), the main goals of this study were to improve the knowledge about the motor gait deficit induced by D2 blockers and to investigate the effects of physical exercise in PLS induced by haloperidol.

2. Materials and methods

2.1. Animals

For this study, 48 male Wistar rats, three months old and weighing 200–300 g were obtained from the Institute of Basic Health Sciences (ICBS) – UFRGS. They were maintained in a controlled environment and housed in groups of five with food and water ad libitum, in a 12:12 h dark:light schedule. The animals were allocated into four groups (twelve each): 1 – Saline and Sedentary (Control), 2 – Saline and

* Corresponding author at: Departamento de Ciências Morfofisiológicas, Faculdade de Biociências, PUCRS, Avenida Ipiranga, 6681, Prédio 12 Sala 144, CEP 90619-900, Porto Alegre, RS, Brazil. Tel.: +55 51 33203545.

E-mail address: pedropoa@gmail.com (P.P.A. Baptista).

- Artigo publicado no periódico Behavioural Brain Research em 2013.



Research report

Behavior outcome after ischemic and hemorrhagic stroke, with similar brain damage, in rats



Régis Gemerascas Mestriner^{a,b,c,d,*}, Patrícia Maidana Miguel^b,
 Pamela Brambilla Bagatini^d, Lisiani Saur^d, Lígia Simões Braga Boisserand^b,
 Pedro Porto Alegre Baptista^d, Léder Leal Xavier^d, Carlos Alexandre Netto^{a,b}

^a Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Fisiologia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre-RS, Brazil

^b Departamento de Bioquímica, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre-RS, Brazil

^c Faculdade de Enfermagem, Nutrição e Fisioterapia, Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul, Porto Alegre-RS, Brazil

^d Laboratório de Biologia Celular e Tecidual, Departamento de Ciências Morfofisiológicas, Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul, Porto Alegre-RS, Brazil

HIGHLIGHTS

- ▶ ET-1 and collagenase could produce comparable ischemic and hemorrhagic injuries.
- ▶ Ischemic and hemorrhagic rats showed similar spontaneous locomotor activity.
- ▶ Ischemic and hemorrhagic rats showed similar forelimb asymmetry profile.
- ▶ Hemorrhagic stroke showed better performance in skilled walking than ischemic form.

ARTICLE INFO

Article history:

Received 18 December 2012

Received in revised form 29 January 2013

Accepted 1 February 2013

Available online 10 February 2013

Key words:

Stroke

Endothelin-1

Collagenase type VI-S

Recovery

Stereology

Anymaze

ABSTRACT

Stroke causes disability and mortality worldwide and is divided into ischemic and hemorrhagic subtypes. Although clinical trials suggest distinct recovery profiles for ischemic and hemorrhagic events, this is not conclusive due to stroke heterogeneity. The aim of this study was to produce similar brain damage, using experimental models of ischemic (IS) and hemorrhagic (HS) stroke and evaluate the motor spontaneous recovery profile. We used 31 Wistar rats divided into the following groups: Sham ($n = 7$), ischemic (IS) ($n = 12$) or hemorrhagic (HS) ($n = 12$). Brain ischemia or hemorrhage was induced by endothelin-1 (ET-1) and collagenase type IV-S (collagenase) microinjections, respectively. All groups were evaluated in the open field, cylinder and ladder walk behavioral tests at distinct time points as from baseline to 30 days post-surgery (30 PS). Histological and morphometric analyses were used to assess the volume of lost tissue and lesion length. Present results reveal that both forms of experimental stroke had a comparable long-term pattern of damage, since no differences were found in volume of tissue lost or lesion size 30 days after surgery. However, behavioral data showed that hemorrhagic rats were less impaired at skilled walking than ischemic ones at 15 and 30 days post-surgery. We suggest that experimentally comparable stroke design is useful because it reduces heterogeneity and facilitates the assessment of neurobiological differences related to stroke subtypes; and that spontaneous skilled walking recovery differs between experimental ischemic and hemorrhagic insults.

© 2013 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

Stroke is an important public health problem and is broadly subdivided into ischemic and hemorrhagic subtypes [1]. Although considerable development has been made in acute stroke care, current data on functional recovery according to stroke subtypes are not conclusive [2]. Clinical observations have shown that the hemorrhagic form presents greater functional impairment than ischemic stroke at hospital admission, but shows greater functional improvement at discharge [3]. On the other hand, ischemic

* Corresponding author at: Faculdade de Enfermagem, Nutrição e Fisioterapia, Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul, Avenida Ipiranga, 6681, Prédio 12/8, (andar), Porto Alegre, RS, CEP: 90619-900, Brazil. Tel.: +55 51 33203646.

E-mail addresses: regis.mestriner@pucrs.br, regis.mestriner@gmail.com (R.G. Mestriner).

- Artigo publicado no periódico Brain Structure and Function em 2014.

Brain Struct Funct (2014) 219:293–302
DOI 10.1007/s00429-012-0500-8

ORIGINAL ARTICLE

Physical exercise increases GFAP expression and induces morphological changes in hippocampal astrocytes

Lisiani Saur · Pedro Porto Alegre Baptista · Priscylla Nunes de Senna · Mariana Fontoura Paim · Patricia do Nascimento · Jocemar Ilha · Pamela Brambilla Bagatini · Matilde Achaval · Léder Leal Xavier

Received: 6 August 2012 / Accepted: 20 December 2012 / Published online: 4 January 2013
© Springer-Verlag Berlin Heidelberg 2012

Abstract Physical exercise has an important influence on brain plasticity, which affects the neuron–glia interaction. Astrocytes are susceptible to plasticity, and induce and stabilize synapses, regulate the concentration of various molecules, and support neuronal energy metabolism. The aim of our study was to investigate whether physical exercise is capable of altering the morphology, density and expression of glial fibrillary acidic protein (GFAP) in astrocytes from the CA1 region of rat hippocampus. Thirteen male rats were divided in two groups: sedentary ($n = 6$) and exercise ($n = 7$). The animals in the exercise group were submitted to a protocol of daily physical exercise on a treadmill for four consecutive weeks. GFAP immunoreactivity was evaluated using optical densitometry and the morphological analyses were an adaptation of Sholl's concentric circles method. Our results show that physical exercise is capable of increasing the density of GFAP-positive astrocytes as well as the regional and cellular GFAP expression. In addition, physical exercise altered astrocytic morphology as shown by the increase

observed in the degree of ramification in the lateral quadrants and in the length of the longest astrocytic processes in the central quadrants. Our data demonstrate important changes in astrocytes promoted by physical exercise, supporting the idea that these cells are involved in regulating neural activity and plasticity.

Keywords Physical exercise · Astrocytes · GFAP · Hippocampus · Sholl

Introduction

There is a considerable evidence to show that physical exercise has a positive effect on brain function in both humans (Hillman et al. 2008; Laurin et al. 2001) and animals (Albeck et al. 2006; Farmer et al. 2004; Stranahan et al. 2010). Physical exercise improves cognitive functions (Kashihara et al. 2009; Kramer et al. 2006) and memory (Alaei et al. 2008; de Senna et al. 2011), reduces anxiety and depression (Martinsen 2008), and has protective properties on a wide variety of neurological diseases, such as Parkinson's disease (Smith and Zigmond 2003), Alzheimer's disease (Mirochnic et al. 2009) and ischemic stroke (Stummer et al. 1994).

Studies designed to shed light on the neurobiological bases of these benefits have demonstrated that physical exercise is involved in cerebral plasticity. Exercise can induce neurogenesis (Kim et al. 2003; van Praag et al. 1999a, b, 2005) and increase the release of neurotrophic factors such as: brain-derived neurotrophic factor (BDNF), nerve growth factor (NGF), fibroblast growth factor (FGF) and their mRNAs (Berchtold et al. 2010; Gómez-Pinilla et al. 1997; Neeper et al. 1996). Physical exercise can also induce long-term potentiation (LTP) (van Praag et al. 1999a)

L. Saur · P. P. A. Baptista · M. F. Paim · J. Ilha · L. L. Xavier (✉)
Departamento de Ciências Morfofisiológicas,
Laboratório de Biologia Celular e Tecidual,
Faculdade de Biociências, Pontifícia Universidade Católica
do Rio Grande do Sul (PUCRS), Avenida Ipiranga, 6681,
Prédio 12C, Sala 104, Porto Alegre, RS CEP 90619-900, Brazil
e-mail: llxavier@pucrs.br

P. N. de Senna · P. d. Nascimento · P. B. Bagatini · M. Achaval
Departamento de Ciências Morfológicas, Laboratório de
Histofisiologia Comparada, Instituto de Ciências Básicas da
Saúde, Universidade Federal do Rio Grande do Sul., Avenida
Sarmiento Leite, 500, Porto Alegre, RS 90040-060, Brazil

 Springer

- Artigo publicado no periódico Brain Research em 2014.

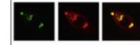


Available online at www.sciencedirect.com

ScienceDirect

www.elsevier.com/locate/brainres

Brain Research



Research Report

Resveratrol prevents akinesia and restores neuronal tyrosine hydroxylase immunoreactivity in the substantia nigra pars compacta of diabetic rats



Pamela Brambilla Bagatini^{a,b}, Léder Leal Xavier^c, Laura Tartari Neves^c, Lisiani Saur^c, Sílvia Barbosa^a, Pedro Porto Alegre Baptista^c, Otávio Américo Augustin^a, Priscylla Nunes de Senna^{a,b}, Régis Gemerasca Mestriner^c, André Arigony Souto^d, Matilde Achaval^{a,b,*}

^aLaboratório de Histofisiologia Comparada, Departamento de Ciências Morfológicas, Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Avenida Sarmento Leite, 500, 90040-060 Porto Alegre, RS, Brazil

^bPrograma de Pós-Graduação em Neurociências, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Avenida Sarmento Leite, 500, 90040-060 Porto Alegre, RS, Brazil

^cLaboratório de Biologia Celular e Tecidual, Departamento de Ciências Morfofisiológicas, Faculdade de Biociências, Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul, Avenida Ipiranga, 6681, 90619-900 Porto Alegre, RS, Brazil

^dLaboratório de Química de Produtos Naturais, Departamento de Química Pura, Faculdade de Química, Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul, Avenida Ipiranga, 6681, 90619-900 Porto Alegre, RS, Brazil

ARTICLE INFO

Article history:

Accepted 5 October 2014

Available online 22 October 2014

Keywords:

Diabetes

Resveratrol

Akinesia

Immunoreactivity

Tyrosine hydroxylase

Substantia nigra pars compacta

ABSTRACT

This study evaluated the effects of resveratrol on locomotor behaviors, neuronal and glial densities, and tyrosine hydroxylase immunoreactivity in the substantia nigra pars compacta of rats with streptozotocin-induced diabetes. Animals were divided into four groups: non-diabetic rats treated with saline (SAL), non-diabetic rats treated with resveratrol (RSV), diabetic rats treated with saline (DM) and diabetic rats treated with resveratrol (DM+RSV). The animals received oral gavage with resveratrol (20 mg/kg) for 35 days. The open field test and the bar test were performed to evaluate bradykinesia and akinesia, respectively. The Nissl-stained neuronal and glial densities and the dopaminergic neuronal density were estimated using planar morphometry. Tyrosine hydroxylase immunoreactivity was evaluated using regional and cellular optical densitometry. In relation to the locomotor behaviors, it was observed that the DM group developed akinesia, which was attenuated by resveratrol in the DM+RSV group, while the DM and DM+RSV groups showed bradykinesia. Our main morpho-physiological results demonstrated: a decrease in the cellular tyrosine hydroxylase immunoreactivity in the DM group, which was attenuated by resveratrol in

*Corresponding author at: Laboratório de Histofisiologia Comparada, Departamento de Ciências Morfológicas, Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), Avenida Sarmento Leite 500, Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Sala 312, CEP 90050-170, Porto Alegre, RS, Brazil.

E-mail addresses: pamela.bagatini@yahoo.com.br (P.B. Bagatini), llxavier@puccs.br (L.L. Xavier), laura.tartari@hotmail.com (L.T. Neves), lisi_saur@yahoo.com.br (L. Saur), slgentil@hotmail.com (S. Barbosa), pedropoa@gmail.com (P.P.A. Baptista), otavio_aa@yahoo.com.br (O.A. Augustin), priscyllasenna@hotmail.com (P.N. de Senna), regis.mestriner@puccs.br (R.G. Mestriner), arigony@puccs.br (A.A. Souto), machaval@pq.cnpq.br (M. Achaval).

<http://dx.doi.org/10.1016/j.brainres.2014.10.007>

0006-8993/© 2014 Elsevier B.V. All rights reserved.

- Artigo publicado no periódico Behavioural Brain Research em 2015.



Short communication

Astrocyte morphology after ischemic and hemorrhagic experimental stroke has no influence on the different recovery patterns



Régis Gemerasca Mestriner^{a,b,c,d,*}, Lisiani Saur^d, Pamela Brambilla Bagatini^d,
Pedro Porto Alegre Baptista^d, Sabrina Pereira Vaz^{c,d}, Kelly Ferreira^{c,d},
Susane Alves Machado^{c,d}, Léder Leal Xavier^d, Carlos Alexandre Netto^{a,b}

^a Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Fisiologia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brazil

^b Departamento de Bioquímica, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brazil

^c Faculdade de Enfermagem, Nutrição e Fisioterapia, Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brazil

^d Laboratório de Biologia Celular e Tecidual, Departamento de Ciências Morfofisiológicas, Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brazil

HIGHLIGHTS

- Long-term astrocyte morphology has no influence on the different recovery patterns of stroke.
- Ischemic and hemorrhagic stroke subtypes have similar long-term astrocyte morphology in perilesional sensorimotor cortex and dorsolateral striatum.
- Long-term GFAP immunoreactivity profile is similar between ischemic and hemorrhagic stroke.

ARTICLE INFO

Article history:

Received 26 July 2014

Received in revised form

29 September 2014

Accepted 2 October 2014

Available online 12 October 2014

Keywords:

Ischemic stroke

Hemorrhagic stroke

Glial fibrillary acidic protein

Astrocytes

Reactive astrogliosis

ABSTRACT

Stroke, broadly subdivided into ischemic and hemorrhagic subtypes, is a serious health-care problem worldwide. Previous studies have suggested ischemic and hemorrhagic stroke could present different functional recovery patterns. However, little attention has been given to this neurobiological finding. Coincidentally, astrocyte morphology could be related to improved sensorimotor recovery after skilled reaching training and modulated by physical exercise and environmental enrichment. Therefore, it is possible that astrocyte morphology might be linked to differential recovery patterns between ischemic and hemorrhagic stroke. Thus, we decided to compare long-term GFAP-positive astrocyte morphology after ischemic (IS, $n = 5$), hemorrhagic (HS, $n = 5$) and sham (S, $n = 5$) stroke groups (induced by endothelin-1, collagenase type IV-S and saline, respectively). Our results showed ischemic and hemorrhagic stroke subtypes induced similar long-term GFAP-positive astrocyte plasticity ($P > 0.05$) for all evaluated measures (regional and cellular optical density; astrocytic primary processes ramification and length; density of GFAP positive astrocytes) in perilesional sensorimotor cortex and striatum. These interesting negative results discourage similar studies focused on long-term plasticity of GFAP-positive astrocyte morphology and recovery comparison of stroke subtypes.

© 2014 Elsevier B.V. All rights reserved.

Stroke, broadly subdivided into ischemic and hemorrhagic subtypes, is a serious health-care problem worldwide [1]. Some clinical studies have shown that by the time of hospital discharge hemorrhagic stroke presents a better functional improvement compared to ischemic stroke [2]. Moreover, ischemic stroke patients showed

a longer functional recovery time window than those with the hemorrhagic etiology [3]. Yet, these recovery differences are not completely understood due to stroke heterogeneity [4]. Animal models aid researchers to control some factors and provide an unbiased analysis of stroke subtypes. We have recently published a study, using two controlled lesion "site and size" rat models, showing the spontaneous recovery pattern is better in hemorrhagic than in ischemic stroke [5]. Unfortunately, the neurobiological explanations for this finding remain poorly understood.

Coincidentally, our research group has also shown astrocyte morphology could be related to improved sensorimotor recovery after a rehabilitation protocol [6] and modulated by physical

* Corresponding author at: Faculdade de Enfermagem, Nutrição e Fisioterapia, Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul, Avenida Ipiranga, 6681, Prédio 12/8º andar, Porto Alegre CEP 90619-900, RS, Brazil. Tel.: +55 51 33203646; fax: +55 51 33203646.

E-mail address: regis.mestriner@pucrs.br (R.G. Mestriner).

<http://dx.doi.org/10.1016/j.bbr.2014.10.005>

0166-4328/© 2014 Elsevier B.V. All rights reserved.

ANEXO B – Ofício da Comissão de Ética para Uso de Animais (CEUA)



Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

Ofício 099/12 – CEUA


Porto Alegre, 02 de agosto de 2012.

Senhor Pesquisador:

A Comissão de Ética no Uso de Animais da PUCRS apreciou e aprovou seu Protocolo de Pesquisa, registro CEUA 12/00297, **“Efeitos da administração farmacológica de quetamina no tratamento da depressão experimental: Aspectos neurovasculares e comportamentais”**.

Sua investigação está autorizada a partir da presente data.

Atenciosamente,


Profa. Dra. Anamaria Gonçalves Feijó
Coordenadora da CEUA/PUCRS

Ilmo. Sr.
Prof. Leder Leal Xavier
FABIO
Nesta Universidade

PUCRS

Campus Central
Av. Ipiranga, 6690 – Prédio 60, sala 314
CEP: 90610-000
Fone/Fax: (51) 3320-3345
E-mail: ceua@pucrs.br



Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
COMITÊ DE ÉTICA PARA O USO DE ANIMAIS

AVALIAÇÃO DE PROJETOS DE PESQUISA

TÍTULO DO PROJETO
Efeitos da administração farmacológica de quetamina no tratamento da depressão experimental: Aspectos neurovasculares e comportamentais
Projeto nº 12/00297
Pesquisador: Leder Leal Xavier
AVALIAÇÃO GERAL DO PROJETO
<input type="checkbox"/> Aprovado <input checked="" type="checkbox"/> Aprovado com recomendação <input type="checkbox"/> Pendente <input type="checkbox"/> Não aprovado
Questões levantadas pelo CEUA – PUCRS
<p>Prezado Pesquisador,</p> <p>Gostaria de ressaltar o cuidado metodológico apresentado principalmente ao que concerne ao cuidado com o manejo dos animais envolvidos.</p> <p>Sem mais para o momento</p>



Campus Central
Av. Ipiranga, 6690 – Prédio 60, sala 314
CEP: 90610-000
Fone/Fax: (51) 3320-3345
E-mail: ceua@pucrs.br