

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PELOTAS
Centro de Ciências Químicas, Farmacêuticas e de Alimentos
Programa de Pós-Graduação em Bioquímica e Bioprospecção



Dissertação de mestrado

**Ação do tipo-antidepressiva do sulfeto de [(4-terc-butilciclohexilideno) metil]
(4-metoxiestiril) em camundongos: Envolvimento dos sistemas
serotoninérgico e nitrérgico**

Renata Leivas de Oliveira

Pelotas, 2019

Renata Leivas de Oliveira

**Ação do tipo-antidepressiva do sulfeto de [(4-terc-butilciclohexilideno) metil]
(4-metoxiestiril) em camundongos: Envolvimento dos sistemas
serotoninérgico e nitrérgico**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Bioquímica e Bioprospecção, da Universidade Federal de Pelotas, como requisito parcial para a obtenção do grau de Mestre em Bioquímica e Bioprospecção.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Cristiane Luchese

Coorientadora: Prof^a. Dr^a. Ethel Antunes Wilhelm

Pelotas, 2019

Renata Leivas de Oliveira

Ação do tipo-antidepressiva do sulfeto de [(4-terc-butilciclohexilideno) metil] (4-metoxiestiril) em camundongos: Envolvimento dos sistemas serotoninérgico e nitrérgico

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Bioquímica e Bioprospecção, da Universidade Federal de Pelotas, como requisito parcial para a obtenção do grau de Mestre em Bioquímica e Bioprospecção.

Universidade Federal de Pelotas / Sistema de Bibliotecas
Catalogação na Publicação

L525a Leivas, Renata

Ação do tipo-antidepressiva do sulfeto de [(4-terc-butilciclohexilideno) metil] (4-metoxiestiril) em camundongos : envolvimento dos sistemas serotoninérgico e nitrérgico / Renata Leivas ; Cristiane Luchese, orientadora ; Ethel Antunes Wilhelm, coorientador. — Pelotas, 2019.

77 f. : il.

Dissertação (Mestrado) — Programa de Pós-Graduação em Bioquímica e Bioprospecção, Centro de Ciências Químicas, Farmacêuticas e de Alimentos, Universidade Federal de Pelotas, 2019.

1. Enxofre. 2. Depressão. 3. Serotonina. 4. Óxido nítrico. 5. Monoamina oxidase. I. Luchese, Cristiane, orient. II. Wilhelm, Ethel Antunes, coorient. III. Título.

CDD : 574.192

Elaborada por Dafne Silva de Freitas CRB: 10/2175

Renata Leivas de Oliveira

Ação do tipo-antidepressiva do sulfeto de [(4-terc-butilciclohexilideno) metil] (4-metoxiestiril) em camundongos: Envolvimento dos sistemas serotoninérgico e nitrérgico

Dissertação aprovada, como requisito parcial, para obtenção do grau de mestre em Bioquímica e Bioprospecção, Programa de Pós-Graduação em Bioquímica e Bioprospecção, Centro de Ciências Químicas, Farmacêuticas e de Alimentos, Universidade Federal de Pelotas.

Data da Defesa: 05/08/2019

Banca examinadora:

.....
Prof^a. Dr^a. Cristiane Luchese (Orientadora)
Doutora em Ciências Biológicas (Bioquímica Toxicológica) pela Universidade Federal de Santa Maria, UFSM, Brasil.

.....
Prof^a. Dr^a. Lucielli Savegnago
Doutora em Ciências Biológicas (Bioquímica Toxicológica) pela Universidade Federal de Santa Maria, UFSM, Brasil.

.....
Prof^a. Dr^a. Ana Paula Pesarico
Doutora em Ciências Biológicas (Bioquímica Toxicológica) pela Universidade Federal de Santa Maria, UFSM, Brasil.

*Dedico esta dissertação as minhas famílias e
ao meu amor Guilherme ♡*

AGRADECIMENTOS

Primeiramente, gostaria de agradecer a Deus por me guiar, me iluminar, me dar tranquilidade e colocar pessoas tão especiais ao meu lado, para que eu pudesse seguir em frente com os meus objetivos e não desanimar com as dificuldades.

A meus padrinhos, Fernanda e Edemilton e ao meu irmão Pedro, meu infinito agradecimento, por sempre acreditaram em minha capacidade e nunca me deixarem desistir. Vocês sempre souberam me dizer as palavras certas nos momentos em que eu precisava de motivação. Obrigada pelo amor incondicional!

A meu amor, Guilherme, por ser tão importante na minha vida e por estar sempre a meu lado me incentivando. Devido a seu companheirismo, amizade, compreensão, apoio, alegria e amor, esta etapa pode ser concluída com maior tranquilidade. Obrigada por estar sempre ao meu lado compartilhando nossos sonhos e correndo atrás dos nossos objetivos.

Aos meus sogros, Rosi e Beto, por todo incentivo, amor, cuidado e por não medirem esforços para nos ajudar. Vocês são grandes exemplos para nós!

Às minhas orientadoras, Cristiane e Ethel, por estarem sempre disponíveis para me auxiliar neste trabalho, me ensinando, me incentivando e me guiando para que eu pudesse chegar até aqui. Obrigada por todo carinho e orientações. Vocês foram essenciais na minha trajetória até aqui.

A todos os meus colegas do LaFarBio, que de alguma forma contribuíram para a realização deste trabalho. Em especial a Mikaela (minha amiga de longa data), a Karline, a Ane, a Jaini e a Caren aos quais eu considero mais que colegas. Obrigada por dividir comigo as angústias, as alegrias e ouvirem minhas bobagens diárias. Foi bom poder dividir tantos momentos e contar com vocês!

A todos os professores do Programa de Pós-Graduação em Bioquímica e Bioprospecção, e também à Universidade Federal de Pelotas.

À CAPES pelo auxílio financeiro no decorrer do trabalho.

Enfim agradeço, a todos que de uma forma ou de outra colaboraram para a realização deste trabalho.

“Sem sonhos, a vida não tem brilho. Sem metas, os sonhos não têm alicerces. Sem prioridades, os sonhos não se tornam reais. Sonhe, trace metas, estabeleça prioridades e corra riscos para executar seus sonhos. Melhor é errar por tentar do que errar por omitir. ”

(Augusto Cury)

RESUMO

DE OLIVEIRA, Renata Leivas. **[(4-tert-butylcyclohexylidene) methyl] (4-methoxystyryl) sulfide antidepressant action in mice: Involvement of the serotonergic and nitrergic systems.** 2019. 77f. Dissertação (Mestrado em Bioquímica e Bioprospecção) - Programa de Pós-Graduação em Bioquímica e Bioprospecção, Centro de Ciências Químicas, Farmacêuticas e de Alimentos, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, 2019.

A depressão é considerada um dos mais prevalentes transtornos psiquiátricos, responsável por causar um grande impacto negativo na qualidade de vida dos seus portadores. A busca por novos agentes antidepressivos tem se intensificado, tendo em vista que os tratamentos atuais mostram algumas limitações no que diz respeito ao seu efeito terapêutico. Os compostos organocalcogênicos são considerados uma importante classe de moléculas com diversos efeitos terapêuticos em modelos animais, entre essas moléculas se destaca o sulfeto de [(4-terc-butilciclohexilideno) metil] (4-metoxiestiril) (BMMS), no qual em estudos anteriores demonstrou diversas atividades farmacológicas. Em vista disto, o presente estudo investigou o possível efeito do tipo antidepressivo do BMMS usando o teste do nado forçado (TNF) e o teste da suspensão da cauda (TSC) em camundongos Swiss. O envolvimento dos sistemas serotoninérgico, glutamatérgico e nitrérgico na atividade do tipo antidepressiva do BMMS foram avaliadas. Além disso, também foi examinado o envolvimento das atividades das enzimas monoamina oxidase (MAO)-A, MAO-B e Na^+/K^+ -ATPase no córtex pré-frontal na ação tipo antidepressiva do BMMS em camundongos. O BMMS (0,1-10 mg/kg, administrado por via intragástrica (i.g.)) e a fluoxetina (32 mg/kg, i.g.) diminuíram o tempo de imobilidade no TNF e TSC. O efeito anti-imobilidade do BMMS (10 mg/kg, i.g.) no TSC foi completamente prevenido pelo pré-tratamento dos camundongos com o WAY100635 (0,1 mg/kg, por via subcutânea (s.c.)), um antagonista do receptor 5-HT_{1A}), cetanserina (5 mg/kg, intraperitoneal (i.p.)), um antagonista do receptor $5\text{-HT}_{2A/2C}$) e parcialmente evitado pelo ondansetron (1 mg/kg, i.p., um antagonista do receptor 5-HT_3). O efeito anti-imobilidade do BMMS não foi alterado pelo pré-tratamento com o MK-801 (0,01 mg/kg, s.c. um antagonista não-competitivo do receptor N-metil D-Aspartato (NMDA)) no TSC. O pré-tratamento com L-arginina (500 mg/kg, i.p., um precursor de óxido nítrico) evitou parcialmente a redução no tempo de imobilidade induzida pelo BMMS no TSC. O BMMS alterou as atividades das enzimas Na^+/K^+ -ATPase e MAO-A no córtex pré-frontal de camundongos, mas não foi capaz de alterar a atividade da MAO-B. Em conclusão, o BMMS exerceu um efeito do tipo antidepressivo em camundongos com envolvimento dos sistemas serotoninérgico e nitrérgico. Além disso, a inibição seletiva da atividade da MAO-A e o aumento da atividade da Na^+/K^+ -ATPase também estão envolvidos no efeito do tipo antidepressivo do BMMS. Frente a isto, nossos resultados demonstram que o BMMS é um composto multi-alvo, porém mais estudos são necessários para elucidar os outros mecanismos de ação e a contribuição de outros sistemas de neurotransmissão para a ação antidepressiva do BMMS.

Palavras-chave: enxofre, depressão, serotonina, óxido nítrico, monoamina oxidase.

ABSTRACT

DE OLIVEIRA, Renata Leivas. **Study of the mechanisms involved in antidepressant-like action of [(4-*tert*-butylcyclohexylidene) methyl] (4-methoxystyryl) sulfide in mice.** 2019. 77f. Dissertation (Master in Biochemistry and Bioprospecting) - Biochemistry and Bioprospecting Postgraduate Program. Federal University of Pelotas, Pelotas.

Depression is considered one of the most prevalent psychiatric disorders, causing a major negative impact on the quality of life of their patients. The search for new antidepressant agents has intensified, given that current treatments show some limitations regarding their therapeutic effect. Organocalcogen compounds are considered an important class of molecules with various therapeutic effects in animal models, among them the stands out are ((4-*tert*-butylcyclohexylidene) methyl) (4-methoxystyryl) sulfide (BMMS), in which in previous studies demonstrated several pharmacological activities. In view of this, the present study investigated a possible antidepressant-like effect of ((4-*tert*-butylcyclohexylidene) methyl) (4-methoxystyryl) sulfide (BMMS) using the forced swimming test (FST) and the tail suspension test (TST) in male Swiss mice. The contribution of serotonergic, glutamatergic and nitrgergic systems in the antidepressant-like effect of BMMS was evaluated. We also examined the involvement of monoamine oxidase (MAO)-A, MAO-B and Na⁺/K⁺-ATPase activities in prefrontal cortex of mice. BMMS (0.1-10 mg/kg, intragastrically (i.g.)) and fluoxetine (32 mg/kg, i.g.) decreased the immobility time in the FST and TST. The anti-immobility effect of BMMS (10 mg/kg, i.g.) in the TST was completely prevented by the pretreatment with WAY100635 (0.1 mg/kg, subcutaneously (s.c.), a 5-HT_{1A} receptor antagonist), ketanserin (5 mg/kg, intraperitoneal (i.p.), a 5-HT_{2A/2C} receptor antagonist), and partially blocked by ondansetron (1 mg/kg, i.p., a 5-HT₃ receptor antagonist). The anti-immobility effect of BMMS was not avoided by pretreatment with MK-801 (0.01 mg/kg, s.c. a N-methyl D-Aspartate (NMDA) receptor non-competitive antagonist) in the TST. Pretreatment with L-arginine (500 mg/kg, i.p., a nitric oxide precursor) reversed partially the reduction in the immobility time elicited by BMMS in TST. BMMS altered Na⁺/K⁺-ATPase and MAO-A activities in prefrontal cortex of mice, but was not able to change the MAO-B activity. In conclusion, BMMS exerted an antidepressant-like effect in mice and serotonergic and nitrgergic systems are involved in the antidepressant-like action of compound. In addition, selective inhibition in MAO-A activity and the increase in Na⁺/K⁺-ATPase activity are involved in the antidepressant-like effect of BMMS. Our results inferred that BMMS is a multi-target compound, but further studies are needed to elucidate the other mechanisms of action and the contribution of other neurotransmission systems to antidepressant-like action of BMMS.

Keywords: sulfur, depression, serotonin, nitric oxide, monoamine oxidase.

Lista de Figuras

Revisão Bibliográfica

Figura 1	Hipótese monoaminérgica da depressão.....	22
Figura 2	Mecanismo envolvido no aumento de monoaminas.....	23
Figura 3	Sinapse serotoninérgica.....	25
Figura 4	Síntese e alvos moleculares do óxido nítrico	30
Figura 5	Metabolismo de monoaminas.....	31
Figura 6	Mecanismo de neurotoxicidade induzido pelo H ₂ O ₂	32
Figura 7	Mecanismo de troca iônica da Na ⁺ /K ⁺ -ATPase.....	34
Figura 8	Estruturas químicas	39
Figura 9	Representação gráfica dos resultados obtidos neste estudo...	52

Artigo Científico

Figura 1	Chemical structure of ((4- <i>tert</i> -butylcyclohexylidene) methyl) (4-methoxystyryl) sulfide (BMMS)	42
Figura 2	Effect of ((4- <i>tert</i> -butylcyclohexylidene) methyl) (4-methoxystyryl) (BMMS) (0.1-10 mg/kg) and fluoxetine (Fluox) (32 mg/kg) in the immobility time in the FST (a) and TST (b) in mice	44
Figura 3	Effect of WAY100635 (0.1 mg/kg, s.c.) (a), ketanserin (5 mg/kg, i.p.) (b) and ondansetron (1 mg/kg, i.p.) (c) in mice in the TST.....	46
Figura 4	Effect of MK-801 (0.01 mg/kg, i.p.) in mice in the TST.....	47
Figura 5	Effect of L-arginine (500 mg/kg, i.p.) in mice in the TST.....	47
Figura 6	Effect of ((4- <i>tert</i> -butylcyclohexylidene) methyl) (4-methoxystyryl) (BMMS) on monoamine oxidase (MAO)-A (a) and MAO-B (b) activities, in the prefrontal cortex in mice.....	48
Figura 7	Effect of ((4- <i>tert</i> -butylcyclohexylidene) methyl) (4-methoxystyryl) (BMMS) on Na ⁺ /K ⁺ -ATPase activities, in the prefrontal cortex in mice.....	49
Figura 8	Summary of action mechanism in the antidepressant-like effect of ((4- <i>tert</i> -butylcyclohexylidene) methyl) (4-methoxystyryl) sulfide (BMMS).....	49

Lista de Tabelas

Revisão Bibliográfica

Tabela 1	Critérios diagnósticos para quadros de depressão segundo o DSM-IV	1
-----------------	---	---

Artigo Científico

Table 1	Effect of fluoxetine, BMMS administration and its combined treatment with serotonin antagonists, NMDA antagonist or NO precursor on spontaneous locomotor and exploratory activities in mice	4
----------------	--	---

Lista de Abreviaturas e Siglas

BMMS	Sulfeto de [(4-terc-butilciclohexilideno) metil] (4-metoxiestiril)
OMS	Organização Mundial da Saúde
SNC	Sistema Nervoso Central
TNF	Teste do nado forçado
TSC	Teste da suspensão da cauda
MAO	Monoamino Oxidase
5-HT	Serotonina
NE	Norepinefrina
DA	Dopamina
NA	Noradrenalina
NMDA	N-metil D-aspartato
AMPA	Ácido α -amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazolepropiónico
TDM	Transtorno depressivo maior
NO	Óxido nítrico - do inglês <i>Nitric Oxide</i>
SERT	Transportador de serotonina
NOS	Oxido nítrico sintase - do inglês <i>Nitric Oxide Synthase</i>
FAD	Dinucleotídeo de flavina adenina – do inglês <i>Flavin Adenine Dinucleotide</i>
ATP	Adenina Trifosfato - do inglês <i>adenosine triphosphate</i>
H₂O₂	Peróxido de Hidrogênio
Ca²⁺	Cálcio
Fe²⁺	Ferro
iNOS	Óxido nítrico sintase induzível - do inglês <i>Inducible Nitric Oxide Synthase</i>
nNOS	Óxido nítrico sintase neuronal - do inglês <i>Neuronal Nitric Oxide Synthase</i>

eNOS	Óxido nítrico sintase endotelial - do inglês <i>Endothelial Nitric Oxide Synthase</i>
GSSH	Glutathiona oxidada
GSH	Glutathiona reduzida
GCs	Guanilato ciclase solúvel
O₂	Oxigênio
H₂O	Água
GTP	Guanosina 5'-trifosfato
GMPc	Guanosina 3',5'-monofosfato cíclico
OH[•]	Hidroxila
K⁺	Potássio
Na⁺	Sódio
SO₂	Dióxido de enxofre
SO₃	Trióxido de enxofre
H₂SO₄	Ácido sulfúrico
CCl₄	Tetracloroeto de carbono
GPx	Glutathiona Peroxidase
ADH	Aldeído desidrogenasse
ATCs	Antidepressivos tricíclicos
iMAOs	Inibidores da Monoamino Oxidase
ISRSs	Inibidores seletivo da receptação de serotonina
IL	Interleucina
HPA	Eixo hipotálamo-pituitária-adrenal

Sumário

1. Introdução	15
2. Objetivos	17
Objetivo geral	17
Objetivos específicos	17
3. Revisão bibliográfica.....	18
Depressão.....	18
Fisiopatologia da depressão	19
3.1.2 Teorias da depressão	21
Mecanismos envolvidas na fisiopatologia da depressão.....	24
Sistema serotoninérgico	24
Sistema Glutamatérgico	27
Sistema nitrérgico	29
Monoamina oxidase (MAO)	31
Na ⁺ /K ⁺ -ATPase	33
Fármacos empregados no tratamento da depressão	34
3.3.1 Efeito Farmacológico dos Compostos Orgânicos de Enxofre.....	37
4. Artigo científico	40
5. Conclusões	52
Perspectivas	53
Referências	54
Anexos	73

1. Introdução

A depressão é um transtorno psiquiátrico crônico, multifatorial e incapacitante, caracterizado por diversos sintomas, como humor baixo ou deprimido, anedonia e baixa energia ou fadiga. Outros sintomas emocionais e físicos também estão presentes com frequência, como distúrbios do sono e psicomotores, sentimento de culpa, dificuldade de concentração, baixa autoestima, tendências suicidas, além de distúrbios autonômicos (MCKENNA et al., 2015). Este distúrbio afeta até 20% da população e segundo a Organização Mundial da Saúde (OMS) (2018) esta é considerada a quarta principal causa de incapacidade em todo o mundo, no qual 300 milhões de pessoas sofrem com esse transtorno, demonstrando o grande impacto desta doença na sociedade moderna.

Este transtorno é considerado um fenômeno complexo e heterogêneo, que possui muitos subtipos e, provavelmente, mais de uma etiologia. Desta forma, os aspectos fisiopatológicos dos transtornos depressivos ainda não são totalmente compreendidos. A hipótese mais aceita para explicar a fisiopatologia da depressão é a monoaminérgica, na qual postula que há anormalidades nos neurotransmissores monoaminérgicos, como a serotonina (5-HT), norepinefrina (NE) e/ou dopamina (DA), os quais desempenham importante papel na depressão (MENARD et al., 2015; FINBERG; RABEY, 2016). Além disso, evidências também indicam que as vias glutamatérgica e nitrérgica estão implicadas na patogênese dos transtornos depressivos (SANACORA et al., 2008).

Existem vários tratamentos e novos esquemas terapêuticos disponíveis para os transtornos depressivos. No entanto, esses tratamentos têm limitações significativas, como baixas taxas de resposta, resistência ao tratamento, alta incidência de recidiva e um intervalo de tempo de semanas a meses para uma resposta (TRIVEDI et al., 2006). Nesse contexto, há uma grande necessidade não atendida de antidepressivos mais eficazes e de ação mais rápida.

A busca por novos agentes antidepressivos se intensificou nos últimos anos (ANACKER et al., 2011; HAMON; BLIER, 2013; ANISMAN et al., 2018; JESUOLA et al., 2018). Entre os compostos estudados podemos destacar os compostos de enxofre os quais se comportaram tão bem quanto os

antidepressivos convencionais em estudos de depressão (PARCELL, 2002). Anteriormente, o nosso grupo de pesquisa estudou diferentes propriedades farmacológicas de um composto organosulfurado, o (4-terc-butilciclohexilideno) metil) (4-metoxiestiril) sulfeto (BMMS). Este composto mostrou atividade antioxidante contra o estresse oxidativo em um modelo *in vivo* induzido por nitroprussiato de sódio no cérebro de camundongos e não afetou os parâmetros bioquímicos descartando a toxicidade renal e hepática do composto (IANISKI et al., 2014). Posteriormente, outro estudo revelou que uma classe de compostos organosulfurados, incluindo o BMMS apresentaram efeito antioxidante *in vitro*, além das atividades antinociceptivas e antiedematogênicas em um estudo *in vivo* (IANISKI et al., 2017).

Em vista do nosso interesse em procurar novas alternativas de tratamento para a depressão, bem como na investigação das propriedades farmacológicas de compostos orgânocalcogênios torna-se importante o estudo do efeito tipo antidepressivo do BMMS e os possíveis mecanismos envolvidos no efeito deste composto.

2. Objetivos

Objetivo geral

Investigar o efeito do tipo antidepressivo do composto BMMS em camundongos e estudar os mecanismos envolvidos na ação do composto

Objetivos específicos

- Verificar o efeito do tipo antidepressivo do composto BMMS em camundongos.
- Avaliar a atividade locomotora e exploratória nos camundongos tratados com BMMS.
- Investigar o envolvimento do sistema serotoninérgico no mecanismo de ação do tipo antidepressivo causada pelo BMMS via receptores 5-HT_{1A}, 5-HT_{2A/2C} e 5-HT₃.
- Evidenciar a participação do receptor N-metil D-Aspartato (NMDA) no efeito do tipo antidepressivo do BMMS.
- Avaliar o envolvimento do sistema nitrérgico através da via L-arginina-óxido nítrico (NO) no mecanismo de ação do tipo antidepressivo causada pelo BMMS.
- Verificar o envolvimento da atividade da enzima Na⁺/K⁺-ATPase no córtex pré-frontal dos camundongos.
- Estudar o envolvimento da enzima monoamina oxidase (MAO) no efeito farmacológico do BMMS no córtex pré-frontal dos camundongos.

3. Revisão bibliográfica

Depressão

A depressão é considerada um transtorno psiquiátrico incapacitante, associado frequentemente à alta morbidade e mortalidade em todo o mundo (MCKENNA et al., 2015), no qual caracteriza-se por sintomas de domínios emocionais, motivacionais, cognitivos e fisiológicos (ANISMAM et al., 2018). Esta doença apresenta altos índices de cronicidade, recaída e recorrência, prejuízos físicos e psicossociais, além de afetar negativamente na qualidade de vida do seu portador, estando associada com um alto índice de suicídio (NEMEROFF; OWENS, 2002; NESTLER et al., 2002).

Este transtorno pode ser classificado de acordo com os seus sintomas, como depressão unipolar ou bipolar (CARLSON; KASHANI, 2002), sendo que a primeira se caracteriza por um estado contínuo ou periódico de depressão e a segunda caracteriza-se por longos períodos de depressão intercalados com episódios de euforia. Desta forma, segundo Maurya e colaboradores (2016), a depressão unipolar é conhecida como síndrome clínica e comportamental chamada de Transtorno Depressivo Maior (TDM).

Segundo a *American Psychiatry Association* (2017) a depressão afeta uma em cada seis pessoas (16,6%) em algum momento da sua vida, podendo acontecer a qualquer momento, mas, a sua prevalência é em média entre a adolescência e os 20 anos de idade. Ainda, os sintomas de depressão podem variar de leves a graves e podem incluir alterações somáticas e cognitivas (BLACKBURN-MUNRO; BLACKBURN-MUNRO, 2001).

A quarta edição do Manual Diagnóstico e Estatístico de Transtornos Mentais (DSM-IV), descreve critérios para estabelecer um diagnóstico de depressão (Tabela 1). Para o paciente receber o diagnóstico de um episódio depressivo é necessária a constatação de no mínimo cinco entre os sintomas citados na tabela 1, sendo um deles obrigatoriamente humor deprimido ou anedonia, presentes na maior parte do tempo, com uma duração mínima de duas semanas. Ainda, a severidade da doença é julgada como leve, moderada ou grave com base no grau de prejuízo ocupacional e social (AMERICAN PSYCHIATRY ASSOCIATION, 2017). Tais sintomas implicam em um impacto

negativo na qualidade de vida relacionada com a saúde e de maneira geral, em maior grau do que em doenças crônicas como a hipertensão e a diabetes (VAN DER FELTZ-CORNELIS et al., 2010; ALMAS et al., 2014). Destaca-se ainda, que muitas vezes a depressão pode ser acompanhada por sintomas de ansiedade (WHO, 2012).

Tabela 1. Critérios para o diagnóstico da depressão segundo o DSM-IV.

Critérios diagnósticos de depressão
1. Humor deprimido;
2. Anedonia (perda de interesse ou satisfação em todas as atividades diárias);
3. Perda ou ganho de peso ou apetite;
4. Insônia ou hipersonia;
5. Retardo ou agitação psicomotora;
6. Fadiga ou perda de energia;
7. Sentimentos de desvalia ou culpa;
8. Redução de concentração;
9. Pensamentos recorrentes de morte ou suicídio.

Fonte: Adaptado de DSM-IV

As causas da depressão ainda não estão completamente elucidadas. Vários são os fatores que podem predispor um indivíduo ao desenvolvimento de depressão tais como: fatores genéticos, fisiológicos, bioquímicos, morfológicos, socioeconômicos e ambientais. Além disto, o estresse crônico, definido como um excesso de eventos negativos por um período de tempo maior de seis meses pode gerar um quadro de depressão, ocasionando alterações neuroquímicas e morfológicas que contribuem para o risco da doença (NESTLER et al., 2002). Frente a isto, a depressão não deve ser considerada uma doença única, com apenas uma causa, e sim como uma síndrome heterogênea composta de inúmeros fatores causadores e de fisiopatologia distintas.

Fisiopatologia da depressão

Apesar de sua alta prevalência e do impacto causado na vida do paciente depressivo, a fisiopatologia da depressão ainda não está completamente compreendida. Sabe-se apenas que vários são os fatores que podem predispor um indivíduo ao desenvolvimento de depressão. Entre os fatores que parecem

estar envolvidos na fisiopatologia da depressão, destaca-se a deficiência de monoaminas, o estresse oxidativo, a neuroinflamação, a ativação do sistema imunológico e disfunções endócrinas (BELVEDERI MURRI et al., 2013; JESULOLA et al., 2018; SHARIQ et al., 2018).

Dentre estas hipóteses destaca-se a monoaminérgica, a qual postula que há uma deficiência na transmissão de monoaminas (mais especificamente 5-HT) na fenda sináptica de pacientes deprimidos (BELMAKER; AGAM, 2008; KISS, 2008). Esta hipótese é confirmada pelo fato de que a maioria dos antidepressivos usados para tratar a depressão aumenta os níveis de monoaminas no encéfalo, diminuindo os sintomas depressivos (MALHI; MANN, 2018). Neste sentido, a deficiência destes neurotransmissores pode ocorrer pela excessiva atividade da enzima MAO (enzima responsável por catalisar a desaminação oxidativa de monoaminas) ou pela deficiência dos seus precursores (FINBERG; RABEY, 2016). Essas alterações no sistema nervoso central (SNC) podem ocasionar uma *up-regulation* de receptores nos neurônios pós-sinápticos, como tentativa de aumentar a atividade neurotransmissora (MONTEIRO, 2016).

No entanto, apesar das evidências em relação a hipótese monoaminérgica, esta teoria apresenta algumas limitações. Existe uma notável variabilidade no que diz respeito aos tipos de episódios depressivos, e dessa forma, alguns pacientes não respondem a estes antidepressivos aos quais aumentam as monoaminas no cérebro (MALHI; MANN, 2018). Além disso, a mudança nos níveis de monoaminas ocorre em um período curto de tempo após a administração destes antidepressivos, mas a resposta terapêutica requer administração continua destes por um tempo mais prolongado (ELHWEGL, 2004). Ademais, nem todas as substâncias que causam um aumento de monoaminas no SNC apresentam efeito do tipo antidepressivo, como por exemplo as anfetaminas (SAMUELS et al., 2011). Assim, podemos acreditar que há efeitos secundários no que diz respeito ao aumento de monoaminas aos quais auxiliam na melhora dos sintomas depressivos.

Além do bem estabelecido papel do sistema monoaminérgico na fisiopatologia da depressão (DELGADO et al., 1993; CUMMINGS, 1993), também tem se investigado o envolvimento de outros sistemas de neurotransmissores na fisiopatologia desta doença, tais como o sistema glutamatérgico (SKOLNICK, 2009) e a via L-arginina- NO (DA SILVA et al., 2000;

HARKIN et al., 2003). Dessa forma, tem se buscado elucidar os mecanismos bioquímicos responsáveis pelos efeitos terapêuticos dos antidepressivos.

Teorias da depressão

Desde a década de 80, acredita-se que as monoaminas estão envolvidas na patogênese de vários distúrbios psiquiátricos, tais como psicose, ansiedade, transtornos de pânico e depressão (SEEMAN, 1987; AGHAJANIAN, 1994). Frente a isto, a hipótese monoaminérgica tem evoluído nas últimas décadas e contribuído para o entendimento de eventos celulares mediados por aminas como neurotransmissores e auxiliado na melhora em relação aos tratamentos de transtornos depressivos (LANI et al., 2010). Há um consenso geral no que diz respeito a depressão, podendo esta resultar na disfunção de vários neurotransmissores ou sistemas metabólicos. Esta hipótese de redução de monoaminas no SNC sugere que a depressão é resultante de uma deficiência principalmente de 5-HT e/ou noradrenalina (NA) ou mesmo de receptores de tais neurotransmissores ineficientes (SCHILDKRAUT, 1965; COPPEN, 1967; WONG; LICINIO, 2001).

Os neurotransmissores monoaminérgicos compartilham algumas propriedades, mas diferem em sua distribuição no SNC, o tipo de receptores sobre os quais eles agem e os mecanismos de ação (ELHWUEGI, 2004). Na figura 1, podemos observar a hipótese monoaminérgica da depressão, no qual em (1) pessoas saudáveis, os neurotransmissores monoaminérgicos (5-HT, NA e/ou DA) são liberados normalmente e permanecem disponíveis na fenda sináptica até se ligarem aos seus receptores pré ou pós-sinápticos, presentes nos neurônios. Estes neurotransmissores podem ser recaptados por transportadores específicos em neurônios pré-sinápticos ou degradados através da ação da enzima MAO. Porém em (2) pacientes depressivos observa-se uma significativa diminuição nos níveis de monoaminas na fenda sináptica e para reverter esse decréscimo, ocorre o bloqueio de transportadores de monoaminas através do (3) tratamento com antidepressivos, que são amplamente utilizados para aumentar as concentrações e biodisponibilidade de monoaminas na fenda sináptica, reestabelecendo os sintomas característicos de pacientes depressivos (CASTREN, 2005).

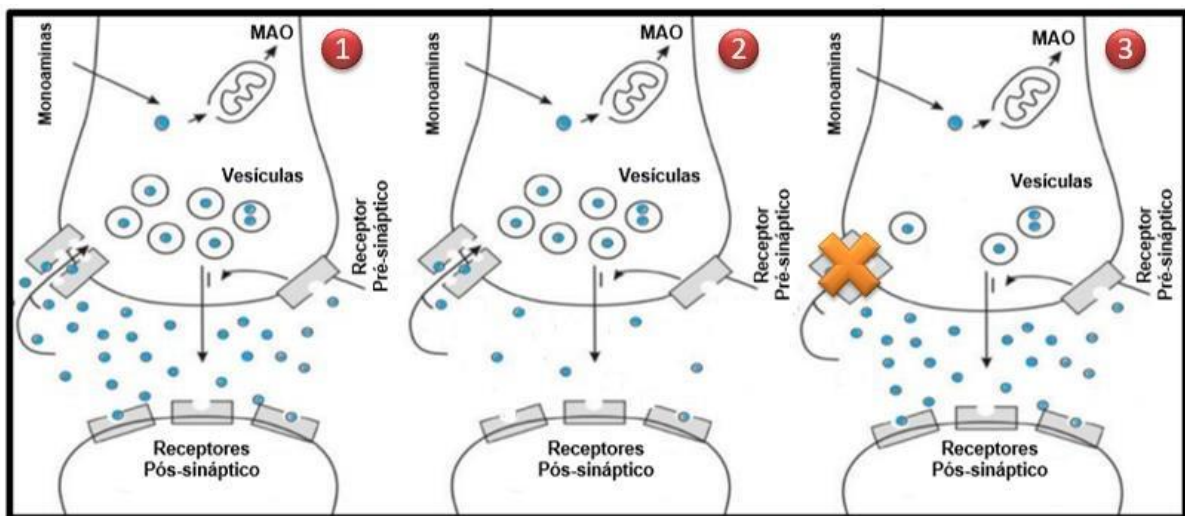


Figura 1. Hipótese monoaminérgica da depressão. MAO: monoamina oxidase (Adaptado de CASTREN, 2005).

Ainda, na tentativa de compensar a desregulação monoaminérgica ocorrem diferentes mecanismos para proporcionar o aumento de monoaminas no SNC: (1) a inibição da enzima MAO, a qual é responsável pela degradação das monoaminas neurotransmissoras, (2) a inibição ou excitação de receptores pré e pós-sinápticos que regulam a liberação das monoaminas, e (3) o bloqueio do transportador de monoaminas pré-sináptico, sendo este o responsável por recaptar o neurotransmissor liberado na fenda sináptica e quando bloqueado, permite que os neurotransmissores permaneçam mais tempo na fenda (Figura 2) (NEMEROFF; OWENS, 2002).

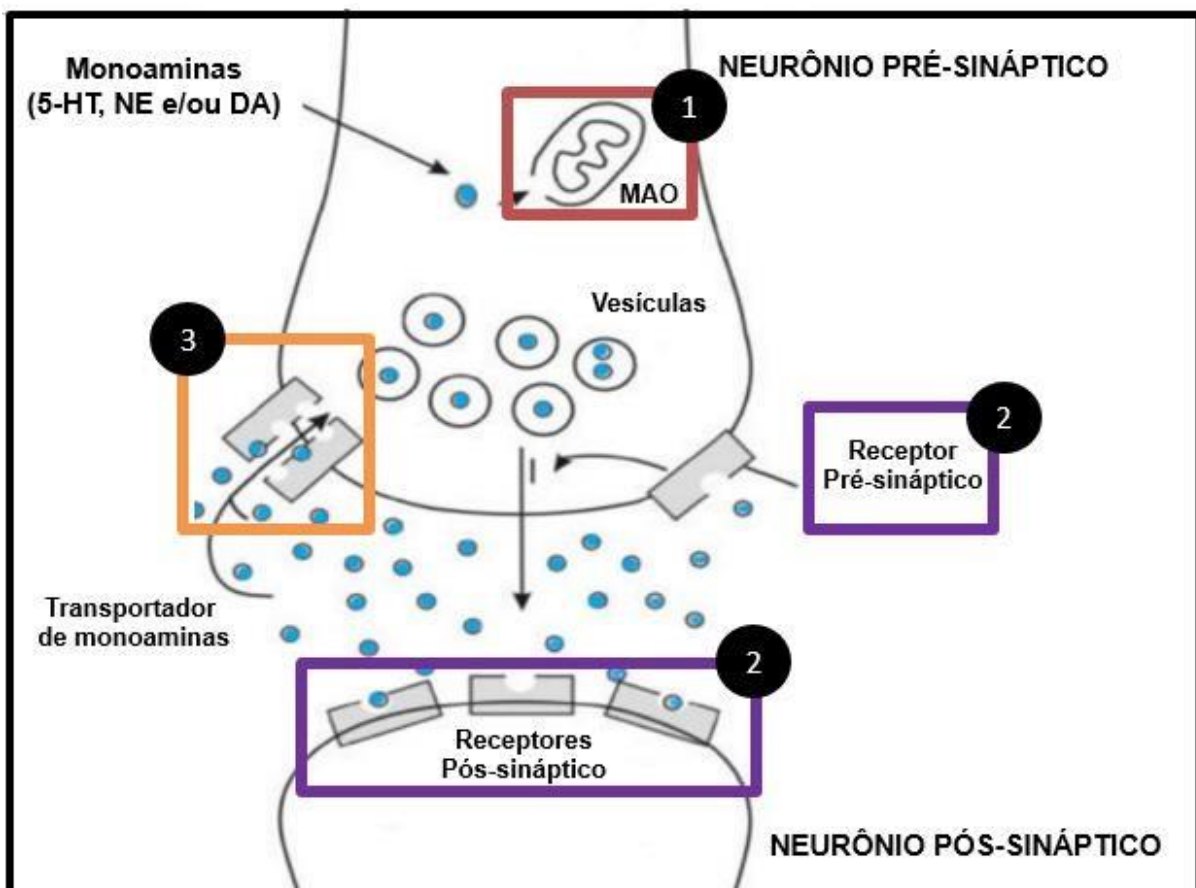


Figura 2. Mecanismos envolvidos no aumento de monoaminas no SNC. MAO: monoamina oxidase, 5-HT: serotonina, NE: norepinefrina, DA: dopamina (Adaptado de NEMEROFF; OWENS, 2002).

Todas estas evidências apresentadas reforçam a relevância das monoaminas na fisiopatologia da depressão. Considerando a localização dos neurônios noradrenérgicos, serotoninérgicos e dopaminérgicos no cérebro e suas projeções em muitas áreas do cérebro, fica claro que estes sistemas são responsáveis por muitos eventos comportamentais, como humor, vigilância, motivação, fadiga e psicomotricidade, agitação ou retardo (BRIGITTA, 2002). Frente a isto, a função anormal e as consequências comportamentais da depressão podem surgir da síntese alterada, armazenamento ou liberação dos neurotransmissores, bem como da sensibilidade perturbada de seus receptores ou funções mensageiras subcelulares (PAYKEL, 2001).

Desta forma, os neurônios que contêm neurotransmissores (NE, 5-HT, DA, entre outros), são responsáveis por atividades cerebrais que comandam sensações do organismo humano. Assim, alterações no funcionamento desses neurônios é vista como uma hipótese de causa da depressão (ALVES, 2010).

Ainda, estudos sugerem que a neuroinflamação desempenha um papel importante na depressão (HOWREN et al. 2009; MILLER et al. 2017). Tendo em vista que, diversos mediadores inflamatórios, incluindo citocinas pró inflamatórias (tais como: interleucina (IL) 1 α e β (IL-1 α e IL-1 β), fator de necrose tumoral- α (TNF- α) e IL-6), quimiocinas e a proteína C-reativa, encontram-se aumentadas em pacientes deprimidos (HOWREN et al. 2009; HAAPAKOSKI et al. 2015). Estas citocinas interagem com diferentes processos (tais como: metabolismo de monoaminas, plasticidade neuronal e alterações na função endócrina) no cérebro contribuindo assim para o desenvolvimento de depressão (DANTZER et al, 2008).

Além disto, evidências sugerem que eventos estressantes da vida desempenham um importante papel na etiologia da depressão (KENDLER et al., 1995). O envolvimento do estresse em pacientes depressivos pode envolver a ativação do eixo hipotálamohipófise-adrenal (HPA) através do aumento da produção do hormônio liberador de corticotrofina (ANACKER et al., 2011). Este, por sua vez, estimula a produção do hormônio adrenocorticotrófico e conseqüentemente ocorre o aumento da secreção do cortisol ou corticosterona no plasma desencadeando diversas reações ao organismo que promovem alterações comportamentais e mudanças neuroquímicas associadas a depressão (SAVEANU e NEMEROFF, 2012). Frente a isto a hipótese de depressão do receptor de corticosteroide é baseada na desregulação do eixo HPA observadas na maioria dos pacientes deprimidos (PARIANTE, 2003). Diante disto, uma melhor compreensão das etiologias da depressão poderá permitir avanços na terapêutica, no diagnóstico e na prevenção deste distúrbio.

Mecanismos envolvidas na fisiopatologia da depressão

Sistema serotoninérgico

Diversas vias neurais estão envolvidas na fisiopatologia da depressão (ALTAMURA et al., 2008). De fato, o envolvimento de diversos sistemas na depressão tem sido bem descrito, principalmente a via serotoninérgica (WONG, LICINIO 2001; MANN, 2003; GONCALVES et al., 2012). Frente a isto, estudos se concentraram nas depleções de neurotransmissores monoaminérgicos,

especialmente a 5-HT, devido ao seu importante papel na manifestação da depressão (STOCKMEIER, 2003; OQUENDO, 2007).

A 5-HT é sintetizada a partir do aminoácido triptofano no cérebro, sobre a ação da enzima triptofano hidroxilase. Posteriormente a biossíntese, a 5-HT é armazenada em vesículas, e quando o potencial de ação atinge a porção terminal do neurônio, ocorre a despolarização da membrana levando a abertura dos canais de cálcio, e as vesículas contendo 5-HT se fundem com a membrana do neurônio (WONG et al., 2005). Assim, a 5-HT é liberada na fenda sináptica onde se liga aos receptores presentes nos neurônios pré e pós-sinápticos e os ativa iniciando a cascata de sinalização no interior da célula (SILVA, 2008). A 5-HT é então, retirada da sinapse através do transportador de 5-HT (SERT), para posteriormente ser armazenada em vesículas até que o processo de despolarização ocorra novamente. Por outro lado, a 5-HT que se encontra livre no citoplasma são desaminadas pela enzima MAO presente na membrana mitocondrial (Figura 3) (NICHOLS; NICHOLS, 2008).

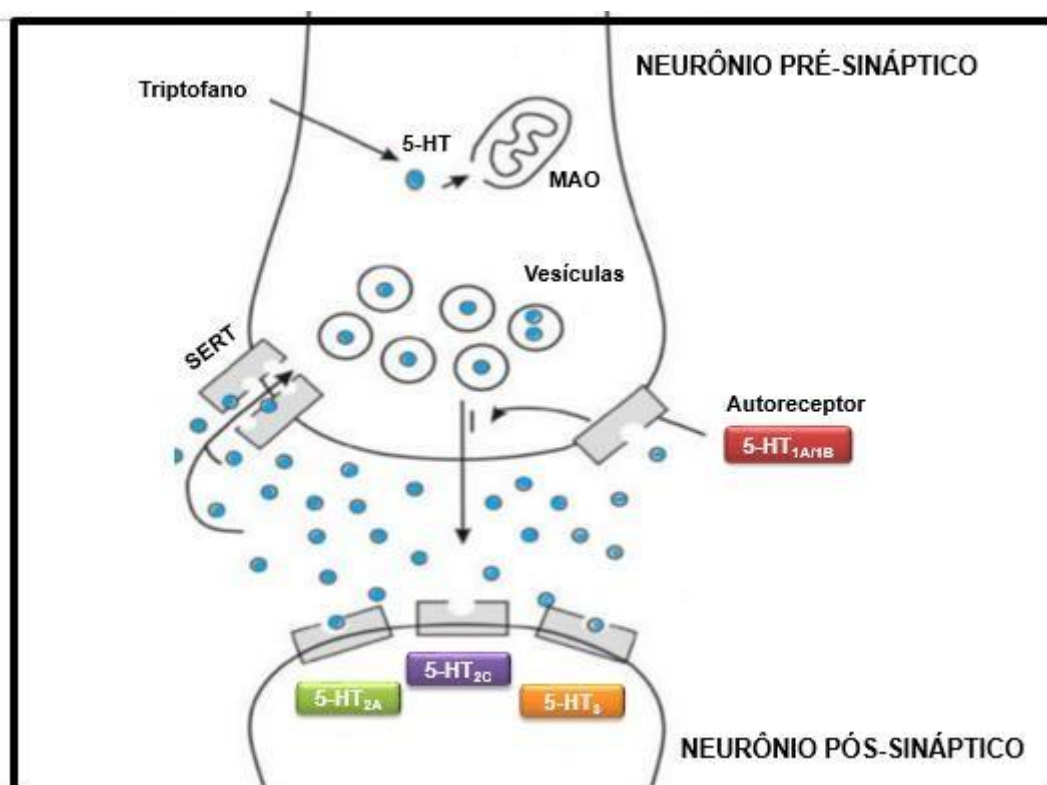


Figura 3. Sinapse serotoninérgica. MAO: monoamina oxidase, 5-HT: serotonina, SERT: transportador de serotonina (Adaptado de NICHOLS, NICHOLS, 2008).

O núcleo dorsal da rafe é a principal região responsável por sintetizar e liberar a 5-HT no cérebro. Desta forma, níveis diminuídos de 5-HT nesta região estão correlacionados com a patogênese da depressão (OQUENDO et al., 2007; GAO et al., 2008). As proteínas que são responsáveis por recaptar este neurotransmissor tem a função de retirar a 5-HT da fenda sináptica, e quando inibidas, ocasionam um aumento nas concentrações de 5-HT, aumentando a ação do sistema serotoninérgico e consequentemente reduzindo os sintomas depressivos (FAVA, 2003; DUPUY et al., 2011).

Frente a isto, o sistema de neurotransmissão serotoninérgica é constituído por diversos receptores, com 7 classes distintas (5-HT₁₋₇) e diferentes subtipos (NICHOLS; NICHOLS, 2008). Entre os receptores de 5-HT, os do subtipo 5-HT_{1A} são acoplados a proteína G e encontram-se amplamente distribuídos nos neurônios serotoninérgicos pré-sinápticos em terminais nervosos (córtex frontal, septo, amígdala, hipocampo e hipotálamo) e pós-sináptico nas regiões límbica e cortical. Esses atuam inibindo a taxa de liberação de 5-HT nos neurônios e são particularmente relevantes para as respostas antidepressivas (BLIER; WARD, 2003). Além disso, uma redução generalizada na ligação do receptor 5-HT_{1A}, está diretamente relacionada com a patogênese da depressão (SARGENT et al., 2000; CELADA et al., 2004). Os receptores 5-HT_{1B} também são considerados alvos para a fisiopatologia da depressão porque são regulados pela exposição ao estresse ambiental e exposição a antidepressivos (RUF; BHAGWAGAR, 2009).

Em relação aos receptores 5-HT₂, estes também são amplamente distribuídos no cérebro, porém encontrados principalmente no neocórtex, e sua ativação pode estar relacionada com a regulação de humor (CARR; LUCKI, 2011). Há relatos que o receptor do subtipo 5-HT_{2A} apresenta-se com densidade elevada em córtex pré-frontal de pacientes depressivos, demonstrando assim o envolvimento deste receptor nesta doença (SHELTON et al., 2009). Esta disponibilidade elevada de 5-HT_{2A} tem sido atribuída a uma diminuição da 5-HT que conduz ao receptor regulação positiva deste neurotransmissor (JANS et al., 2007). Ainda em relação a outro subtipo do receptor 5-HT₂, um estudo com modelo animal demonstrou que o agonismo dos receptores 5-HT_{2C} em um teste preditivo para avaliar drogas antidepressivas foi responsável pelo efeito do tipo antidepressivo, enquanto que um antagonista seletivo destes receptores

bloqueou o efeito (CRYAN; LUCKI, 2000). Os receptores 5-HT₃ pertencem à superfamília dos canais iônicos e são encontrados predominantemente no hipocampo e na amígdala, sendo responsáveis pela liberação de neurotransmissores (principalmente DA) e uma rápida neurotransmissão excitatória (RAMAMOORTHY et al., 2008). Este tipo de receptor ainda é pouco estudado, mas já se sabe sobre o seu envolvimento com a depressão, além de ser identificado com alvo para potenciais drogas antidepressivas (RAKJUMAR; MAHESH, 2010; BRUNING et al., 2011).

Tendo em vista o que foi exposto, com o avanço dos estudos, tem sido relatado que os níveis de receptores de 5-HT no soro e no líquido cefalorraquidiano estão diminuídos em pacientes com depressão (GAO et al., 2008) e que os inibidores de recaptação de 5-HT são cada vez mais usados clinicamente como antidepressivos (LANZENBERGER et al., 2012). Com isso, a diminuição nos níveis 5-HT tem um papel fundamental na depressão. Frente a isto, a recaptação de 5-HT é considerada um alvo para a procura de novos tratamentos para a depressão e desta forma, a maioria dos antidepressivos prescritos afeta diretamente o *turnover* de 5-HT no cérebro (KREISS; LUCKI, 1995), inibe a recaptação de 5-HT e também interage com os receptores 5-HT_{1A} e 5-HT₂ (CRYAN et al., 2005).

Sistema Glutamatérgico

Recentemente foram descobertos outros mecanismos não-monoaminérgicos envolvidos na depressão (RACAGNI; POPOLI, 2010; BROWNE; LUCKY, 2013), no qual outros neurotransmissores, como no caso do glutamato, vem sendo amplamente estudado e parece estar envolvido com transtornos depressivos (BROWNE; LUCKY, 2013; AUBRY, 2013).

O glutamato é um aminoácido que além de ser usado na síntese de proteínas também é considerado o principal neurotransmissor excitatório do SNC e está relacionado com funções cognitivas importantes (TRULLAS; SKOLNICK, 1990; MAENG et al., 2008; MUSAZZI et al., 2011). Este neurotransmissor é produzido nos neurônios a partir de intermediários do ciclo do ácido tricarboxílico e então é armazenado em vesículas através de transportadores de glutamato vesicular para liberação exocitótica. Após a despolarização e liberação neuronal na fenda sináptica, o glutamato liga-se a diferentes receptores inotrópicos e

metabotrópicos. Entre os receptores ionotrópicos no qual o glutamato se liga destaca-se o receptor NMDA, o ácido a-amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazolepropionico (AMPA) ou cainato, todos presentes na membrana pós-sináptica (CAROBREZ, 2003; NICIU et al., 2014).

Os receptores glutamatérgicos do tipo NMDA são os mais estudados. Estes possuem uma estrutura tetramérica formada por diferentes combinações de subunidades que, juntas, formam um canal iônico, permeável principalmente ao cálcio (PAOLETTI et al., 2013). Este tipo de receptor glutamatérgico difere-se parcialmente dos demais canais iônicos, pois sua abertura depende de ligante, que além do glutamato, há a necessidade da ligação de um aminoácido glicina ou D-serina, que funcionam como co-agonistas. Além disto, é necessária uma prévia despolarização da membrana em que se encontra o receptor para que o íon magnésio, que bloqueia o canal no potencial de repouso, seja deslocado (STEPHENSON, 2006).

Os receptores do tipo NMDA possuem inúmeras funções, uma vez que quando ativados mobilizam uma grande quantidade de cálcio para dentro das células, auxiliando na ativação de diversas vias intracelulares, o que garante um papel de destaque destes na mediação de importantes funções da neurotransmissão glutamatérgica, como a cognição, a memória e a plasticidade neural (KUGAYA; SANACORA, 2005). No entanto, justamente por essa capacidade de mobilizar um grande influxo de cálcio extracelular, o receptor do tipo NMDA também é estudado como promotor de morte celular por excitotoxicidade, quando o controle da excitação glutamatérgica é perdido (LÉVEILLÉ et al., 2008), o que implica em uma grande variedade de condições neuropatológicas, como na depressão (DONG et al., 2009; SANACORA et al., 2008).

Frente a isto, dados pré-clínicos sugerem que compostos que reduzem a transmissão nos receptores do tipo NMDA exibem ações antidepressivas, e que o tratamento crônico com antidepressivos pode afetar a função deste receptor (SKOLNICK, 2009; SANACORA et al., 2008). Desta forma, os antagonistas dos receptores NMDA tem se mostrado um alvo para a procura de novos tratamentos promissores, exercendo efeito antidepressivo de forma rápida em pacientes que não respondem a outros tratamentos, ou até mesmo a tratamentos que levam

mais tempo para exercer o seu efeito (ASSIS et al, 2009; LI et al, 2014; BAPTISTA, 2015).

Um dos medicamentos antidepressivos mais utilizados que envolvem o sistema glutamatérgica, via antagonismo dos receptores NMDA é a quetamina. Um estudo recente demonstrou que a utilização desta droga em camundongos depressivos induz mudanças no funcionamento do circuito cerebral, melhorando o comportamento dos camundongos “deprimidos” dentro de três horas e somente depois estimulando o crescimento das sinapses (MODA-SAVA et al., 2019). Este estudo sugere novos caminhos para explorar como manter os efeitos antidepressivos a longo prazo em pacientes que não respondem a outros antidepressivos.

Sistema nitrérgico

Atualmente o sistema nitrérgico tem sido manipulado para amplificar o papel antidepressivo das drogas que ativam o sistema serotoninérgico (HARKIN et al., 2004). Porém, um número notavelmente pequeno de estudos esclarecem as interações mútuas entre a 5-HT e NO e as condições fisiológicas e/ou patológicas específica, uma vez que o NO desempenha um papel neuromodulador no SNC (MAIA et al., 2006; JESSE et al. 2008).

O NO é produzido pela enzima óxido nítrico sintase (NOS) dependente de íons cálcio que utilizam a L-arginina para produzir NO e L-citrulina (GUIX et al., 2005). Esta síntese ocorre através da ação de três diferentes isoformas da NOS: neuronal (nNOS), induzida (iNOS) e endotelial (eNOS). No cérebro de mamíferos, mais de 90% da produção é realizada pela nNOS (JOCA et al., 2007). Um dos alvos intracelulares do NO é a enzima guanilato ciclase solúvel (GCs), que converte guanosina 5'-trifosfato (GTP) em guanosina 3',5'-monofosfato cíclico (GMPc) (Figura 4) (MONCADA, 1994). O NO formado a partir da L-arginina atua como um neurotransmissor (GARTHWAITE et al., 1995), além de ter um papel importante na regulação da plasticidade sináptica (MAIA et al., 2006). Este neurotransmissor do sistema nitrérgico, desde a antiguidade é implicado com a plasticidade neuronal durante o desenvolvimento cerebral (IZUMI et al., 1992).

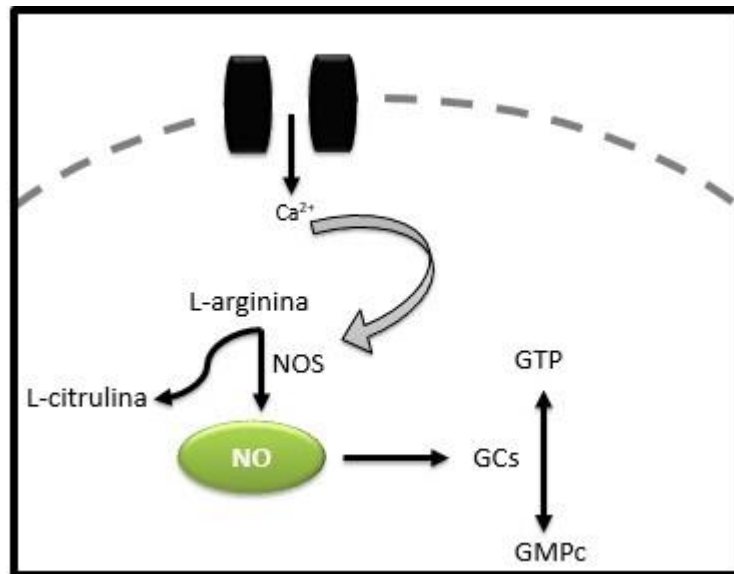


Figura 4. Síntese e alvos intracelulares do óxido nítrico. NO: óxido nítrico, NOS: óxido nítrico sintase, Ca^{2+} : íons cálcio, GCs: guanilato ciclase solúvel, GTP: guanosina 5'-trifosfato, GMPc: guanosina 3',5'-monofosfato cíclico.

A investigação do papel do NO na depressão começou a ser estudada principalmente depois da constatação de que a paroxetina, um antidepressivo utilizado na clínica como inibidor da recaptação de 5-HT, é também um inibidor da NOS (FINKEL et al., 1996). Desde então, diversos estudos demonstraram o envolvimento da via L-arginina-NO na depressão, tendo em vista que diversos antidepressivos como a venlafaxina (inibidor da recaptação de 5-HT e NA), bupropiona (inibidor da recaptação de DA) e a memantina (antagonista do receptor NMDA) modulam esta via de sinalização (KRASS et al., 2011; DHIR; KULKARNI, 2011).

Além disso, estudos demonstram que pacientes com depressão apresentam um aumento na produção de NO no SNC (LI et al., 2006; SUZUKI et al., 2001), e que substâncias que inibem a NOS ou a GCs tem efeito antidepressivo em modelos pré-clínicos (KASTER et al., 2005; MORETTI et al., 2011, ZENI et al., 2011). Desta forma, acredita-se que a via de sinalização L-arginina-NO-GMPc também desempenha um importante papel na fisiopatologia da depressão, como também no mecanismo de ação dos antidepressivos (ZOMKOWSKI et al., 2010).

Monoamina oxidase (MAO)

A atividade da enzima MAO tem sido fortemente relacionada com a fisiopatologia da depressão, uma vez que as principais estratégias terapêuticas utilizadas na clínica para o tratamento da depressão envolvem o sistema monoaminérgico a partir da inibição desta enzima (NAILA et al., 2010).

Esta enzima é responsável por catalisar a desaminação oxidativa de uma série de monoaminas gerando aldeído e amônia e, quando o cofator dinucleotídeo de flavina e adenina (FAD) é reoxidado pelo oxigênio (O_2), produz peróxido de hidrogênio (H_2O_2). Já o aldeído formado é rapidamente metabolizado pela enzima aldeído desidrogenase (ADH) a metabólitos ácidos (Figura 5).

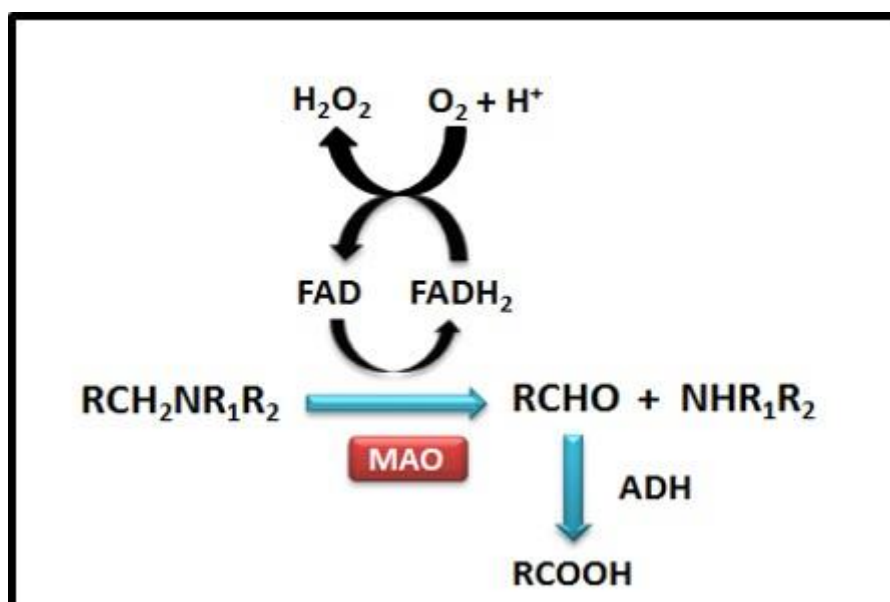


Figura 5. Metabolismo de monoaminas através da desaminação oxidativa realizada pela MAO. $RCH_2NR_1R_2$: amina primária; $RCHO$: derivado aldeído; NHR_1R_2 : amina substituída ou amônia; $RCOOH$: derivado ácido; FAD: cofator dinucleotídeo de flavina e adenina, FADH₂: cofator FAD reduzido, H_2O_2 : peróxido de hidrogênio, O_2 : oxigênio, H^+ : hidrogênio, ADH: aldeído desidrogenase (Adaptado de YODIM et al., 2006).

O H_2O_2 formado geralmente é inativado por enzimas antioxidantes como a catalase e a glutatona peroxidase (GPx). Entretanto, quando há um aumento na atividade da MAO, conseqüentemente há um aumento do H_2O_2 e esse por sua vez pode ser convertido por íons ferro (Fe^{2+}) em radicais hidroxila ($OH^\bullet$), que são

altamente reativos (Figura 6). Estes radicais provocam efeitos deletérios que podem levar ao dano e morte neuronal (YOUDIM et al., 2006).

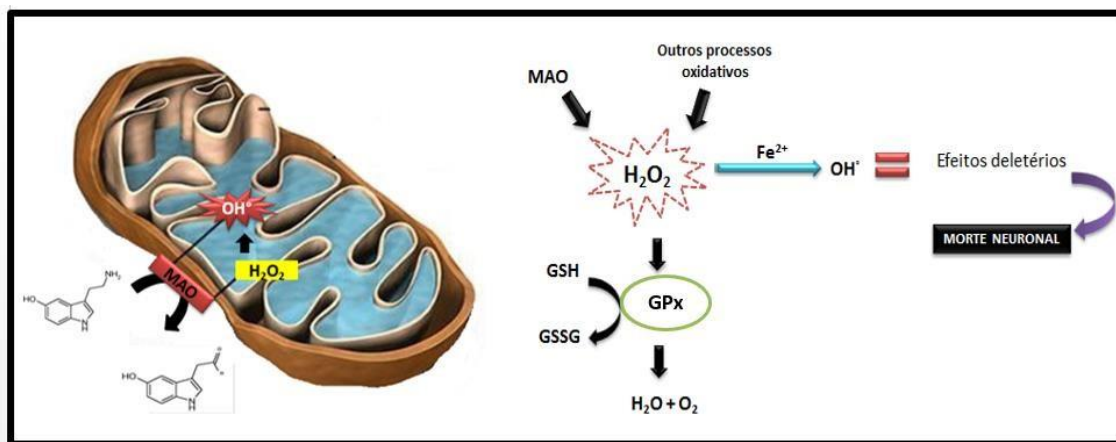


Figura 6. Mecanismo de neurotoxicidade induzido pelo peróxido de hidrogênio. MAO: monoamina oxidase, GSH: glutathiona reduzida; GSSH: glutathiona oxidada; H_2O : água, O_2 : oxigênio, Fe^{2+} : íons ferro, $OH^\bullet$: radicais hidroxila, H_2O_2 : peróxido de hidrogênio, GPx: glutathiona peroxidase (Adaptado de YOUDIM et al., 2006).

Vários destes produtos são considerados tóxicos em altas concentrações e contribuem para a patologia e/ou sintomas de alguns distúrbios psiquiátricos e neurológicos (BILICI et al., 2001). Além disso, evidências também sugerem que a MAO pode estar alterada na depressão, contribuindo ainda mais para níveis anormais de substratos ou produtos finais (YANG et al., 2004). Dessa forma, esses mecanismos estabelecem os fundamentos teóricos para a implicação da MAO na fisiopatologia de certos distúrbios neurodegenerativos, como a doença de Parkinson, e os distúrbios psiquiátricos e neurológicos, como a depressão (DANIELCZYK et al., 1988).

Existem duas isoformas da MAO (A e B), as quais se distinguem (I) pela sensibilidade aos inibidores irreversíveis, (II) pela especificidade por substratos endógenos, e (III) pela localização específica nos tecidos, determinando assim o potencial clínico de cada isoforma (HAMON; BLIER, 2013). A MAO-A desamina preferencialmente a 5-HT e é inibida seletivamente por baixas concentrações de clorgilina, enquanto que a MAO-B desamina preferencialmente a DA e é inibida seletivamente por baixas concentrações de selegilina (L-deprenil). Os neurotransmissores monoaminérgicos, tais como DA, NE, adrenalina e tiramina são oxidados por ambas as isoformas da enzima na maioria das espécies e são

utilizados clinicamente para tratar distúrbios psiquiátricos e neurológicos, incluindo a depressão e a doença de Parkinson (YOUDIM et al., 2006).

Uma relação entre a MAO e a depressão foi evidenciada em um estudo realizado por Meyers e colaboradores (2006), no qual os pesquisadores fizeram a utilização de um radioligante da enzima MAO para analisar a quantidade presente dessa proteína no cérebro. Os resultados demonstraram que os pacientes que sofriam deste distúrbio depressivo apresentaram quantidades elevadas desse metabolizador de monoaminas do que pacientes saudáveis, o que mais uma vez mostra a importância desta enzima na depressão, tornando a modulação desta enzima uma importante ferramenta no estudo da doença. Em virtude desta hipótese, a maioria dos antidepressivos usados para tratar a depressão aumenta os níveis de neurotransmissores monoaminérgicos no cérebro, aumentando suas atuações nas sinapses, e diminuindo os sintomas depressivos (NEMEROFF, 2007).

Na⁺/K⁺-ATPase

A enzima Na⁺/K⁺-ATPase é uma proteína transmembrana, amplamente distribuída nos tecidos e sua função é atuar na manutenção do gradiente iônico necessário para a excitabilidade neuronal (através do transporte ativo de íons de sódio (Na⁺) para o meio extracelular e de íons potássio (K⁺) para o meio intracelular com concomitante hidrólise de adenina trifosfato (ATP)) que gera o potencial de membrana para as transmissões sinápticas (Figura 7) (CORNELIUS et al., 2015). Esta enzima encontra-se presente em altas concentrações nas membranas das células cerebrais, consumindo em torno de 50% do ATP produzido neste tecido (ERECINSKA; SILVER, 1994). Desta maneira, alterações na atividade desta enzima podem ocasionar uma desregulação na função neuronal. Frente a isto, alguns estudos demonstram o envolvimento da atividade da Na⁺/K⁺-ATPase na fisiopatologia da depressão (EL-MALLAKH; WYATT, 1995; GAMARO et al., 2003).

Além disso, a sinalização lipídica possui um importante envolvimento na fisiopatologia da depressão (SCHNEIDER et al., 2016). Tendo em vista que a integridade das membranas é importante para o funcionamento celular, o que inclui o funcionamento de enzimas transmembranas, como a Na⁺/K⁺-ATPase. (LI; LANGHANS, 2015).

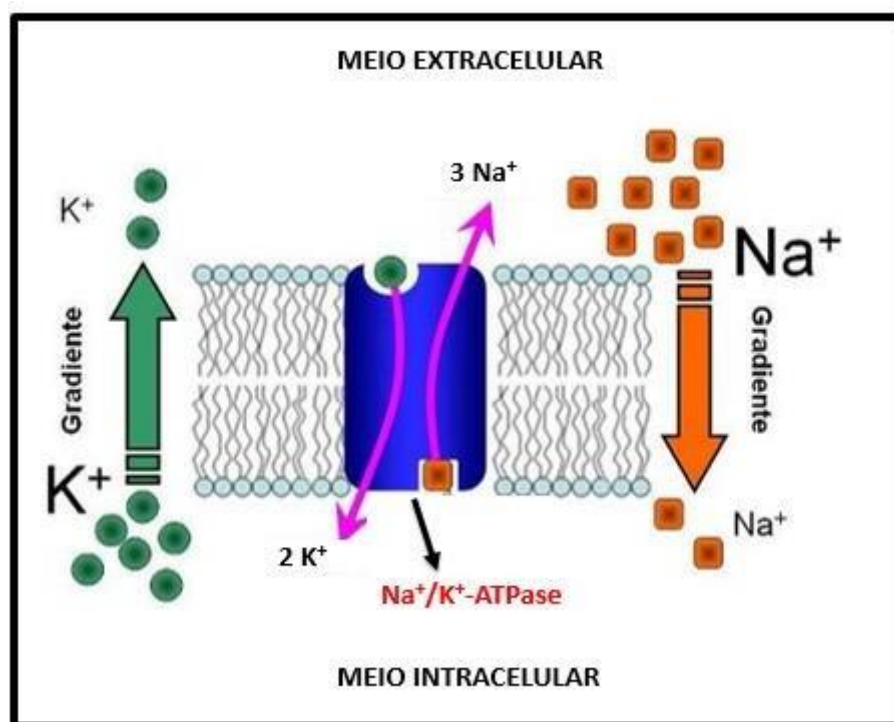


Figura 7. Mecanismo de troca iônica da Na^+/K^+ -ATPase.

O papel desta enzima é importante nas sinapses e na formação de novas conexões neurais, além de atuar na transdução de sinal, alterando a função celular (APERIA et al., 2016). Além disso, esta enzima apresenta elevado número de tióis, que podem sofrer danos com o aumento das espécies reativas de oxigênio, causando um comprometimento da sua atividade e estrutura. Com isso, muitos fatores podem alterar sua expressão e, dessa forma, sua atividade nos tecidos (LI; LANGHANS, 2015).

Fármacos empregados no tratamento da depressão

O tratamento da depressão depende da compreensão da fisiopatologia da doença e dos mecanismos pelos quais os medicamentos aliviam os sintomas da doença. Muitos medicamentos estão disponíveis para o tratamento da depressão, entretanto, muitas vezes mostram algumas limitações no que diz respeito ao seu efeito terapêutico (BERTON; NESTLER, 2006). Além disso, como em qualquer terapia médica, os fármacos têm algumas limitações que devem ser consideradas na hora de escolher o tratamento, como os sintomas predominantes, a experiência prévia, a preferência do doente e os efeitos

secundários de cada tratamento (PAPAKOSTAS, 2010). Além disso, os efeitos adversos a estes medicamentos são comuns e, em alguns casos, bastante severos, o que deve ser levado em conta na hora da escolha do tratamento (ERNST, 2009).

Para que terapia medicamentosa promova algum efeito terapêutico, na maior parte das vezes é necessário o transcurso do período de pelo menos duas semanas de tratamento, conhecido como período de latência (adaptações farmacodinâmicas que resultam na redução do número e da afinidade dos receptores ao longo do tempo, necessárias para promoção do efeito farmacológico). Destaca-se ainda que, para que ocorra alguma resposta clínica e a redução expressiva dos sintomas, os antidepressivos devem ser utilizados por pelo menos quatro semanas. Além disso, é necessário atingir as doses terapêuticas sem ultrapassar as doses toleradas pelo paciente e garantir a adesão ao tratamento (WANNMACHER, 2011).

Os primeiros fármacos antidepressivos descobertos foram os antidepressivos tricíclicos (ATCs) e os inibidores da monoamina oxidase (iMAOs) na década de 50. Posteriormente, surgiram os inibidores seletivos da recaptação de serotonina (ISRSs) fechando as três classes de medicamentos amplamente utilizadas no tratamento da depressão (KANDEL, 2003).

O mecanismo de ação dos ATCs consiste no bloqueio da recaptação de 5-HT, NA e DA pelo neurônio pré-sináptico, aumentando a disponibilidade desses neurotransmissores na fenda sináptica. Estes também atuam como antagonistas competitivos de receptores muscarínicos colinérgicos, histamínicos do tipo 1 e adrenérgicos (α e β), levando aos diversos efeitos colaterais associados a esse tipo de terapia antidepressiva. Estes fármacos são indicados para uma variedade de transtornos, incluindo a depressão e o transtorno de ansiedade (MORENO et al., 1999; CORDIOLI, 2007).

O mecanismo de ação dos ISRS consiste no bloqueio do transportador de serotonina, promovendo uma maior concentração de 5-HT na fenda sináptica, aumentando a disponibilidade deste neurotransmissor e, consequentemente, a atividade serotoninérgica (HOMBERG et al., 2010). Por serem seletivos, não exercem ação sobre as catecolaminas (NA e DA). Porém, possuem atividades anticolinérgicas, α 1-adrenérgica e histaminérgica, relacionadas com a manifestação dos efeitos adversos da classe (HIRSCH; BIRNBAUM, 2012),

porém menos pronunciadas que os ATCs, devido à baixa afinidade de ISRS por esses receptores (COHEN, 1977). Os ISRSs foram os primeiros fármacos antidepressivos que de fato se mostraram eficazes, cujo principal representante desta classe é a fluoxetina, inserida no mercado no final dos anos 80 (LUNDBERG et al., 2012).

Por último, outra classe utilizada para o tratamento dos distúrbios depressivos são os iMAOs. Esta classe de medicamentos consiste em inibir a enzima MAO, responsável pela degradação de 5-HT, NA e DA, e consequentemente, aumentar as concentrações destas monoaminas na fenda sináptica (BERTON; NESTLER, 2006). A MAO apresenta-se sob a forma de duas isoenzimas – MAO-A e MAO-B. A primeira é responsável por metabolizar 5-HT e NA e a segunda (feniletilamina), juntamente com a MAO-A, degrada DA. Porém, quando comparado com outros medicamentos antidepressivos, os iMAOs são menos utilizados, devido aos inúmeros efeitos colaterais e restrições dietéticas (CORDIOLI, 2007).

Existem iMAOs de efeito reversível e irreversível. Quando o efeito é reversível, o medicamento, como por exemplo a moclobemida, possui meia-vida menor e são necessárias mais doses, já que o efeito é mais breve. Já os iMAOs de efeito irreversível, como por exemplo a fenelzina, tranilcipromina, isocarboxazida e iproniazida, ligam-se irreversivelmente com a enzima MAO, que leva à sua destruição, e assim, é preciso um intervalo de 10 a 14 dias para que o organismo possa sintetizar novamente a quantidade de enzima perdida (CORDIOLI, 2007).

Os iMAOs irreversíveis podem apresentar-se como não-seletivos ou seletivos. A primeira geração dos iMAOs irreversíveis e não-seletivos (fenelzina, tranilcipromina, isocarboxazida e iproniazida) apresentam atividade antidepressiva, porém uma série de efeitos colaterais, como crises hipertensivas quando ingeridas concomitantemente com alimentos ricos em tiramina. Essas limitações impulsionaram o desenvolvimento dos iMAOs de segunda geração, os quais ainda apresentam um perfil de atividade irreversível, porém seletivo para MAO-A (clorgilina) ou MAO-B (selegilina). Entretanto, as indesejáveis crises hipertensivas continuam a limitar o uso dos inibidores seletivos da MAO (CORDIOLI, 2007; NAILA et al., 2010). Devido a isto, é de extrema importância

investigar iMAOs mais promissores para o tratamento da depressão, com maior seletividade e menores efeitos adversos.

Com todas estas limitações, pesquisas estão sendo realizadas para estudar novas drogas antidepressivas que possam modular a disponibilidade de monoaminas na fenda sináptica (PESARICO et al., 2015; VELASQUEZ et al., 2017).

Compostos Orgânicos de Enxofre

O enxofre é um elemento da tabela periodica pertencente a à família dos calcogênios. Quase 90 % do total de enxofre são convertidos em SO_2 , depois em trióxido de enxofre (SO_3) para chegar a ácido sulfúrico (H_2SO_4) que, em grande parte, será utilizado para a fabricação de fertilizantes (cerca de 60 %). O restante é convertido em vários outros produtos químicos. Os 10 % que não são empregados na produção de H_2SO_4 , são utilizados na forma de enxofre elementar, na fabricação de: tetracloreto de carbono (CCl_4), viscoses, fungicidas, inseticidas, pólvora e participa do processo de vulcanização da borracha (LEE, 2000). Além disso, o enxofre está presente em altas concentrações em determinados alimentos de origem vegetal e animal, como por exemplo no alho, na cebola, leite e laticínios, vegetais crucíferos, entre outros (ROSE et al., 2005, JUNG et al., 2008).

Embora pouco frequente, o enxofre é essencial para o sistema biológico, sendo este elemento encontrado nos aminoácidos como a cistina, cisteína e metionina (LEE, 2000). Além disso, ele faz parte da estrutura da glutatona reduzida, que é um importante antioxidante não enzimático celular (GIANNI et al., 2004). Também exerce atividade regulatória da pressão arterial sistólica e inibição da agregação plaquetária (ROSE et al., 2005).

Diante disso, os compostos orgânicos de enxofre apresentam diversas propriedades farmacológicas descritas na literatura. Dentre elas destacam-se o efeito antioxidante, propriedades anti-inflamatórias através da regulação de macrófagos ativados e redução dos níveis de colesterol (ROSE et al., 2005; LIN et al., 2008). O efeito antibacteriano também tem sido demonstrado aos compostos orgânicos de enxofre sintéticos (JUNG et al., 2008). Além disso, Zeng e colaboradores (2008) apresentaram o efeito hepatoprotetor de trissulfetos dialílicos (Figura 8A) contra o dano induzido pelo etanol.

O efeito anticarcinogênico foi estudado em um modelo animal de câncer de esôfago, cólon, mamas e também pulmão. Entre os possíveis mecanismos envolvidos pode-se destacar a capacidade de modulação e detoxificação de carcinógenos e modulação da atividade e da expressão de enzimas de detoxificação de fase II (LII et al., 2010).

Os isotiocianetos (análogo do isocianato, com enxofre no lugar do oxigênio) (Figura 8B) apresentam propriedades antioxidantes e anti-inflamatórias em distúrbios cardiovasculares e reduziram a carcinogênese através da inibição do citocromo P450. Eles também atuam de forma indireta na regulação de genes codificadores de enzimas de detoxificação e proteínas antioxidantes. Dessa forma, estes compostos apresentam uma importante participação nos sistemas de defesa celular como a regulação da glutathione S-transferase (CHEN et al., 2009; ZAKKAR et al., 2009).

Wang e colaboradores (2010) demonstraram que compostos orgânicos que contém cisteína, um aminoácido que contém enxofre, apresentaram efeito cardioprotetor no infarto do miocárdio por reduzir os efeitos deletérios do estresse oxidativo. Além disso, os compostos orgânicos de enxofre, como por exemplo, os sulfetos dialílicos, apresentaram efeito antioxidante e protegeram contra o dano oxidativo induzido por cádmio em testículos de ratos adultos (SADIK, 2008).

Paralelamente a isto, o efeito antioxidante dos compostos de enxofre tem sido relacionado com algumas propriedades farmacológicas. Neste contexto, tem sido demonstrado que compostos orgânicos de enxofre protegem o dano no DNA celular devido ao efeito antioxidante destes (RAMOUTAR; BRUMAGHIM, 2007). Devido a isso, o estudo dos compostos orgânicos de enxofre pode ser uma boa alternativa na busca de novos compostos para o tratamento de diferentes doenças, inclusive aquelas relacionadas com o estresse oxidativo, como a depressão (LEE, 2000).

A busca por novos agentes antidepressivos se intensificou nos últimos anos. Com base na ação farmacológica de compostos organosulfurados, diversas moléculas foram sintetizadas com o intuito de selecionar substâncias com ações específicas, alta eficácia, baixos efeitos adversos em testes biológicos e com síntese fácil e simples (IANISKI et al., 2014). Neste contexto, o BMMS (Figura 8C) é um novo composto organosulfurado da classe dos sulfetos de divinila

assimétricos, obtidos por métodos simples e eficientes para a síntese e com bons rendimentos (ATMACA, 2004). Um estudo de Ianiski e colaboradores (2014) demonstrou pela primeira vez, que o composto BMMS, exibiu atividade antioxidante em um modelo *in vivo* induzido por nitroprussiato de sódio no cérebro de camundongos. Além disso, neste estudo a administração deste composto não afetou parâmetros bioquímicos, descartando a toxicidade aguda renal e hepática. Posteriormente, outro estudo revelou que uma classe de compostos organosulfurados, incluindo o BMMS apresentaram efeito antioxidante *in vitro*, além das atividades antinociceptivas e antiedematogênicas em um estudo *in vivo* (IANISKI et al., 2017). Estes achados impulsionaram a busca por novas propriedades farmacológicas do BMMS, onde em um estudo de Da Silva e colaboradores (2017) este composto protegeu contra o comprometimento de memória em um modelo anti-aminésico *in vivo*, no qual o efeito antioxidante também pareceu estar envolvido no efeito do composto neste modelo.

Em função das promissoras ações farmacológicas do composto BMMS utilizado neste estudo, optou-se por verificar o efeito deste composto em distúrbios que acometem o SNC, como a depressão. De fato, os compostos de enxofre se comportaram tão bem quanto os antidepressivos convencionais em estudos de depressão, onde se demonstrou que alteram o humor (PARCELL, 2002). Devido a isso, o estudo deste composto orgânico de enxofre pode representar uma nova alternativa terapêutica para o tratamento patologias associada à atividade do tipo-antidepressiva.

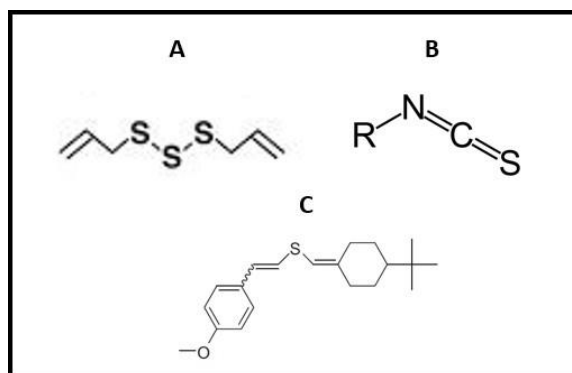


Figura 8. Estruturas química.

4. Artigo científico

Os resultados que fazem parte da dissertação estão apresentados sob a forma de artigo científico. Os itens Materiais e Métodos, Resultados, Discussão e Referências do artigo, encontram-se estruturados de acordo com as normas do periódico *Metabolic Brain Disease*. O artigo científico encontra-se publicado nesta revista.



Contribution of serotonergic and nitrergic pathways, as well as monoamine oxidase-a and Na⁺, K⁺-ATPase enzymes in antidepressant-like action of ((4-*tert*-butylcyclohexylidene)methyl) (4-methoxystyryl) sulfide (BMMS)

Renata L. de Oliveira¹ · Guilherme T. Voss¹ · Jaini J. Paltian¹ · Mikaela P. Pinz¹ · Marina Laura C. P. Torres¹ · Michele P. Moreira² · Marina C. Dilelio³ · Claudio C. Silveira³ · Ethel A. Wilhelm¹ · Cristiane Luchese¹

Received: 23 September 2018 / Accepted: 20 May 2019
© Springer Science+Business Media, LLC, part of Springer Nature 2019

Abstract

The present study investigated a possible antidepressant-like effect of ((4-*tert*-butylcyclohexylidene)methyl) (4-methoxystyryl) sulfide (BMMS) by using the forced swimming test (FST) and the tail suspension test (TST) in Swiss mice. The contribution of serotonergic, glutamatergic and nitrergic systems in the antidepressant-like activity of BMMS was evaluated. We also examined the involvement of monoamine oxidase (MAO)-A, MAO-B and Na⁺, K⁺-ATPase activities in prefrontal cortex of mice. BMMS, (0.1–10 mg/kg, intragastrically (i.g.)) and fluoxetine (32 mg/kg, i.g.) decreased the immobility time in the FST and TST. The anti-immobility effect of BMMS (10 mg/kg, i.g.) in the TST was prevented by the pretreatment of mice with WAY100635 (0.1 mg/kg, subcutaneously (s.c.)), a 5-HT_{1A} receptor antagonist, ketanserin (5 mg/kg, intraperitoneal (i.p.)), a 5-HT_{2A/2C} receptor antagonist, and partially blocked by ondansetron (1 mg/kg, i.p.), a 5-HT₃ receptor antagonist. The anti-immobility effect of BMMS (10 mg/kg, i.g.) was not avoided by pretreatment with MK-801 (0.01 mg/kg, s.c. a non-competitive N-methyl D-Aspartate (NMDA) receptor) in the TST. Pretreatment with L-arginine (500 mg/kg, i.p., a nitric oxide precursor) reversed partially the reduction in the immobility time elicited by BMMS (10 mg/kg, i.g.) in TST. BMMS altered Na⁺, K⁺-ATPase and MAO-A activities in prefrontal cortex of mice, but was not able to change the MAO-B activity. In conclusion, BMMS exerted an antidepressant-like effect in mice and serotonergic and nitrergic systems are involved in the antidepressant-like action of compound. BMMS modulated MAO-A and Na⁺, K⁺-ATPase activities in prefrontal cortex of mice.

Keywords Sulfur · Depression · Serotonin · Nitric oxide · Na⁺ · K⁺-ATPase · Monoamine oxidase

Introduction

Depression is a chronic multi-factorial and incapacitating psychiatric disorder, characterized by a triad of symptoms with low or depressed mood, anhedonia, and low energy or fatigue. Other emotional and physical symptoms are also often present, such as sleep and psychomotor disturbances, feelings of guilt, difficulty concentrating, low self-esteem, suicidal tendencies, as well as autonomic and gastrointestinal disturbances (McKenna et al. 2015). This disorder affects up to 16% of the population and has become the main cause of disability worldwide (Converge 2015). The World Health Organization (WHO) numbered depression as the fourth leading cause of disability worldwide, demonstrating the great impact of this disease on modern society (WHO 2010).

Depression is a heterogeneous disorder and a complex phenomenon, which has many subtypes and probably more than

✉ Ethel A. Wilhelm
ethelwilhelm@yahoo.com.br

✉ Cristiane Luchese
cristiane_luchese@yahoo.com.br

¹ Programa de Pós-graduação em Bioquímica e Bioprospecção, Laboratório de Pesquisa em Farmacologia Bioquímica (LaFarBio), Grupo de Pesquisa em Neurobiotecnologia (GPN), Centro de Ciências Químicas, Farmacêuticas e de Alimentos, Universidade Federal de Pelotas, Campus Capão do Leão, Pelotas, RS CEP 96010-900, Brazil

² Programa de Pós-Graduação em Nanociências, Centro de Ciências Tecnológicas, Universidade Franciscana, Santa Maria, RS CEP 97010-032, Brazil

³ Departamento de Química, Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, RS CEP 97105-900, Brazil

one etiology. The most accepted hypothesis to explain the depression pathophysiology is the monoaminergic, which postulates that there are abnormalities in the monoaminergic neurotransmitters, such as serotonin (5-HT), norepinephrine (NE) and/or dopamine (DA), that play important role in behavioral alterations (Menard et al. 2015; Finberg and Rabey 2016). Moreover, evidence also indicated that glutamatergic and nitrergic pathways are implicated in the pathogenesis of depressive disorders (Sanacora et al. 2008). In this way, the pathophysiological aspects of depressive disorders are not yet fully understood.

Nowadays there are several treatments and new drug regimens available for depressive disorders. However, these treatments have significant limitations, such as low response rates, treatment resistance, high incidence of relapse, and a time-lag of weeks to months for a response (Trivedi et al. 2006). In this context, there is a major unmet need for more efficacious and faster-acting antidepressants.

The search for new antidepressant agents has intensified in recent years. Indeed, sulfur compounds have performed as well as conventional antidepressant drugs in studies of depression, where they have been demonstrated to alter mood (Parcell 2002). Our research group has studied pharmacological properties of an organosulfur compound, ((4-*tert*-butylcyclohexylidene) methyl) (4-methoxystyryl) sulfide (BMMS). This compound has showed antioxidant (Ianiski et al. 2014, 2017), antiamnesic (Da Silva et al. 2017) and antinociceptive (Ianiski et al. 2017) actions.

In view of our interest in searching new treatment alternatives for depression, as well as in investigating pharmacological properties of BMMS, the primary aim of the present study was to verify the antidepressant-like effect of BMMS in mice. The second objective was to evaluate the involvement of serotonergic, glutamatergic and nitrergic systems in the antidepressant-like activity of BMMS. Finally, we also examined the contribution of enzymes monoamine oxidase (MAO) and Na⁺, K⁺-ATPase in prefrontal cortex of mice.

Materials and methods

Animals

Male adult Swiss mice (25–35 g) from a local breeding colony were used. Swiss mice were chosen based on previous studies that demonstrated antidepressant drug effect in this strain (Ripoll et al. 2003; David et al. 2003; Brocardo et al. 2008; Jesse et al. 2010; Brüning et al. 2011; Velasquez et al. 2017; Abreu et al. 2018; Bogatko et al. 2018; de Oliveira et al. 2018; Fajemiroye et al. 2018; Moretti et al. 2018; Sartim et al. 2019).

The animals were kept on a separate room, on a 12 h light/dark cycle, at a temperature of 22 ± 2 °C, with free access to food and water. All behavioral tests were carried out between

08.00 a.m. and 04.00 p.m. All experiments were performed on separate groups of animals and each animal was used only once in each test. Ethical Research Committee of the Federal University of Pelotas approved the present experimental study (number 8992–2017).

Drugs

BMMS (Fig. 1) was prepared according to the literature (Silveira et al. 2011). The chemical purity of the compound (99.9%) was determined by gas chromatography or high-performance liquid chromatography. Compound was diluted in canola oil. The following drugs were used: Fluoxetine (commercially purchased), ketanserin, ondansetron, WAY100635, MK-801 and L-arginine (Sigma Chemical Co, USA). These drugs were dissolved in saline. All drugs were administered in a constant volume of 10 ml/kg body weight. All other chemicals were of analytical grade and obtained from standard commercial suppliers.

Behavioral tests

All behavioral tests were scored by an observer-blinded, when the researcher does not know treatment that a mouse undergoes.

Dose-response curve of antidepressant-like action of BMMS in the forced swimming test (FST) and tail suspension test (TST)

To evaluate the dose-response curve of antidepressant-like action of BMMS, mice ($n = 7$ animals/group) were treated with BMMS (0.1, 1 and 10 mg/kg, by intragastric (i.g.) route), fluoxetine (32 mg/kg, i.g.) or canola oil (control, 10 ml/kg, i.g.) at 30 min before the FST or TST.

The FST was conducted using the method described by Porsolt et al. (1977). In this test, mice were individually forced to swim in an open cylindrical container (10 cm in diameter and 25 cm in height), containing 19 cm of water at 25 ± 1 °C. The duration of immobility was scored during a 6-min period by an experienced observer (Kaster et al. 2005). Each mouse was considered as immobile when floating motionless or making only those movements necessary to keep its head above

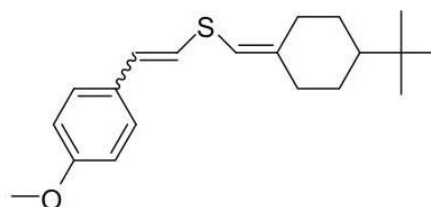


Fig. 1 Chemical structure of ((4-*tert*-butylcyclohexylidene) methyl) (4-methoxystyryl) sulfide (BMMS)

water. A decrease in the duration of immobility is an indicative of antidepressant-like effect.

The TST was conducted as described by Steru et al. (1985). Mice were suspended 50 cm above the ground by an adhesive tape placed approximately 1 cm from the tip of the animals tail. Mice were considered immobile only when they hung passively and completely motionless. Immobility time was manually recorded during a 6-min period by an experienced observer (Kaster et al. 2005). A decrease in the duration of immobility is an indicative of antidepressant-like effect.

Involvement of the 5-HT receptor subtypes on the antidepressant-like action of BMMS in the TST

To investigate the possible involvement of the 5-HT receptor subtypes on the antidepressant-like effect caused by BMMS on reducing the immobility time in the TST, independent groups of animals were pretreated with WAY100635 (0.1 mg/kg, subcutaneous (s.c.), a selective 5-HT_{1A} receptor antagonist), ketanserin (5 mg/kg, intraperitoneal (i.p.), a 5-HT_{2A/2C} receptor antagonist) or ondansetron (1 mg/kg, i.p., a 5-HT₃ receptor antagonist). After 15 min of WAY100635 and ondansetron administrations or 30 min of ketanserin administration, mice received BMMS (10 mg/kg, i.g.) or canola oil (vehicle, 10 ml/kg, i.g.) and were tested in the TST 30 min later. TST was described above (item 2.3.1). The doses and times of treatments with 5-HT receptor antagonists were chosen based on previous studies, which did not modify the basal response in the TST and the locomotor activity (Zomkowski et al. 2004; Jesse et al. 2010; Brüning et al. 2011).

Involvement of the N-methyl-D-aspartate (NMDA) receptor on the antidepressant-like action of BMMS in the TST

To assess the possible involvement of the glutamatergic system on the antidepressant-like effect of BMMS in the TST, independent groups of animals were pretreated with MK-801 (0.01 mg/kg, i.p., a glutamate NMDA receptor antagonist). After 15 min, the mice received BMMS (10 mg/kg, i.g.) or canola oil (vehicle, 10 ml/kg, i.g.) and were tested in the TST 30 min later. TST was described above (item 2.3.1). The dose and time of treatment with MK-801 were chosen based on previous studies, which did not modify the basal response in the TST and the locomotor activity (Ostadhadi et al. 2016; Réus et al. 2016).

Involvement of the L-arginine-nitric oxide (NO) pathway on the antidepressant-like action of BMMS in the TST

The role played by the L-arginine-NO pathway on the antidepressant-like effect caused by BMMS in TST was investigated in different groups of animals. The mice were pretreated with L-arginine (500 mg/kg, i.p., a precursor of

NO). Thirty minutes after L-arginine administration, BMMS (10 mg/kg, i.g.) or canola oil (vehicle, 10 ml/kg, i.g.) was administered. TST was carried out 30 min after the treatment with BMMS or vehicle. TST was described above (item 2.3.1). The dose and time of treatment with L-arginine were chosen based on previous studies, which did not change the basal response in the TST and the locomotor activity (Rosa et al. 2003; Liebenberg et al. 2015).

Effect of treatments on the spontaneous locomotor activity in the open-field test (OFT)

The spontaneous locomotor behavior was assessed in the OFT (Walsh and Cummins 1976). The OFT was carried out with the purpose of excluding sedative or motor abnormality after treatments with BMMS, fluoxetine, WAY100635, ketanserin, ondansetron, MK-801 or L-arginine. The open-field was made of plywood (30 cm in height × 45 cm in length × 45 cm in width) and divided by masking tape markers into 09 squares (3 rows of 3). Each animal was placed individually at the center of the apparatus and observed for 4-min period to record the locomotor (number of segments crossed with the four paws) and exploratory (expressed by the number of time rearing on the hind limbs) activities.

Ex vivo assays

MAO-A, MAO-B and Na⁺, K⁺-ATPase activities were performed to verify the involvement of these enzymes in the antidepressant-like effect of BMMS. Mice were pretreated with BMMS (10 mg/kg, i.g.) or canola oil (control, 10 ml/kg, i.g.), and after 30 min, the animals were died, and the prefrontal cortex was removed for analysis.

MAO activity assay

A preparation of brain mitochondria was used for MAO assay (Soto-Otero et al. 2001). The cerebral structures were removed and washed in ice-cold isolation medium (Na₂PO₄/KH₂PO₄ isotonicized with sucrose, pH 7.4). Cerebral mitochondria were then obtained by differential centrifugation. Briefly, after removing blood vessels and pial membranes, prefrontal cortex was manually homogenized with 1:4 (w/v) of the isolation medium. Then, the homogenate was centrifuged at 900×g at 4 °C for 5 min. The supernatant was centrifuged at 12,500×g for 15 min. The mitochondria pellet was then washed once with isolation medium and recentrifuged under the same conditions. Finally, the mitochondrial pellet was reconstituted in a buffer solution (Na₂PO₄/KH₂PO₄ isotonicized with KCl, pH 7.4) and stored in aliquots.

MAO activity was determined according to Krajl (1965), with some modifications (Matsumoto et al. 1984). An aliquot of 100 µl of each sample was incubated at 37 °C for 5 min in a

medium containing buffer solution and specific inhibitors, selegiline (a MAO-B inhibitor, 250 nM) or clorgiline (a MAO-A inhibitor, 250 nM) at a final volume of 600 μ l. Then 20 μ l of kynuramine dihydrobromide was added to the reaction mixture (90 μ M (MAO-A) and 60 μ M (MAO-B)) as substrate. Samples were then incubated at 37 °C for 30 min. After incubation, the reaction was terminated by adding 10% trichloroacetic acid (TCA). After cooling and centrifugation at 3000 $\times$ g for 15 min, an aliquot of 800 μ l of the supernatant was added to 1 ml of 1 M NaOH. The fluorescence intensity was detected spectrofluorimetrically with excitation at 315 nm and emission at 380 nm. Clorgiline (100 nM) and selegiline (100 nM) were used as positive controls in MAO-A and MAO-B assays, respectively. The concentration of 4-hydroxyquinoline (4-OH quinoline) was estimated from a corresponding standard fluorescence curve of 4-OH quinoline. MAO activity was expressed as nmol 4-OH quinoline/mg protein/min.

Na⁺, K⁺-ATPase activity assay

The prefrontal cortex was homogenized in 50 mM Tris/HCl pH 7.5, 1:10 (w/v) and centrifuged at 4000 $\times$ g for 10 min at 4 °C to yield a low-speed supernatant fraction (S1). A reaction mixture was used containing S1, 3 mM MgCl₂, 125 mM NaCl, 20 mM KCl and 50 mM Tris/HCl, pH 7.4, in a final volume of 500 μ l. The reaction was initiated by the addition of ATP to a final concentration of 3.0 mM. Control samplings were performed under the same conditions with the addition of 0.1 mM ouabain. The samples were incubated at 37 °C for 30 min and the incubation was stopped by adding 10% TCA with 10 mM HgCl₂. Na⁺, K⁺-ATPase activity was calculated by the difference between the two assays. Released inorganic phosphate (Pi) was measured by the method of Fiske and Subbarow (1925). Enzyme activity was expressed as nmol Pi/mg protein/min.

Protein determination

The protein concentration was measured by the method of Bradford (1976), using bovine serum albumin as the standard.

Statistical analysis

The normality of data was evaluated by the D'Agostino and Pearson omnibus normality test. The data were analyzed by one-way or two-way analysis of variance (ANOVA) followed by Newman-Keuls test. For ex vivo assays, the data were analyzed using a non-paired t-test. All analyses were performed using the GraphPad software (GraphPad software, San Diego, CA, USA). Data were expressed as mean $\pm$ standard error of the mean (S.E.M.). Probability values less than ($p < 0.05$) were considered statistically significant.

Results

Dose-response curve of antidepressant-like action of BMMS in the FST and TST

The immobility time in the FST and TST of animals treated with BMMS is shown in Fig. 2a and b, respectively. According to the results the doses of 0.1, 1 and 10 mg/kg of BMMS decreased the immobility time of mice in the FST (One-way ANOVA + Newman-Keuls test: $F_{(4,30)} = 36.96$, $p < 0.0001$) and in the TST (One-way ANOVA + Newman-Keuls test: $F_{(4,30)} = 41.20$, $p < 0.0001$), in comparison to the control group. The fluoxetine (32 mg/kg) also caused a decrease in the immobility time in the FST (Fig. 2a) and TST (Fig. 2b), when compared to the control group.

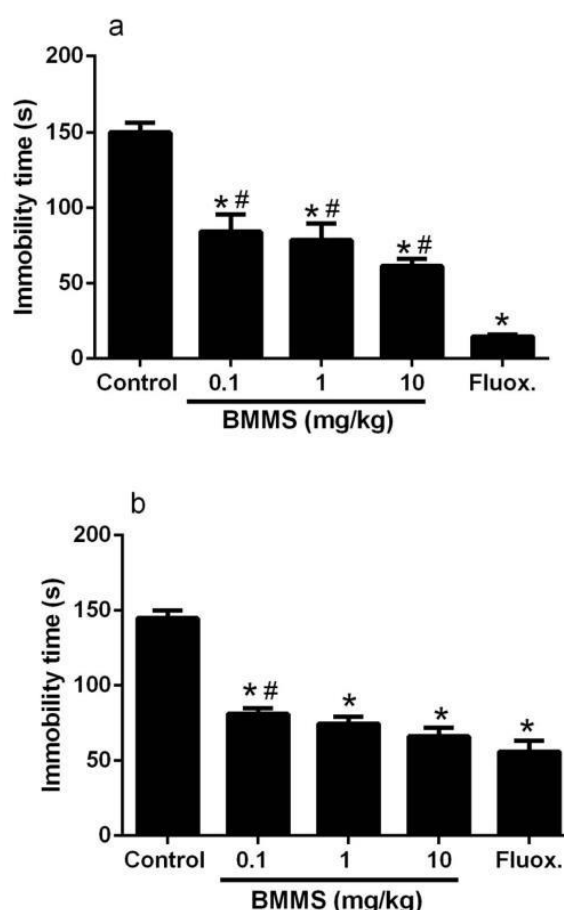


Fig. 2 Effect of ((4-*tert*-butylcyclohexylidene) methyl) (4-methoxystyryl) (BMMS) (0.1–10 mg/kg) and fluoxetine (Fluox) (32 mg/kg) in the immobility time in the FST (a) and TST (b) in mice. Values are expressed as mean $\pm$ standard error of the mean (S.E.M.) ($n = 7$). (*) denotes $p < 0.05$ as compared to the control group and (#) denotes $p < 0.05$ as compared to the Fluox treated group (one-way ANOVA followed by Newman-Keuls test)

Involvement of the 5-HT receptor subtypes on the antidepressant-like action of BMMS in the TST

Results depicted in Fig. 3a show that the pretreatment of mice with WAY100635 (a 5-HT_{1A} receptor antagonist) prevented the antidepressant-like effect of BMMS (10 mg/kg) in TST (Two-way ANOVA + Newman-Keuls test; BMMS: $F_{(1,24)} = 31.70$, $p < 0.0001$; WAY100635: $F_{(1,24)} = 12.85$, $p = 0.0015$; interaction: $F_{(1,24)} = 16.17$, $p = 0.0005$).

As shown in Fig. 3b the pretreatment of mice with, ketanserin (a 5-HT_{2A/2C} receptors antagonist) prevented the antidepressant-like effect of BMMS (10 mg/kg) in TST (Two-way ANOVA + Newman-Keuls test; BMMS: $F_{(1,24)} = 13.32$, $p = 0.0013$; ketanserin: $F_{(1,24)} = 22.93$, $p < 0.0001$; interaction: $F_{(1,24)} = 6.975$, $p = 0.0143$).

Pretreatment of mice with ondansetron (a 5-HT₃ receptor antagonist) (Fig. 3c) partially prevented the antidepressant-like effect of BMMS (10 mg/kg) in TST (Two-way ANOVA + Newman-Keuls test; BMMS: $F_{(1,24)} = 55.96$, $p < 0.0001$; ondansetron: $F_{(1,24)} = 1.456$, $p = 0.2394$; interaction: $F_{(1,24)} = 3.382$, $p = 0.0783$).

Involvement of the N-methyl-D-aspartate (NMDA) receptor on the antidepressant-like action of BMMS in the TST

Results depicted in Fig. 4. show that the pretreatment of mice with MK-801 (a non-competitive NMDA antagonist) did not reverse the reduction in immobility time elicited by BMMS (10 mg/kg) in TST (Two-way ANOVA + Newman-Keuls test; BMMS: $F_{(1,24)} = 48.23$, $p < 0.0001$; MK-801: $F_{(1,24)} = 3.022$, $p = 0.0950$; interaction: $F_{(1,24)} = 0.4124$, $p = 0.5268$).

Involvement of the L-arginine-nitric oxide (NO) pathway on the antidepressant-like action of BMMS in the TST

The results depicted in Fig. 5. show that the pre-treatment with L-arginine (a NO precursor) partially prevented the antidepressant-like effect of BMMS (10 mg/kg) in the TST (Two-way ANOVA + Newman-Keuls test; BMMS: $F_{(1,24)} = 115.7$, $p < 0.0001$; L-arginine: $F_{(1,24)} = 33.47$, $p < 0.0001$; interaction: $F_{(1,24)} = 8.476$, $p = 0.0077$).

Effect of treatments on the spontaneous locomotor activity in the open-field test (OFT)

BMMS, at all doses tested, did not produce any change in the number of crossings and rearing of the mice submitted to the OFT (Table 1). In addition, the administration of WAY100635, ketanserin, ondansetron, MK-801 or L-arginine and/or BMMS did not cause any change in the locomotor and exploratory activities assessed in the OFT (Table 1).

Ex vivo assays

MAO activity assay

As shown in Fig. 6a, BMMS (10 mg/kg) selectively inhibited the MAO-A activity in the prefrontal cortex (Non-paired T-test; $df = 12$; $t = 2.762$, $p = 0.0172$). On the other hand, the compound was not able to inhibit the activity of MAO-B (Non-paired T-test; $df = 12$; $t = 1.625$, $p = 0.1300$) (Fig. 6b) in prefrontal cortex of mice.

Na⁺, K⁺-ATPase activity assay

As verified in Fig. 7, the results demonstrated that BMMS treatment (10 mg/kg) increased the activity of the Na⁺, K⁺-ATPase in prefrontal cortex of mice (Non-paired T-test; $df = 10$, $t = 5.773$, $p = 0.0002$).

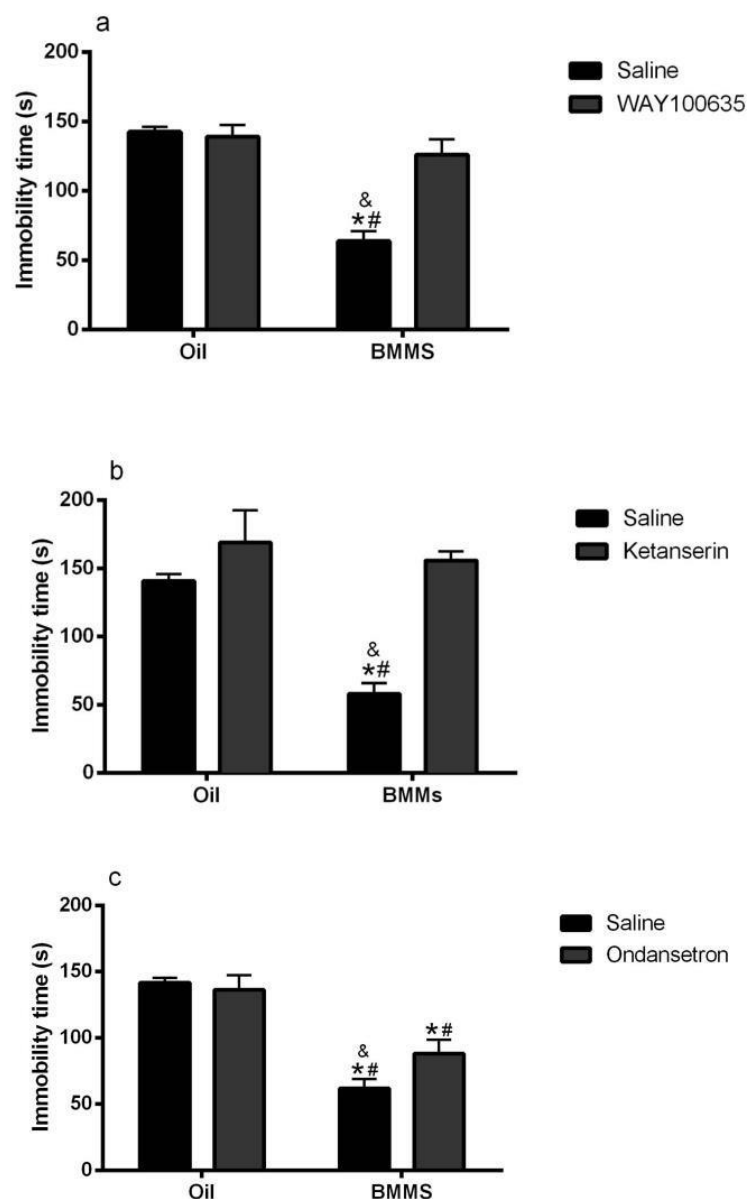
Discussion

The present study showed, for the first time, that BMMS, produced a significant antidepressant-like effect in mice. Moreover, results indicated the involvement of serotonin and L-arginine-NO pathways in this effect. Importantly, BMMS was a selective inhibitor of cerebral cortical MAO-A activity, interacting with monoaminergic system. In addition, compound increased Na⁺, K⁺-ATPase activity in the prefrontal cortex, demonstrating the involvement of this enzyme in the antidepressant-like effect of the BMMS. In this context, our results inferred that BMMS is a multi-target compound (Fig. 8).

BMMS, at low doses (0.1–10 mg/kg) was able to cause an antidepressant-like effect in TST and FST in mice. In addition, drugs used in the treatment of depression have demonstrated a reduction in the immobility time in these tests (Porsolt et al. 1977). In this way, our results demonstrated that the administration of fluoxetine (32 mg/kg), a positive control, produced an antidepressant-like action in FST and TST.

Numerous neural pathways have been involved in the pathophysiology of depression (Altamura et al. 2008). Indeed, the involvement of isolated systems in depression has been well-described, mainly serotonergic pathway (Wong and Licinio 2001; Mann 2003; Goncalves et al. 2012). However, there are mutual interactions between 5-HT and NO in a specific physiological and/or pathological condition, since NO increases the release of 5-HT and inhibits its reuptake (Jesse et al. 2008). The use of inhibitors of nitric oxide synthase (NOS), an important enzyme for NO synthesis, accentuated the effect of antidepressants already used in the clinic (Rosa et al. 2003). Importantly, neuronal nitric oxide synthase (nNOS), is expressed by a subset of 5-HT neurons in the dorsal raphe (Johnson and Ma 1993; Tagliaferro et al. 2001).

Fig. 3 Effect of WAY100635 (0.1 mg/kg, s.c.) (a), ketanserin (5 mg/kg, i.p.) (b) and ondansetron (1 mg/kg, i.p.) (c) in mice in the TST. Values are expressed as mean $\pm$ standard error of the mean (S.E.M.) ($n = 7$). (*) denotes $p < 0.05$ as compared to the control group, (#) denotes $p < 0.05$ as compared to the BMMS group and (&) denotes $p < 0.05$ as compared to the antagonist group (two-way ANOVA followed by Newman-Keuls test)

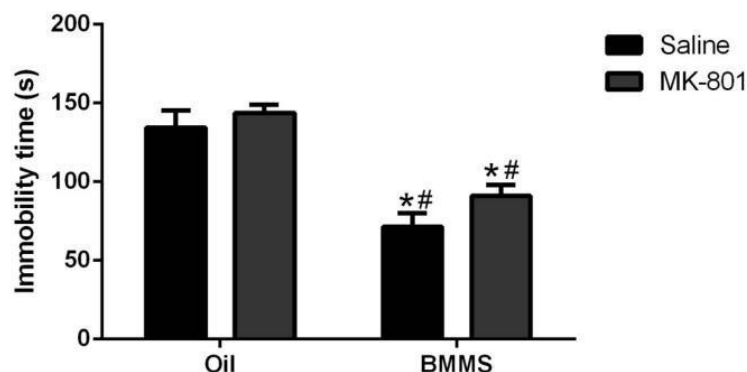


In this sense, antidepressant-like actions caused by NOS inhibitors are dependent on endogenous 5-HT, since inhibition of 5-HT synthesis blocked the antidepressant-like effects induced by systemic treatment with these drugs (Harkin et al. 2003).

In this context, this study investigated if serotonergic (through administration of different 5-HT receptor antagonists) and nitergic (through administration of a precursor of NO) pathways are involved in the antidepressant-like action of BMMS. Our results showed the involvement of both systems,

since administration of 5-HT_{1A} (WAY100635) and 5-HT_{2A/2C} (ketanserin) receptor antagonists abolished the antidepressant-like action of BMMS, while a 5-HT₃-receptor antagonist (ondansetron) and a NO precursor (L-arginine) partially abolished the antidepressant-like action of the compound. As the molecular and neurochemical aspects are not yet well known, we can not affirm exactly how BMMS interferes in the serotonergic and nitergic pathways, but this study strongly indicates the involvement of these pathways in the antidepressant-like effect of compound.

Fig. 4 Effect of MK-801 (0.01 mg/kg, i.p.) in mice in the TST. Values are expressed as mean $\pm$ standard error of the mean (S.E.M.) (n = 7). (*) denotes $p < 0.05$ as compared to the control group, (#) denotes $p < 0.05$ as compared to the BMMS group and (&) denotes $p < 0.05$ as compared to the MK-801 group (two-way ANOVA followed by Newman-Keuls test)



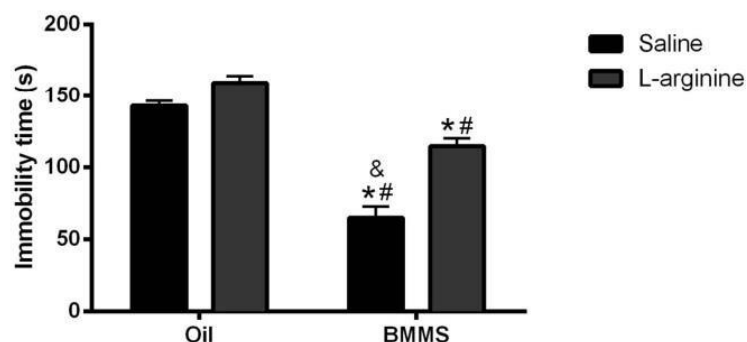
In addition, the glutamatergic theory postulates that glutamate can shape the risk of depression by influencing neuronal fate (neurotoxicity) or the unfolding of new neural networks (neuroplasticity). Indeed, NMDA receptor may be the target of some antidepressants, and glutamatergic system plays an important role in pathophysiology of depression (Haj-Mirzaian et al. 2015). NMDA activation is also known to increase neuronal nitric oxide synthase (nNOS) activity, increasing NO synthesis, mediating several behavioral responses to stress (Guimarães et al. 2005; Joca et al. 2015). For instance, systemic and intra-cerebral administration of NMDA antagonists or nNOS inhibitors induces antidepressant-like effect in different stress-based animal models (Joca et al. 2015).

Considering relationship between the serotonergic and nitrgergic system and the glutamatergic one, we evaluated the involvement of the glutamatergic system in the action of compound. Our results demonstrated that the NMDA receptor does not seem to be directly involved in the antidepressant-like effect of BMMS, which does not totally exclude the involvement of the glutamatergic system and NMDA receptor in the antidepressant-like effect of the compound. More studies are needed to investigate the glutamatergic system as a whole.

In addition, studies indicated that MAO inhibitors (MAOIs) also are being effective in the depression treatment

(Wong and Licinio 2001; Elhwuegi 2004). MAO, a mitochondrial enzyme, exists as two isoforms: MAO-A and MAO-B that differ in tissue distribution and in the type of metabolized monoamine (Shih et al. 1999). MAO has a role in degradation of the monoamines in the brain (Meyer et al. 2006) and its inactivation blocks catabolism of these neurotransmitters, increasing their concentrations in the synaptic cleft (Finberg and Rabey 2016). MAO-A is part of 5-HT system along with 5-HT transporters and 5-HT receptors. MAO-A inhibitors inhibit MAO-A catalytic activity, resulting in an elevated 5-HT concentration in the brain (Finberg and Rabey 2016; Fišar 2016). A significant increase in the levels of MAO-A is found in association with the pathogenesis of major depressive disorder (Meyer et al. 2006, 2009). Mechanistic details showed that stress-induced MAO-A expression is mediated by transcription factors, in particular, kruppel like factor 11 (KLF11) (also referred to as transforming growth factor- β -inducible early gene 2 (TIEG2)) (Grunewald et al. 2012; Harris et al. 2015; Higuchi et al. 2017). Previous evidence has characterized KLF11 as a transcriptional regulator of MAO-A (Grunewald et al. 2012). It has been suggested that KLF11 can mediate glucocorticoid-induced up-regulation of MAO-A mRNA, protein, enzymatic activities owing to the fact that (1) glucocorticoids increase KLF11 mRNA and protein levels, (2) KLF11 overexpression increases MAO-A gene expression levels and enzymatic activity, which is further promoted by

Fig. 5 Effect of L-arginine (500 mg/kg, i.p.) in mice in the TST. Values are expressed as mean $\pm$ standard error of the mean (S.E.M.) (n = 7). (*) denotes $p < 0.05$ as compared to the control group, (#) denotes $p < 0.05$ as compared to the BMMS group and (&) denotes $p < 0.05$ as compared to the L-arginine group (two-way ANOVA followed by Newman-Keuls test)



glucocorticoids, while KLF11 knockdown mediated by si-RNA decrease the MAO-A gene expression and enzymatic activity (Grunewald et al. 2012). It is also reported that glucocorticoids induce the translocation of the KLF11 protein from cytosol to the nucleus (Grunewald et al. 2012), although the molecular mechanism of the translocation remains unknown.

Here, a single administration of BMMS (10 mg/kg) was effective to selectively inhibit the MAO-A activity in prefrontal cortex of mice. On the other hand, the compound had no effect in the MAO-B activity. In fact, MAOIs are considered effective in rodent models (Pesarico et al. 2015) and in humans (Kahn et al. 1989), since they have an antidepressant effect. Our results indicate that BMMS is a selective inhibitor of the MAO-A enzyme, demonstrating that this effect may directly contribute to the antidepressant-like effect of compound in mice. This is an important advantage of BMMS in relation to antidepressant drugs used in the clinic, given that these drugs present marked side effects due to lack of selectivity for the MAO-A isoform.

Studies have shown that selective inhibition of MAO-A activity can occur due to differences in the three-dimensional arrays and substrate binding sites of MAO-A isoforms (Medvedev et al. 1996; Tsugeno et al. 1995). MAO-A has a similar affinity for most substrates with aromatic rings, but difference in the affinity among substrates was observed for MAO-B (Tsugeno and Ito 1997). In addition, the participation of the aromatic side chain in MAO-A substrate recognition was evidenced, which suggests that the π - π interaction

between the aromatic rings of the enzyme and the substrates is considered of extreme importance to explain the affinity of MAO-A for aromatic substrates (Tsugeno et al. 1995). In this way, the selective inhibition of MAO-A activity by BMMS can be attributed to the participation of its aromatic side chain with the MAO-A substrate, in addition to the fact that the BMMS has π -systems conjugated in its chemical structure could explain its MAO-A selective affinity.

In addition, we evaluated the effect of BMMS on Na^+ , K^+ -ATPase activity in an attempt to correlate its antidepressant-like effect with the activity of this enzyme. The Na^+ , K^+ -ATPase is crucial for various cellular functions, such as maintaining electrochemical gradients necessary for neuronal activity, through the active exchange of intracellular Na^+ ions by

Table 1 Effect of fluoxetine, BMMS administration and its combined treatment with serotonin antagonists, NMDA antagonist or NO precursor on spontaneous locomotor and exploratory activities in mice

Group	Crossing	Rearing
Control	85.0 $\pm$ 4.8	32.8 $\pm$ 2.7
BMMS 0.1 mg/kg	84.0 $\pm$ 5.3	34.4 $\pm$ 1.5
BMMS 1 mg/kg	91.2 $\pm$ 5.9	36.2 $\pm$ 1.7
BMMS 10 mg/kg	93.7 $\pm$ 2.7	35.1 $\pm$ 2.0
Fluoxetine	92.0 $\pm$ 8.3	33.2 $\pm$ 3.1
WAY100635	93.1 $\pm$ 1.8	40.0 $\pm$ 3.5
Ketanserin	74.6 $\pm$ 5.8	31.8 $\pm$ 4.9
Ondansetron	97.5 $\pm$ 1.2	41.3 $\pm$ 3.4
MK-801	84.8 $\pm$ 5.4	31.8 $\pm$ 2.8
L-arginine	95.5 $\pm$ 7.7	34.0 $\pm$ 4.8
BMMS + WAY100635	96.5 $\pm$ 2.8	36.1 $\pm$ 1.7
BMMS + Ketanserin	69.0 $\pm$ 8.9	25.0 $\pm$ 3.2
BMMS + Ondansetron	98.1 $\pm$ 1.8	34.3 $\pm$ 6.1
BMMS + MK-801	84.5 $\pm$ 3.0	34.7 $\pm$ 4.1
BMMS + L-arginine	110.5 $\pm$ 6.0	37.5 $\pm$ 2.8

Values are expressed as mean $\pm$ standard error of the mean (S.E.M.) ($n = 6-7$). One-way ANOVA followed by Newman-Keuls test for BMMS and fluoxetine. Two-way ANOVA for BMMS + antagonist or NO precursor, followed by Newman-Keuls test

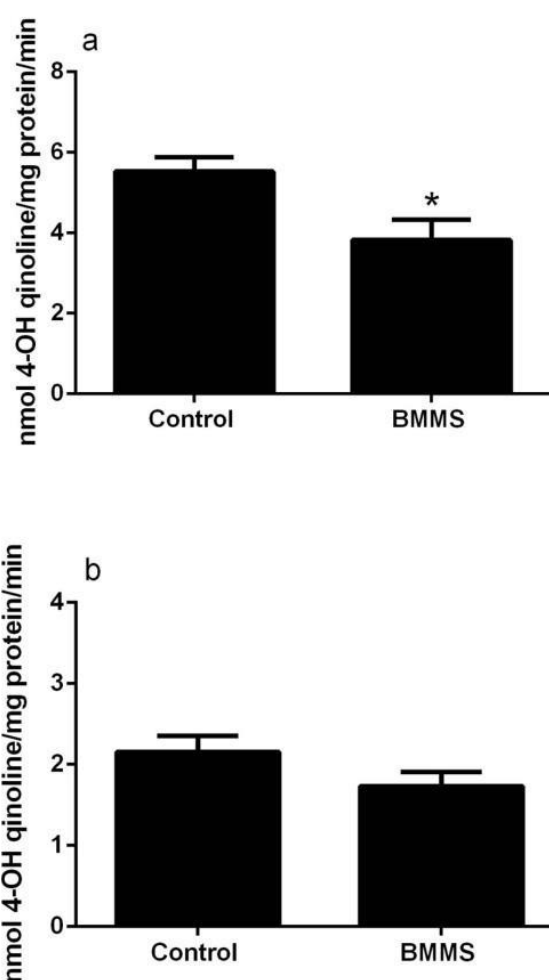


Fig. 6 Effect of ((4-*tert*-butylcyclohexylidene) methyl) (4-methoxystyryl) (BMMS) on monoamine oxidase (MAO)-A (a) and MAO-B (b) activities, in the prefrontal cortex in mice. Values are expressed as mean $\pm$ standard error of the mean (S.E.M.) ($n = 7$). (*) denotes $p < 0.05$ as compared to the control group (one-way ANOVA followed by T test)

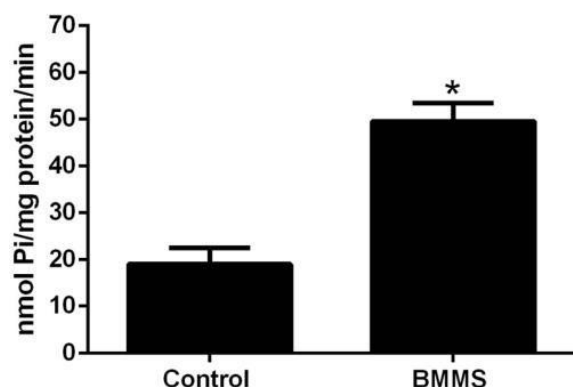


Fig. 7 Effect of ((4-*tert*-butylcyclohexylidene) methyl) (4-methoxystyryl) (BMMS) on Na^+ , K^+ -ATPase activities, in the prefrontal cortex in mice. Values are expressed as mean $\pm$ standard error of the mean (S.E.M.) ($n=6$). (*) denotes $p < 0.05$ as compared to the control group (one-way ANOVA followed by T test)

extracellular K^+ ions (Shamraj and Lingrel 1994). Genetic mutations resulting in decreased neuronal Na^+ , K^+ -ATPase activity may put individuals at risk for depression given that decreased Na^+ , K^+ -ATPase activity is observed in depressive disorders and animal models of depression (Gamaro et al. 2003; de Vasconcellos et al. 2005; Goldstein et al. 2006; Crema et al. 2010). In this context, Na^+ , K^+ -ATPase $\alpha 3$ gene expression is decreased in major and bipolar depression in the prefrontal cortex (Tochigi et al. 2008). In addition, Kirshenbaum et al. (2011) observed an interesting correlation between Na^+ , K^+ -ATPase activity and mood that may relate to both unipolar depression and bipolar disorder in Na^+ , K^+ -ATPase $\alpha 3$ heterozygous mice ($\text{Atp1a3}^{\pm}$). Moreover, data in the literature show that changes in the serotonergic system, such as 5-HT levels, may compromise enzyme activity (Carfagna et al. 1996). 5-HT is removed of the synaptic cleft by the transporters located in the presynaptic neurons through Na^+ dependent capitation, which is directly related to the activity of the enzyme Na^+ , K^+ -ATPase (Lesch et al. 1993). In

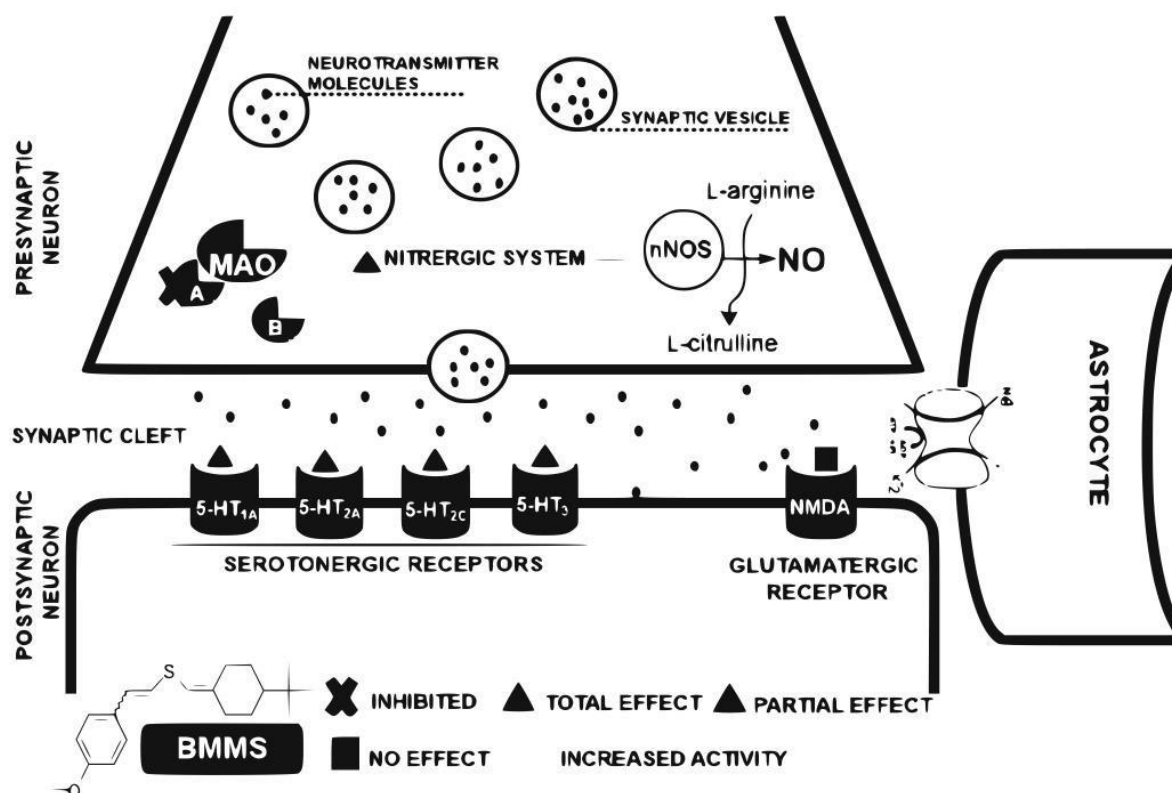


Fig. 8 Summary of action mechanism of the antidepressant-like effect of ((4-*tert*-butylcyclohexylidene) methyl) (4-methoxystyryl) sulfide (BMMS). Our results have inferred that BMMS is a multi-target compound, since several systems may be involved in the effect of this compound. BMMS modulated the 5-HT_{1A}, 5-HT_{2A/2C} and 5-HT₃ receptors, suggesting the involvement of serotonergic pathway in the antidepressant-like action of compound. The nitric pathway also

appears to be involved in the effect of BMMS by modulating the nitric oxide precursor. On the other hand, BMMS was not able to act on the glutamatergic pathway through the NMDA receptor. According to the results *ex vivo*, BMMS was able to inhibit MAO-A enzyme activity, but did not alter MAO-B activity. In addition, the BMMS was able to act on the Na^+ , K^+ -ATPase enzyme by increasing its activity

the present study, our results showed that BMMS increased Na^+ , K^+ -ATPase activity in prefrontal cortex of mice, contributing to the antidepressant-like action of this compound.

It is important to emphasize that none of the treatments caused changes in the spontaneous locomotor and exploratory activities of the mice, indicating that anti-immobility effect of BMMS cannot be due nonspecific changes, such as psychostimulant activity. In this way, this is an important result given that psychostimulant drugs may give a false positive result in animal models, such as the FST and TST (Cryan et al. 2005).

In conclusion, our study demonstrated that BMMS exerted an antidepressant-like effect in the FST and TST in mice. The results also showed that serotonergic and nitrgergic systems are involved in the antidepressant-like action of compound. According to ex vivo results, BMMS inhibited the MAO-A activity and increased the Na^+ , K^+ -ATPase activity. Our results inferred that BMMS is a multi-target compound, but further studies are needed to elucidate the other mechanisms of action and the contribution of other neurotransmission systems to antidepressant-like action of BMMS.

Acknowledgments We are grateful for the financial support and scholarships from the Brazilian agencies CNPq (UNIVERSAL 408874/2016-3), FAPERGS (PRONEM 16/2551-0000240-1, PRONUPEQ 16/2551-0000526-5 and PqG 17/2551-0001013-2). CNPq is also acknowledged for the fellowship to C.C.S., E.A.W. and C. L. This study was financed in part by the Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível superior – Brasil (CAPES) – Finance Code 001.

References

- Abreu TM, Monteiro VS, Martins ABS, Teles FB, da Conceição Rivanor R, Mota EF, Macedo DS, de Vasconcelos SMM, Júnior JERH, Benevides NMB (2018) Involvement of the dopaminergic system in the antidepressant-like effect of the lectin isolated from the red marine alga *Solieria filiformis* in mice. *Int J Biol Macromol* 111: 534–541
- Altamura AC, Dell'Osso B, Serati M, Ciabatti M, Buoli M (2008) Recent assessments on the neuro- biology of major depression: a critical review. *Riv Psichiatr* 43:185–207
- Bogatko K, Poleszak E, Szopa A, Wyska E, Wlaź P, Świąder K, Wlaź A, Doboszewska U, Rojek K, Serefko A (2018) The influence of selective A1 and A2A receptor antagonists on the antidepressant-like activity of moclobemide, venlafaxine and bupropion in mice. *J Pharm Pharmacol* 70:1200–1208
- Bradford MM (1976) A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 72:248–254
- Brocardo PS, Budni J, Kaster MP, Santos ARS, Rodrigues ALS (2008) Folic acid administration produces an antidepressant-like effect in mice: evidence for the involvement of the serotonergic and noradrenergic systems. *Neuropharmacology* 54:464–473
- Brüning CA, Souza AC, Gai BM, Zeni G, Nogueira CW (2011) Antidepressant-like effect of m-trifluoromethyl-diphenyl diselenide in the mouse forced swimming test involves opioid and serotonergic systems. *Eur J Pharmacol* 658:145–149
- Carfagna MA, Ponsler GD, Muhoberac BB (1996) Inhibition of ATPase activity in rat synaptic plasma membranes by simultaneous exposure to metals. *Chem Biol Interact* 8:53–65
- Converge C (2015) Sparse whole-genome sequencing identifies two loci for major depressive disorder. *Nature* 523:588–591
- Crema L, Schlabit M, Tagliari B, Cunha A, Simao F, Krolow R, Pettenuzzo L, Salbego C, Vendite D, Wyse AT, Dalmaz C (2010) Na^+ , K^+ ATPase activity is reduced in amygdala of rats with chronic stress-induced anxiety-like behavior. *Neurochem Res* 35: 1787–1795
- Cryan JF, Page ME, Lucki I (2005) Differential behavioral effects of the antidepressants reboxetine, fluoxetine, and moclobemide in a modified forced swim test following chronic treatment. *Psychopharmacology* 182:335–344
- Da Silva FD, Pinz MP, Oliveira RL, Rodrigues KC, Silveira CC, Jesse CR, Roman SS, Wilhelm EA, Luchese C (2017) Organosulfur compound protects against memory decline induced by scopolamine through modulation of oxidative stress and Na^+ , K^+ -ATPase activity in mice. *Metab Brain Dis* 32:1819–1828
- David DJ, Renard CE, Jolliet P, Hascoet M, Bourin M (2003) Antidepressant-like effects in various mice strains in the forced swimming test. *Psychopharmacology* 166:373–382
- De Oliveira DR, da Silva DM, Florentino IF, de Brito AF, Fajemiroye JO, da Silva DPB, da Rocha FF, Costa EA, Galdino PM (2018) Monoamine involvement in the antidepressant-like effect of β -Caryophyllene. *CNS Neurol Disord Drug Targets* 17:309–320
- De Vasconcellos AP, Zugno AI, Dos Santos AH, Nietto FB, Crema LM, Gonçalves M, Franzon R, de Souza Wyse AT, da Rocha ER, Dalmaz C (2005) Na^+ , K^+ -ATPase activity is reduced in hippocampus of rats submitted to an experimental model of depression: effect of chronic lithium treatment and possible involvement in learning deficits. *Neurobiol Learn Mem* 84:102–110
- Elhwuegi AS (2004) Central monoamines and their role in major depression. *Prog Neuro-Psychopharmacol Biol Psychiatry* 228:435–451
- Fajemiroye JO, Adam K, Jordan KZ, Alves CE, Aderoju AA (2018) Evaluation of anxiolytic and antidepressant-like activity of aqueous leaf extract of *Nymphaea lotus* Linn. In mice. *Iran J Pharm Res* 17:613–626
- Finberg JP, Rabey JM (2016) Inhibitors of MAO-A and MAO-B in psychiatry and neurology. *Front Pharmacol* 7:340
- Fišar Z (2016) Drugs related to monoamine oxidase activity. *Prog Neuro-Psychopharmacol Biol Psychiatry* 69:112–124
- Fiske CH, Subbarow Y (1925) The colorimetric determination of phosphorus. *J Biol Chem* 66:375–400
- Gamaro GD, Streck EL, Matte C, Prediger ME, Wyse AT, Dalmaz C (2003) Reduction of hippocampal Na^+ , K^+ -ATPase activity in rats subjected to an experimental model of depression. *Neurochem Res* 28:1339–1344
- Goldstein I, Levy T, Galili D, Ovadia H, Yimiyi R, Rosen H, Lichtstein D (2006) Involvement of Na^+ , K^+ -ATPase and endogenous digitalis-like compounds in depressive disorders. *Biol Psychiatry* 60:491–499
- Goncalves AE, Burger C, Amoah SK, Tolardo R, Biavatti MW, de Souza MM (2012) The antidepressant-like effect of Hedyosmum brasiliense and its sesquiterpene lactone, podoandin in mice: evidence for the involvement of adrenergic, dopaminergic and serotonergic systems. *Eur J Pharmacol* 674:307–314
- Grunewald M, Johnson S, Lu D, Wang Z, Lomberg G, Albert PR, Stockmeier CA, Meyer JH, Urrutia R, Miczek KA, Austin MC, Wang J, Paul IA, Woolverton WL, Seo S, Sittman DB, Ou XM (2012) Mechanistic role for a novel glucocorticoid-KLF11 (TIEG2) protein pathway in stress-induced monoamine oxidase a expression. *J Biol Chem* 287:24195–24206
- Guimarães FS, Beijamini V, Moreira FA, Aguiar DC, De Lucca ACB (2005) Role of nitric oxide in brain regions related to defensive reactions. *Neurosci Biobehav Rev* 29:1313–1322

- Haj-Mirzaian A, Amiri S, Kordjazy N, Rahimi-Balaei M, Haj-Mirzaian A, Marzban H, Aminzadeh A, Dehpour AR, Mehr SE (2015) Blockade of NMDA receptors reverses the depressant, but not anxiogenic effect of adolescence social isolation in mice. *Eur J Pharmacol* 750:160–166
- Harkin A, Connor TJ, Walsh M, St John N, Kelly JP (2003) Serotonergic mediation of the antidepressant-like effects of nitric oxide synthase inhibitors. *Neuropharmacology* 44:616–623
- Harris S, Johnson S, Duncan JW, Udemgba C, Meyer JH, Albert PR, Lomber G, Urrutia R, Ou XM, Stockmeier CA, Wang JM (2015) Evidence revealing deregulation of the KLF11-MAO a pathway in association with chronic stress and depressive disorders. *Neuropsychopharmacology* 40:1373–1382
- Higuchi Y, Soga T, Parhar IS (2017) Regulatory pathways of monoamine oxidase a during social stress. *Front Neurosci* 11:604
- Ianiski FR, Alves CB, Bassaco MM, Silveira CC, Luchese C (2014) Protective effect of ((4-*tert*-butylcyclohexylidene) methyl) (4-methoxystyryl) sulfide, a novel unsymmetrical divinyl sulfide, on an oxidative stress model induced by sodium nitroprusside in mouse brain: involvement of glutathione peroxidase activity. *J Pharm Pharmacol* 66:1747–1754
- Ianiski FR, Bassaco MM, Vogt AG, Reis AS, Pinz MP, Voss GT, De Oliveira RL, Silveira CC, Wilhelm EA, Luchese C (2017) Antinociceptive property of vinyl sulfides in spite of their weak antioxidant activity. *Med Chem Res* 1:1–6
- Jesse CR, Savegnago L, Nogueira CW (2008) Spinal mechanisms of antinociceptive effect caused by oral administration of bis selenide in mice. *Brain Res* 1231:25–33
- Jesse CR, Wilhelm EA, Bortolotto CF, Nogueira CW (2010) Evidence for the involvement of the serotonergic 5-HT_{2A/C} and 5-HT₃ receptors in the antidepressant-like effect caused by oral administration of bis selenide in mice. *Prog Neuro-Psychopharmacol Biol Psychiatry* 34:294–302
- Joca SR, Moreira FA, Wegener G (2015) Atypical neurotransmitters and the neurobiology of depression. *CNS Neurol Disord Drug Targets* 14:1001–1011
- Johnson MD, Ma PM (1993) Localization of NADPH diaphorase activity in monoaminergic neurons of the rat brain. *J Comp Neurol* 332:391–406
- Kahn D, Silver JM, Opler LA (1989) The safety of switching rapidly from tricyclic antidepressants to monoamine oxidase inhibitors. *J Clin Psychopharmacol* 9:198–202
- Kaster MP, Rosa AO, Santos ARS, Rodrigues ALS (2005) Involvement of nitric oxide–cGMP pathway in the antidepressant-like effects of adenosine in the forced swimming test. *Int J Neuropsychopharmacol* 8:601–606
- Kirshenbaum GS, Saltzman K, Rose B, Petersen J, Vilsen B, Roder JC (2011) Decreased neuronal Na⁺, K⁺ -ATPase activity in Atp1a3 heterozygous mice increases susceptibility to depression-like endophenotypes by chronic variable stress. *Genes Brain Behav* 10:542–550
- Krajč MC (1965) A rapid microfluorimetric determination of monoamine oxidase. *Biochem Pharmacol* 14:1683–1685
- Lesch KP, Aulakh CS, Wolozin BL, Tolliver TJ, Hill JL, Murphy DL (1993) Regional brain expression of serotonin transporter mRNA and its regulation by reuptake inhibiting antidepressants. *Brain Res Mol Brain Res* 17:31–35
- Liebenberg N, Joca S, Wegener G (2015) Nitric oxide involvement in the antidepressant-like effect of ketamine in the Flinders sensitive line rat model of depression. *Acta Neuropsychiatr* 27:90–96
- Mann J (2003) Neurobiology of suicidal behaviour. *Nature Reviews* 4:819–828
- Matsumoto T, Furuta T, Nimura Y, Suzuki O (1984) 3-(p-Hydroxyphenyl) propionic acid as a new fluorogenic reagent for amine oxidase assays. *Anal Biochem* 138:133–136
- McKenna MT, Michaud CM, Murray CJ, Marks JS (2015) Assessing the burden of disease in the United States using disability adjusted life years. *Am J Prev Med* 28:415–423
- Medvedev AE, Ivanov AS, Veselovsky AV, Skvortsov VS, Archakov AI (1996) QSAR analysis of indole analogues as monoamine oxidase inhibitors. *J Chem Inf Comput Sci* 36:664–671
- Menard C, Hodes GE, Russo SJ (2015) Pathogenesis of depression: insights from human and rodent studies. *Neurosci* 321:138–162
- Meyer JH, Ginovart N, Boovariwala A, Sagrati S, Hussey D, Garcia A, Young T, Praschak-Rieder N, Wilson AA, Houle S (2006) Elevated monoamine oxidase a levels in the brain: an explanation for the monoamine imbalance of major depression. *Arch Gen Psychiatry* 63:1209–1216
- Meyer JH, Wilson AA, Sagrati S, Miler L, Rusjan P, Bloomfield PM, Clark M, Sacher J, Voineskos AN, Houle S (2009) Brain monoamine oxidase a binding in major depressive disorder. *Arch Gen Psychiatry* 66:1304–1312
- Moretti M, Ribeiro CM, Neis VB, Bettio LEB, Rosa PB, Rodrigues ALS (2018) Evidence for the involvement of opioid system in the antidepressant-like effect of ascorbic acid. *Naunyn Schmiedeberg's Arch Pharmacol* 391:169–176
- Ostadhadi S, Imran Khan M, Norouzi-Javidan A, Chamanara M, Jazaeri F, Zolfaghari S, Dehpour AR (2016) Involvement of NMDA receptors and l-arginine/nitric oxide/cyclic guanosine monophosphate pathway in the antidepressant-like effects of topiramate in mice forced swimming test. *Brain Res Bull* 122:62–70
- Parcell S (2002) Sulfur in human nutrition and applications in medicine. *Altern Med Rev* 7:22–44
- Pesarico AP, Stangherlin EC, Mantovani AC, Zeni G, Nogueira CW (2015) 7-Fluoro-1,3-diphenylisoquinoline-1-amine abolishes depressive-like behavior and prefrontal cortical oxidative damage induced by acute restraint stress in mice. *Physiol Behav* 149:294–302
- Porsolt RD, Le Pichon M, Jalfre M (1977) Depression: a new animal model sensitive to antidepressant treatments. *Nature* 266:730–732
- Réus GZ, Abelaira HM, Tuon T, Titus SE, Ignácio ZM, Rodrigues AL, Quevedo J (2016) Glutamatergic NMDA receptor as therapeutic target for depression. *Adv Protein Chem Struct Biol* 103:169–202
- Ripoll N, David DJ, Dailly E, Hascoet M, Bourin M (2003) Antidepressant-like effects in various mice strains in the tail suspension test. *Behav Brain Res* 143:193–200
- Rosa AO, Lin J, Calixto JB, Santos AR, Rodrigues AL (2003) Involvement of NMDA receptors and L-arginine-nitric oxide pathway in the antidepressant-like effects of zinc in mice. *Behav Brain Res* 144:87–93
- Sanacora G, Zarate CA, Krystal JH, Manji HK (2008) Targeting the glutamatergic system to develop novel, improved therapeutics for mood disorders. *Nature Rev Drug Disc* 7:426–437
- Sartim AG, Brito BM, Gobira PH, Joca SRL (2019) Attenuation of glutamatergic and nitric system contributes to the antidepressant-like effect induced by capsazepine in the forced swimming test. *Behav Pharmacol* 30:59–66
- Shamraj OI, Lingrel JB (1994) A putative fourth Na⁺,K⁺-ATPase alpha-subunit gene is expressed in testis. *Proc Natl Acad Sci* 91:12952–12956
- Shih JC, Chen K, Ridd MJ (1999) Monoamine oxidase: from genes to behavior. *Annu Rev Neurosci* 22:197–217
- Silveira CC, Rinaldi F, Bassaco MM, Guadagnin RC, Kaufman TS (2011) Synthesis of (diphenylphosphinoyl) methyl vinyl sulfides, symmetric and asymmetric divinyl sulfides from bis[(diphenylphosphinoyl)methyl] sulfide. *Synthesis* 8:1233–1242
- Soto-Otero R, Méndez-Alvarez E, Hermida-Ameijeiras A, Sánchez-Sellero I, Cruz-Landeira A, Lamas ML (2001) Inhibition of brain monoamine oxidase activity by the generation of hydroxyl radicals: potential implications in relation to oxidative stress. *Life Sci* 69:879–889

5. Conclusões

Baseado nos resultados obtidos pode-se sugerir que (Figura 9):

- O BMMS exerceu um efeito do tipo antidepressivo em camundongos, em dois testes preditivos para avaliar drogas antidepressivas.
- A ação do tipo antidepressiva do composto BMMS envolve os sistemas serotoninérgico e nitrérgico.
- O mecanismo de ação do BMMS pode estar relacionado com à inibição seletiva da atividade da enzima MAO-A e ao aumento da atividade da Na^+/K^+ -ATPase.
- O BMMS não alterou as atividades locomotoras e exploratória dos animais.
- Frente a isto, os resultados inferiram que o BMMS é um composto multi-alvo, porém, mais estudos são necessários para elucidar os outros mecanismos de ação e a contribuição de outros sistemas de neurotransmissão para a ação antidepressiva do BMMS.

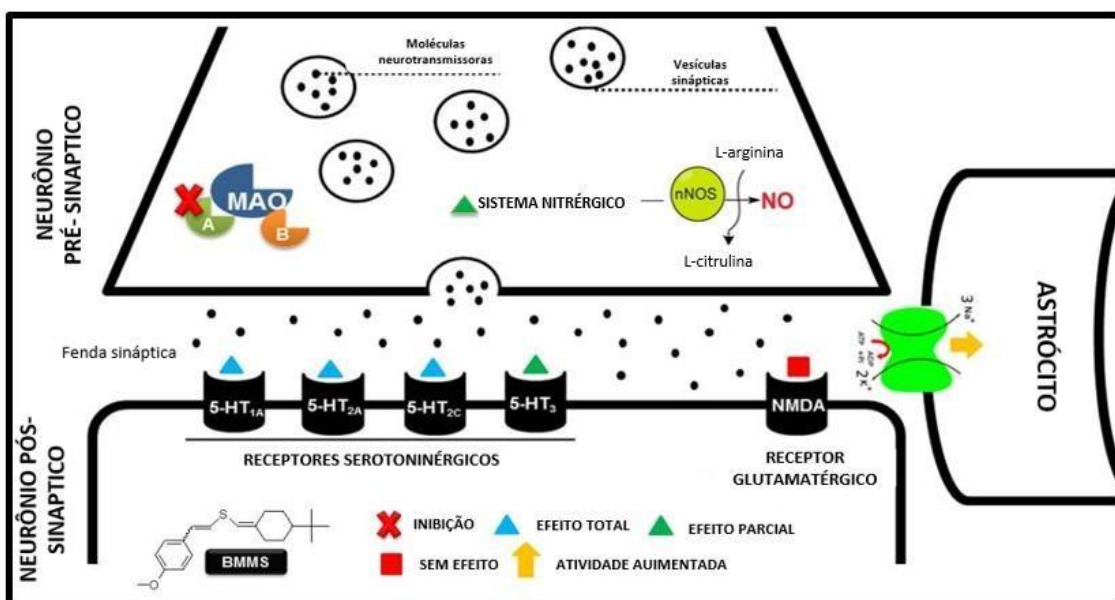


Figura 9. Representação gráfica dos resultados obtidos neste estudo. BMMS: sulfeto de [(4-terc-butilciclohexilideno) metil] (4-metoxiestiril), MAO: monoamina oxidase, NO: óxido nítrico, nNOS: óxido nítrico sintase neuronal, NMDA: N-metil D-Aspartato.

Perspectivas

Considerando os resultados obtidos e o interesse do nosso grupo de pesquisa na farmacologia de compostos organocalcogênios, pretende-se ampliar o conhecimento a respeito do efeito antidepressivo de compostos desta classe. Além disso, nosso grupo de pesquisa buscará verificar o efeito antidepressivo de compostos organocalcogênios em diferentes modelos de estresse para a indução de depressão em camundongos, além de investigar o efeito desta classe de compostos no efeito tipo ansiolítico.

Referências

AGHAJANIAN, G.K. Serotonin and the Action of LSD in the Brain. **Psychiatric Annals**, v.24, p.137-141, 1994.

ALTAMURA, A.C.; DELL'OSSO, B.; SERATI, M.; CIABATTI, M.; BUOLI, M. Recent assessments on the neuro- biology of major depression: a critical review. **Rivista di Psichiatria**, v.43, p.185–207, 2008.

ALVES, T.C.T.F. Depressão – bases biológicas e neuroanatomia. **Revista Brasileira de Saúde Pública**, 2010.

ALMAS, A.; PATEL, J.; GHORI, U.; ALI, A.; EDHI, A.I.; KHAN, M.A. Depression is linked to uncontrolled hypertension: a case-control study from Karachi, Pakistan. **Journal of Mental Health**, v. 20, p.1-5, 2014.

American Psychiatric Association (2017). Disponível em: <<https://www.psychiatry.org/patients.-families./depression/what-is-depression>>. Acesso em: 26 fev. 2019.

ANACKER, C.; ZUNSZAIN, P.A.; CARVALHO, L.A.; PARIANTE, C.M. The glucocorticoid receptor: pivot of depression and of antidepressant treatment? **Psychoneuroendocrinology**, v.36, p.415–425, 2011.

ANISMAN, H.; MERALI, Z.; HAYLEY, S. Neurotransmitter, peptide and cytokine processes in relation to depressive disorder: comorbidity between depression and neurodegenerative disorders. **Progress in Neurobiology**, v.85, p.1–74, 2018.

APERIA, A.; AKKURATOV, E.E.; FONTANA, J.M.; BRISMAR, H. Na⁺,K⁺-ATPase, a new class of plasma membrane receptors. **American Journal of Physiology-Cell Physiology**, v.310, p.491–495, 2016.

ASSIS, L.C.; REZIN, G.T.; COMIM, C.M.; VALVASSORI, S.S.; JEREMIAS, I.C.; ZUGNO, A.I.; QUEVEDO, J.; STRECK, E.L. Effect of acute administration of ketamine and imipramine on Creatine kinase activity in the brain of rats. **Brazilian Journal of Psychiatry**, v.31, p.247-252, 2009.

ATMACA, G. Antioxidant effects of sulfur-containing amino acids. **Yonsei Medical Journal**, v.45, p.776–788, 2004.

AUBRY, J.M. CRF system and mood disorders. **Journal of Chemical Neuroanatomy**, v.54, p.20-24, 2013.

BAPTISTA, P. P. Depressão experimental e tratamento agudo com cetamina: Análise comportamental, neurometabólica e histofisiológica dopaminérgica. 2015. 92 f. Tese (Ciências biológicas) - Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular - Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul, Porto Alegre.

BELMAKER, R.H.; AGAM, G. Mechanisms of disease: major depressive disorder. **New England Journal of Medicine**, v.358, p.55-68, 2008.

BELVEDERI MURRI, M.; PARIANTE, C.; MONDELLI, V.; MASOTTI, M.; ATTI, A.R.; MELLACQUA, Z.; ANTONIOLI, M.; GHIO, L.; MENCHETTI, M.; ZANETIDOU, S.; INNAMORATI, M.; AMORE, M. HPA axis and aging in depression: systematic review and meta-analysis. **Psychoneuroendocrinology**, v. 41, p.46-62, 2013.

BERTON, O.; NESTLER, E. New approaches to antidepressant drug discovery: beyond monoamines. **Nature Review- Neuroscience**, v.7, p.137-151, 2006.

BILICI, M.; EFE, H.; KÖROĞLU, M.A.; UYDU, H.A.; BEKAROĞLU, M.; DEĞER, O. Antioxidative enzyme activities and lipid peroxidation in major depression: alterations by antidepressant treatments. **Journal of Affective Disorders**, v.64, p.43-51, 2001.

BLACKBURN-MUNRO, G.; BLACKBURN-MUNRO, R.E. Chronic pain, chronic stress and depression: coincidence or consequence. **Journal of Neuroendocrinology**, v.13, p.1009-1023, 2001.

BLIER, P.; WARD, N.M. Is there a role for 5-HT_{1A} agonists in the treatment of depression. **Biological Psychiatry**, v.53, p.193–203, 2003.

BRIGITTA, B. Fisiopatologia da depressão e mecanismos de tratamento. **Journal of Clinical Neuroscience**, v.4, p.7-20, 2002.

BROWNE, C.A.; LUCKI, I. Antidepressant effects of ketamine: mechanisms underlying fast-acting novel antidepressants. **Frontiers in Pharmacology**, v.27, p.161-169, 2013.

BRÜNING, C.A.; SOUZA, A.C.; GAI, B.M.; ZENI, G.; NOGUEIRA, C.W. Antidepressant-like effect of m-trifluoromethyl-diphenyl diselenide in the mouse forced swimming test involves opioid and serotonergic systems. **European Journal of Pharmacology**, v.658, p.145–149, 2011.

CARLSON, G.A.; KASHANI, J.H. What is new in bipolar disorder and major depressive disorder in children and adolescents. **Child and Adolescent Psychiatric Clinics of North America**, v.11, p.15-22, 2002.

CAROBREZ, A. D. P. Transmissão pelo glutamato como alvo molecular na ansiedade. **Revista Brasileira de Psiquiatria**, v.25, p.52–58, 2003.

CARR, G.V.; LUCKI, I. The role of serotonin receptor subtypes in treating depression: a review of animal studies. **Psychopharmacology**, v.213, p.265-287, 2011.

CASTREN, E. Is mood chemistry? **Nature Reviews Neuroscience**, v.6, p. 241-6, 2005.

CELADA, P.; PUIG, M.; AMARGÓS-BOSCH, M.; ADELL, A.; ARTIGAS, F. The therapeutic role of 5-HT_{1A} and 5-HT_{2A} receptors in depression. **Journal of Psychiatry & Neuroscience**, v.29, p.252-265, 2004.

CHEN, X.L; KUNSCH, C. Sulforaphane inhibits TNF- α -induced activation of p38 MAP kinase and VCAM-1 and MCP-1 expression in endothelial cells. **Inflammatory Research**, v. 58, p.513–521, 2009.

COHEN, L.J. Rational drug use in the treatment of depression. **Pharmacotherapy**, v.17, p.45-61, 1997.

COPPEN, A. The biochemistry of affective disorders. **British Journal of Psychiatry**, v.113, p.1237-64, 1967.

CORDIOLI, A.V. Terapias Biológicas. **Compêndio de Psiquiatria Ciência do Comportamento e Psiquiatria Clínica**, v.36, p.1036-1226, 2007.

CORNELIUS, F.; HABECK, M.; KANAI, R.; TOYOSHIMA, C.; KARLISH, S.J.; General and specific lipid–protein interactions in Na,K-TPase. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes**, v.1848, p.1729–1743, 2015.

CRYAN, J.F.; LUCKI, I. Antidepressant-like behavioral effects mediated by 5-hydroxytryptamine 2c receptors. **Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v.295, p.1120–1126, 2000.

CRYAN, J.F.; VALENTINO, R.J.; LUCKI, I. Assessing substrates underlying the behavioral effects of antidepressants using the modified rat forced swimming test. **Neuroscience & Biobehavioral**, v.29, p.547–569, 2005.

CUMMINGS, J.L. The neuroanatomy of depression. **Journal of Clinical Psychiatry**, v.11, p.14-20, 1993.

DANTZER, R.; O'CONNOR, J.C.; FREUND, G.G.; JOHNSON, R.W.; KELLEY, K.W. From inflammation to sickness and depression: when the immune

system subjugates the brain. **Nature Reviews Neuroscience**, v.9, p.46-56, 2008.

DA SILVA, G.L.; MATTEUSSI, A.S.; SANTOS, A.R.; CALIXTO, J.B.; RODRIGUES, A.L.S. Evidence for dual effects of nitric oxide in the forced swimming test and in the tail suspension test in mice. **NeuroReport**, v.11, p.3699-3702, 2000.

DA SILVA, F.D.; PINZ, M.P.; OLIVEIRA, R.L.; RODRIGUES, K.C.; SILVEIRA, C.C.; JESSE, C.R.; ROMAN, S.S.; WILHELM, E.A.; LUCHESE, C. Organosulfur compound protects against memory decline induced by scopolamine through modulation of oxidative stress and Na⁺, K⁺-ATPase activity in mice. **Metabolic Brain Disease**, v.32, p.1819–1828, 2017.

DANIELCZYK, W.; STREIFLER, M.; KONRADI, C.; RIEDERER, P.; MOLL, G. Platelet MAO-B activity and the psychopathology of Parkinson's disease, senile dementia and multi-infarct dementia. **Acta Psychiatrica Scandinavica**, v.78, p.730–736, 1988.

DELGADO, P.L.; CHARNEY, D.S.; PRICE, L.H.; LANDIS, H.; HENINGER, G.R. Monoamines and the mechanism of antidepressant action: effects of catecholamine depletion on mood of patients treated with antidepressants. **Psychopharmacology Bulletin**, v.29, p. 389-396, 1993.

DHIR, A.; KULKARNI, S.K. Nitric oxide and major depression. **Nitric Oxide**, v.24, p.125-131, 2011.

DONG, X.; WANG, Y.; QIN, Z. Molecular mechanisms of excitotoxicity and their relevance to pathogenesis of neurodegenerative diseases. **Acta pharmacologica Sinica**, v.30, p.379–387, 2009.

DUPUY, J.M.; OSTACHER, M.J.; HUFFMAN, J.; PERLIS, R.H.; NIERENBERG, A.A. A critical review of pharmacotherapy for major

depressive disorder. **International Journal of Neuropsychopharmacology**, v. 14, p.1417-1431, 2011.

ELHWUEGI, A.S. Central monoamines and their role in major depression. **Progress in Neuro-Psychopharmacology & Biological Psychiatry**, v.28, p.435-451, 2004.

EL-MALLAKH, R.S.; WYATT, R.J. The Na,K-ATPase hypothesis for bipolar illness. **Biological Psychiatry**, v.37, p.235-44, 1995.

ERECIŃSKA, M.; SILVER, I.A. Ions and energy in mammalian brain. **Progress in Neurobiology**, v.43, p.37-71, 1994.

ERNST, E. Review: St John's wort superior to placebo and similar to antidepressants for major depression but with fewer side effects. **Evidence Based Mental Health**, v.12, p.12, 2009.

FAVA M. Diagnosis and definition of treatment-resistant depression. **Biological Psychiatry**, v.53, p.649-659, 2003.

FINBERG, J.P.; RABEY, J.M. Inhibitors of MAO-A and MAO-B in psychiatry and neurology. **Frontiers in Pharmacology**, v.7, p.340-345, 2016.

FINKEL, M.S.; LAGHRISSE-THODE, F.; POLLOCK, B.G.; RONG, J. Paroxetine is a novel nitric oxide synthase inhibitor. **Psychopharmacology Bulletin**, v.32, p.653-658, 1996.

GAMARO, G.D.; STRECK, E.L.; MATTÉ, C.; PREDIGER, M.E.; WYSE, A.T.; DALMAZ, C. Reduction of Hippocampal Na⁺, K⁺-ATPase Activity in Rats Subjected to an Experimental Model of Depression. **Neurochemical Research**, v.28, p.1339–1344, 2003

GAO, H.Q.; ZHU, H.Y.; ZHANG, Y.Q.; WANG, L.X. Reduction of cerebrospinal fluid and plasma serotonin in patients with post-stroke depression:

A preliminary report. **Clinical and Investigative Medicine**, v.31, p.351-356, 2008.

GARTHWAITE, J.; BOULTON, C.L. Nitric oxide signaling in the central nervous system. **Annual Review of Physiology**, v.57, p.683-706, 1995.

GIANNI, P.; JAN, K.J.; DOUGLAS, M.J.; STUART, P.M.; TARNOPOLSKY, M.A. Oxidative stress and the mitochondrial theory of aging in human skeletal muscle. **Experimental Gerontology**, v.39, p.1391-1400, 2004.

GONCALVES, A.E.; BURGER, C.; AMOAH, S.K.; TOLARDO, R.; BIAVATTI, M.W.; DE SOUZA, M.M. The antidepressant-like effect of Hedyosmum brasiliense and its sesquiterpene lactone, podoandin in mice: evidence for the involvement of adrenergic, dopaminergic and serotonergic systems. **European Journal of Pharmacology**, v.674, p.307–314, 2012.

GUIX, F.X.; URIBESALGO, I.; COMA, M.; MUÑOZ, F.J. The physiology and pathophysiology of nitric oxide in the brain. **Progress in Neurobiology**, v.76, p.126-152, 2005.

HAAPAKOSKI, R.; MATHIEU, J.; EBMEIER, K.P.; ALENIUS, H.; KIVIMAKI, M. Cumulative meta-analysis of interleukins 6 and 1beta, tumour necrosis factor alpha and C-reactive protein in patients with major depressive disorder. **Brain, Behavior, and Immunity**, v.49, p.206–215, 2015.

HAMON, M.; BLIER, P. Monoamine neurocircuitry in depression and strategies for new treatments. **Progress in Neuro-Psychopharmacology & Biological Psychiatry**, v.45, p.54–63, 2013.

HARKIN, A.J.; CONNOR, T.J.; WALSH, M.; JOHN, S.T.N.; KELLY, J.P. Serotonergic mediation of the antidepressant-like effects of nitric oxide synthase inhibitors. **Neuropharmacology**, v.44, p.616-623, 2003.

HARKIN, A.; CONNOR, T.J.; BURNS, M.P.; KELLY, J.P. Nitric oxide synthase inhibitors augment the effects of serotonin re-uptake inhibitors in the forced swimming test. **European Neuropsychopharmacology**, v.14, p.274-281, 2004.

HIRSCH, M.; BIRNBAUM, R.J. Selective serotonin reuptake inhibitors (SSRIs) for treating depressed adults. In: UpToDate, Basow, DS (Ed), UpToDate, Waltham, MA, 2012.

HOMBERG, JR.; SCHUBERT, D.; GASPAR, P. New perspectives on the neurodevelopmental effects of SSRIs. **Trends in Pharmacological Sciences**, v.31, p.60-65, 2010.

HOWREN, M.B.; LAMKIN, D.M.; SULS, J. Associations of depression with C-reactive protein, IL-1, and IL-6: a meta-analysis. **Psychosomatic Medicine**, v.71, p.171–186, 2009.

IANISKI, F.R.; ALVES, C.B.; BASSACO, M.M.; SILVEIRA, C.C.; LUCHESE, C. Protective effect of ((4-*tert*-butylcyclohexylidene) methyl) (4-methoxystyryl) sulfide, a novel unsymmetrical divinyl sulfide, on an oxidative stress model induced by sodium nitroprusside in mouse brain: involvement of glutathione peroxidase activity. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v.66, p.1747-1754, 2014.

IANISKI, F.R.; BASSACO, M.M.; VOGT, A.G.; REIS, A.S.; PINZ, M.P.; VOSS, G.T.; DE OLIVEIRA, R.L.; SILVEIRA, C.C.; WILHELM, E.A.; LUCHESE, C. Antinociceptive property of vinyl sulfides in spite of their weak antioxidant activity. **Medicinal Chemistry Research**, v.1, p.1-6, 2017.

IZUMI, Y.; CLIFFORD, D.B.; ZORUMSKI, C.F. Inhibition of long-term potentiation by NMDA-mediated nitric oxide release. **Science**, v.257, p.1273-1246, 1992.

JANS, L.A.; RIEDEL, W.J.; MARKUS, C.R.; BLOKLAND, A. Blokland Serotonergic vulnerability and depression: assumptions, experimental evidence and implications. **Molecular Psychiatry**, v.12, p.522-543, 2007.

JESSE, C.R.; BORTOLATTO, C.F.; SAVEGNAGO, L.; ROCHA, J.B.; NOGUEIRA, C.W. Involvement of l-arginine–nitric oxide–cyclic guanosine monophosphate pathway in the antidepressant-like effect of tramadol in the rat forced swimming test. **Progress in Neuro-Psychopharmacology & Biological Psychiatry**, v.32, p.1838-1843, 2008.

JESULOLA, E.; MICALOS, P.; BAGULEY, I.J. Understanding the pathophysiology of depression: From monoamines to the neurogenesis hypothesis model - are we there yet? **Behavioural Brain Research**, v.341, p.79-90, 2018.

JOCA, S.R.; FERREIRA, F.R.; GUIMARAES, F.S. Modulation of stress consequences by hippocampal monoaminergic, glutamatergic and nitrgic neurotransmitter systems. **Stress**, v.10, p.227-249, 2007.

JUNG, H.J.; KYUNG, K.; JUNG, Y.S; KYUNG, S.H. Synthesis and Biological Activities of Aklyl Thiosulfinates. **Journal of The Korean Society for Applied Biological Chemistry**, v.51, p.183-187, 2008.

KANDEL, E.R. Disorders of Mood: Depression, Mania, and Anxiety Disorders. **Principles of Neural Science**, v.4, p.1209-1223, 2003.

KASTER, M.P.; ROSA, A.O.; SANTOS, A.R.; RODRIGUES, A.L. Involvement of nitric oxide-cGMP pathway in the antidepressantlike effects of adenosine in the forced swimming test. **International Journal of Neuropsychopharmacology**, v.8, p.601–606, 2005.

KENDLER, K.S.; KESSLER, R.C.; WALTERS, E.E.; MACLEAN, C.; NEALE, M.C.; HEATH, A.C.; EAVES, L.J. Stressful life events, genetic liability, and onset of an episode of major depression in women. **The American Journal of Psychiatry**, v.152, p.833–842, 1995.

KISS, P.J. Theoe of active antidepressants: a nonsynaptic approach to the treatment of depression. **Neurochemistry International**, v.52, p.34-39, 2008.

KRASS, M.; WEGENER, G.; VASAR, E.; VOLKE, V. The antidepressant action of imipramine and venlafaxine involves suppression of nitric oxide synthesis. **Behavioural Brain Research**, v.218, p.57- 63, 2011.

KREISS, J.D.S.; LUCKI, I. Effects of acute and repeated administration of antidepressant drugs on extracellular levels of 5-hydroxytryptamine measured in vivo. **Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v.254, p.866–876, 1995.

KUGAYA, A.; SANACORA, G. Beyond monoamines: glutamatergic function in mood disorders. **CNS spectrums**, v.10, p.808–819, 2005.

LANZENBERGER, R.; KRANZ, G.S.; HAEUSLER, D.; AKIMOVA, E.; SAVLI, M.; HAHN, A.; MITTERHAUSER, M.; SPINDELEGGGER, C.; PHILIPPE, C.; FINK, M.; WADSAK, W.; KARANIKAS, G.; KASPER, S. Prediction of SSRI treatment response in major depression based on serotonin transporter interplay between median raphe nucleus and projection areas. **Neuroimage**, v.63, p.874-881, 2012.

LEE, J.D. Química Inorgânica não tão concisa. 5a ed., São Paulo: Edgard Blücher, 2000.

LÉVEILLÉ, F.; EL GAAMOUC, F.; GOUIX, E.; LECOCQ, M.; LOBNER, D.; NICOLE, O.; BUISSON, A. Neuronal viability is controlled by a functional relation between synaptic and extrasynaptic NMDA receptors. **Federation of American Societies for Experimental Biology**, v.22, p.4258–4271, 2008.

LI, Y.F.; ZHANG, Y.Z.; LIU, Y.Q.; WANG, H.L.; CAO, J.B.; GUAN, T.T.; LUO, Z.P. Inhibition of N-methyl-D-aspartate receptor function appears to be one of the

common actions for antidepressants. **Journal of Psychopharmacology**, v.20, p.629-635, 2006.

LI, S.X.; ZHANG, J.C.; WU, J.; HASHIMOTO, K. Antidepressant effects of ketamine on depression-like behavior in juvenile mice after neonatal dexamethasone exposure. **Clinical Psychopharmacology and Neuroscience**. v.12, p.124-127, 2014.

LI, Z.; LANGHANS, S.A. Transcriptional regulators of Na⁺,K⁺-ATPase subunits. **Frontiers in Cell and Developmental Biology**, v.3, p.164-170, 2015.

LII, C.K.; LIU, K.L.; CHENG, Y.P.; LIN, A.H.; CHEN, H.W.; TSAI, C.W. Sulforaphane and alpha-Lipoic Acid Upregulate the Expression of the pi Class of Glutathione S-Transferase through c-Jun and Nrf2 Activation. **Journal of Nutrition, Maryland**, v.140, p.885-892, 2010.

LIN, W.; WU, R.; WU, T.; KHOR, T.O.; WANG, H.; KONG, A.N. Sulforaphane suppressed LPS-induced inflammation in mouse peritoneal macrophages through Nrf2 dependent pathway. **Biochemical Pharmacology**, v.76, p.967–973, 2008.

LUNDBERG, J.; TIGER, M.; LANDÉN, M.; HALLDIN, C.; FARDE, L. Serotonin transporter occupancy with TCAs and SSRIs: a PET study in patients with major depressive disorder. **International Journal of Neuropsychopharmacology**, v.15, p.1167-1172, 2012.

MAENG, S.; ZARATE, CA.; DU, J.; SCHLOESSER, R.J.; MCCAMMON, J.; CHEN, G. Cellular mechanisms underlying the antidepressant effects of ketamine: role of alpha-amino-3-hydroxy-5-methylisoxazole-4-propionic acid receptors. **Biological Psychiatry**, v.63, p.349- 352, 2008

MAIA, L.M.; FRAZÃO, M.F.; SOUZA, T.K.; SILVA, M.B.; ROCHA-DE-MELO, A.P.; PÍCANÇO-DINIZ, C.W.; AMÂNCIO-DOS-SANTOS, A.; GUEDES, R.C. L-arginine treatment early in life influences NADPH-diaphorase neurons in visual

cortex of normal and early-malnourished adult rats. **Brain Research**, v.1072, p.19-25, 2006.

MALHI, G.S.; MANN, J. Depression. **The Lancet**, v.302, p. 2299-2312, 2018.

MANN, J. Neurobiology of suicidal behaviour. **Nature Reviews**, v.4, p.819–828, 2003.

MAURYA, P.K.; NOTO, C.; RIZZO, L.B.; RIOS, A.C.; NUNES, S.O.; BARBOSA, D.S.; SETHI, S.; ZENI, M.; MANSUR, R.B.; MAES, M.; BRIETZKE, E. The role of oxidative and nitrosative stress in accelerated aging and major depressive disorder. **Progress in Neuro-Psychopharmacology & Biological Psychiatry**, v.65, p.134-144, 2016.

MCKENNA, M.T.; MICHAUD, C.M.; MURRAY, C.J.; MARKS, J.S. Assessing the burden of disease in the United States using disability adjusted life years. **American Journal of Preventive Medicine**, v.28, p.415-423, 2015.

MENARD, C.; HODES, G.E.; RUSSO, S.J. Pathogenesis of depression: insights from human and rodent studies. **Neuroscience**, v.321, p.138-162, 2015.

MEYER, J.H.; MCNEELY, H.E.; SAGRATI, S.; BOOVARIWALA, A.; MARTIN, K.; VERHOEFF, N.P.; WILSON, A.A.; HOULE, S. Elevated putamen D2 receptor binding potential in major depression with motor retardation: an raclopride positron emission tomography study. **American Journal of Psychiatry**, v.163, p.594-602, 2006.

MILLER, A.H.; HAROON, E.; FELGER, J.C. Therapeutic implications of brain-immune interactions: treatment in translation. **Neuropsychopharmacology**, v.42, p.334–359, 2017.

MODA-SAVA, R.N.; MURDOCK, M.H.; PAREKH, P.K.; FETCHO, R.N.; HUANG, B.S.; HUYNH, T.N.; WITZTUM, J.; SHAVER, D.C.; ROSENTHAL, D.L.; ALWAY, E.J.; LOPEZ, K.; MENG, Y.; NELLISSEN, L.; GROSENICK, L.

MILNER, T.A.; DEISSEROTH, K.; BITO, H.; KASAI, H.; LISTON, C. Sustained rescue of prefrontal circuit dysfunction by antidepressant-induced spine formation. **Science**, v.12, p.364, 2019.

MONCADA, S. Nitric oxide. **Journal of Hypertension**, v.12, p.35-39, 1994.

MONTEIRO, L.B. Depressão: mecanismos envolvidos, farmacoterapia e o papel do SUS. 2016. 125 f. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Biomedicina) - Faculdade de Ciências da Educação e Saúde, Brasília.

MORENO, R.A.; MORENO, D.H.; SOARES M.B. Psicofarmacologia de antidepressivos. **Revista Brasileira de Psiquiatria**, v.21, p.24-40, 1999.

MORETTI, M.; FREITAS, A.E.; DE BUDNI, J.; FERNANDES, S.C.P.; BALEN, G.O.; RODRIGUES, A.L.S. Involvement of nitric oxide–cGMP pathway in the antidepressant-like effect of ascorbic acid in the tail suspension test. **Behavioural Brain Research**, v.225, p.328– 333, 2011.

MUSAZZI, L.; RACAGNI, G.; POPOLI, M. Stress, glucocorticoids and glutamate release: effects of antidepressant drugs. **Neurochemistry International**, v.59, p.138-149, 2011.

NAILA, A.; FLINT, S.; FLETCHER, G.; BREMER, P.; MEERDINK, G. Control of biogenic amines in food—existing and emerging approaches. **Journal of Food Science**, v.75, p.139-150, 2010.

National Institute of Mental Health - Strategic Plan (2015). Disponível em: <<http://www.nimh.nih.gov/about/strategic-planning-reports/index.shtml>>. Acesso em: 26 fev. 2019.

NEMEROFF, C.B.; OWENS, M.J. Treatment of mood disorders. **Nature Neuroscience**, v.5, p.1068-1070, 2002.

NEMEROFF, C.B. The burden of severe depression: A review of diagnostic challenges and treatment alternatives. **Journal of Psychiatric Research**, v.41, p.189-206, 2007.

NESTLER, E.J.; BARROT, M.; DILEONE, R.J.; EISCH, A.J.; GOLD, S.J.; MONTEGGIA, L.M. Neurobiology of depression. **Neuroscience**, v.34, p.13-25, 2002.

NICHOLS, D.E.; NICHOLS, C.D. Serotonin receptors. **Chemical Reviews**, v.108, p.1614-1641, 2008.

NICIU, M.J.; IONESCU, D.F.; RICHARDS, E.M.; ZARATE, C.A. Glutamate and its receptors in the pathophysiology and treatment of major depressive disorder. **Journal of Neural Transmission**, v.121, p.907-924, 2014.

OQUENDO, M.A.; HASTINGS, R.S.; HUANG, Y.Y.; SIMPSON, N.; OGDEN, R.T.; HU, X.Z. Brain serotonin transporter binding in depressed patients with bipolar disorder using positron emission tomography. **Archives Of General Psychiatry**, v.64, p.201-208, 2007.

PAOLETTI, P.; BELLONE, C.; ZHOU, Q. NMDA receptor subunit diversity: impact on receptor properties, synaptic plasticity and disease. **Nature reviews. Neuroscience**, v.14, p.383–400, 2013.

PAPAKOSTAS, G. The efficacy, tolerability, and safety of contemporary antidepressants. **Journal of Clinic Psychiatry**, v.71, p.E1:E3, 2010.

PARCELL, S. Sulfur in human nutrition and applications in medicine. **Alternative Medicine Review**, v.7, p.22-44, 2002.

PARIANTE, C.M. Depression, stress and the adrenal axis. **Journal of Neuroendocrinology**, v.15, p.811–812, 2003.

PAYKEL, E.S. The evolution of the research of life events in psychiatry. **Journal of Affective Disorders**, v.62, p.141–149, 2001.

PESARICO, A.P.; STANGHERLIN, E.C.; MANTOVANI, A.C.; ZENI, G.; NOGUEIRA, C.W. 7- Fluoro-1,3-diphenylisoquinoline-1-amine abolishes depressive-like behavior and prefrontal cortical oxidative damage induced by acute restraint stress in mice. **Physiology & Behavior**, v.149, p.294-302, 2015.

RACAGNI, G.; POPOLI, M. The pharmacological properties of antidepressants. **International Clinical Psychopharmacology**, v.25, p.118-131, 2010.

RAKJUMAR, R.; MAHESH, R. O papel auspicioso do receptor 5-HT₃ na depressão: um provável alvo neuronal? **Journal of Psychopharmacology**, v. 25, p.455-469, 2010.

RAMAMOORTHY, R.; RADHAKRISHNAN, M.; BORAH, M. Antidepressant-like effects of serotonin type-3 antagonist, ondansetron: an investigation in behaviour-based rodent models. **Behavioural Pharmacology**, v.19, p.29-40, 2008.

RAMOUTAR, R.R., BRUMAGHIM, J.L. Investigating the antioxidant properties of oxo-sulfur compounds on metal-mediated DNA damage. **Main Group Chemistry**, v.6, p.143-153, 2007

ROSE, P.; WHITEMAN, M.; MOORE, P.; ZHU, Y.Z. Bioactive S-alk(en)yl cysteine sulfoxide metabolites in the genus *Allium*: the chemistry of potential therapeutic agents. **Natural Product Report**, v.22, p.351–368, 2005.

RUF, B.M.; BHAGWAGAR, Z. The 5-HT_{1B} receptor: a novel target for the pathophysiology of depression. **Current Drug Targets**, v. 10, p.1118–1138, 2009.

SADIK, N.A.H. Effect of diallyl sulfide and zinc on cadmium-induced oxidative damage and trace elements level in the testes of male rats. **Journal of Food Biochemistry**, v.32, p.672-691, 2008.

SAMUELS, B.A.; LEONARDO, E.D.; GADIENT, R.; WILLIAMS, A.; ZHOU, J.; DAVID, D.J.; GARDIER, A.M.; WONG, E.H.; HEN, R. Modeling treatment-resistant depression. **Neuropharmacology**, v. 61, p.408-413, 2011.

SANACORA, G.; ZARATE, C.A.; KRYSTAL, J.H.; MANJI, H.K. Targeting the glutamatergic system to develop novel, improved therapeutics for mood disorders. **Nature Reviews Drug Discovery**, v.7, p.426–437, 2008.

SARGENT, P.A.; KJAE, K.H.; BENCH, C.J.; RABINER, E.A.; MESSA, C.; MEYER, J. Brain serotonin 1A receptor binding measured by positron emission tomography with [11C] WAY-100635: effects of depression and antidepressant treatment. **Archives Of General Psychiatry**, v.57, p.174–180, 2000.

SCHNEIDER, M.; LEVANT, B.; MARTIN, R.; GULBINS, E.; KORNHUBER, J.; MULLER, C.P. Lipids in psychiatric disorders and preventive medicine. **Neuroscience & Biobehavioral Reviews**, v.76, p.336-362, 2016.

SCHILDKRAUT, J. J. The catecholamine hypothesis of affective disorders: a review of supporting evidence. **American Journal of Psychiatry**, v.122, p.509-22, 1965.

SEEMAN, P.; BZOWEJ, N.H.; GUAN, H.C.; BERGERON, C.; BECKER, L.E.; REYNOLDS, G.P.; BIRD, E.D.; RIEDERER, P.; JELLINGER, K.; WATANABE, S. Human brain dopamine receptors in children and aging adults. **Synapse**, v.5, p.399-404, 1987.

SHARIQ, A.S.; BRIETZKE, E.; ROSENBLAT, J.D.; BARENDRA, V.; PAN, Z.; MCINTYRE, R.S. Targeting cytokines in reduction of depressive symptoms: A comprehensive review. **Progress in Neuro-Psychopharmacology & Biological Psychiatry**, v. 83, p.86-91, 2018.

SHELTON, R.C.; SANDERS-BUSH, E.; MANIER, D.H.; LEWIS, D.A. Elevated 5-HT 2A receptors in postmortem prefrontal cortex in major depression is associated with reduced activity of protein kinase A. **Neuroscience**, v. 158, p.1406-1415, 2009.

SKOLNICK, P.; POPIK, P.; TRULLAS, R. Glutamate-based antidepressants: 20 years on. **Trends in Pharmacological Sciences**, v.30, p.563-569, 2009.

SILVA, D.K.; ANDRADE, F.M. Farmacogenética de inibidores seletivos de recaptação de serotonina: uma revisão. **Revista Brasileira de Psiquiatria**, v.30, p.1, 2008.

STEPHENSON, F. A. Structure and trafficking of NMDA and GABAA receptors. **Biochemical Society transactions**, v.34, p.877–881, 2006.

STOCKMEIER, C.A. Involvement of serotonin in depression: evidence from postmortem and imaging studies of serotonin receptors and the serotonin transporter. **Journal of Psychiatric Research**, v.37, p.357-373, 2003.

SUZUKI, E.; YAGI, G.; NAKAKI, T.; KANBA, S.; ASAI, M. Elevated plasma nitrate levels in depressive states. **Journal of Affective Disorders**, v.63, p.221-224, 2001.

TRIVEDI, M.H.; RUSH, A.J.; WISNIEWSKI, S.R.; NIERENBERG, A.A.; WARDEN, D.; RITZ, L.; NORQUIST, G.; HOWLAND, R.H.; LEBOWITZ, B.; MCGRATH, P.J.; SHORES-WILSON, K.; BIGGS, M.M.; BALASUBRAMANI, G.K.; FAVA, M. Evaluation of outcomes with citalopram for depression using measurement-based care in STAR*D: implications for clinical practice. **American Journal of Psychiatry**, v. 163, p.28-40, 2006.

TRULLAS, R.; SKOLNICK, P. Functional antagonists at the NMDA receptor complex exhibit antidepressant actions. **European Journal of Pharmacology**, v.185, p.1-10, 1990.

VAN DER FELTZ-CORNELIS, C.M.; NUYEN, J.; STOOP, C.; CHAN, J.; JACOBSON, A.M.; KATON, W.; SNOEK, F.; SARTORIUS, N. Effect of interventions for major depressive disorder and significant depressive symptoms in patients with diabetes mellitus: a systematic review and meta-analysis. **General Hospital Psychiatry**, v.32, p.380-395, 2010.

VELASQUEZ, D.; QUINES, C.; PISTÓIA, R.; ZENI, G.; NOGUEIRA, C.W. Selective inhibition of MAO-A activity results in an antidepressant-like action of 2-benzoyl 4-iodoselenophene in mice. **Physiology & Behavior**, v.170, p.100–155, 2017.

WANG, Q., WANG, X.L., LIU, H.R., ROSE, P., ZHU, Y.Z. Protective Effects of Cysteine Analogues on Acute Myocardial Ischemia: Novel Modulators of Endogenous H₂S Production. **Antioxidants & Redox Signaling**, v.12, p.1155-1165, 2010.

WANNMACHER L. Uso Racional de Antidepressivos. In: Uso Racional de Medicamentos: temas selecionados. No 9. Ano 2011.

WHO - World Health Organization Mental health (2010). Disponível em: <http://www.who.int/topics/mental_health/en>. Acesso em: 26 fev. 2019.

WHO- World Health Organization - Depression: A global public health concern (2012). Disponível em: <http://www.who.int/mental_health/management/depression/definition>. Acesso em: 26 fevereiro 2019.

WHO- World Health Organization - Depression (2018). Disponível em: <https://www.paho.org/bra/index.php?option=com_content&view=article&id=5635:folha-informativa-depressao&Itemid=1095>. Acesso em: 22 julho 2019.

WONG, M.L.; LICINIO, J. Research and treatment approaches to depression. **Nature Reviews Neuroscience**, v.2, p.343–351, 2001.

WONG, D.T.; PERRY, K.W.; BYMASTER, F.P. Case history: the discovery of fluoxetine hydrochloride (Prozac). **Nature Reviews Drug Discovery**, v. 9, p.764-774, 2005.

YANG, L.; OMORI, K.; SUZUKAWA, J.; INAGAKI, C. Calcineurin mediated BAD Ser155 dephosphorylation in ammonia-induced apoptosis of cultured rat hippocampal neurons. **Neuroscience Letters**, v.357, p.73–75, 2004.

YOUDIM, M.B.; EDMONDSON, D.; TIPTON, K.F. The therapeutic potential of monoamine oxidase inhibitors. **Nature Reviews Neuroscience**, v.7, p.295–309, 2006.

ZAKKAR, M.; VAN DER HEIDEN, K.; LUONG, L.A.; CHAUDHURY, H.; CUHLMANN, S.; HAMDULAY, S.; KRAMS, R.; EDIRISINGHE, I.; RAHMAN, I.; CARLSEN, H.; HASKARD, D.; MASON, J.; EVANS, P. Activation of Nrf2 in endothelial cells protects arteries from exhibiting a proinflammatory state. **American Heart Association**, v.29, p.1851- 1857, 2009.

ZENG, T.; ZHANG, C.; ZHU, Z.P.; YU, L.H.; ZHAO, X.L.; XIE, K.Q. Mediated liver injury and hepatic mitochondrial dysfunction in acute ethanol-exposed mice. **Toxicology**, v.252, p.86-91, 2008.

ZENI, A.L.; ZOMKOWSKI, A.D.; DAL-CIM, T.; MARASCHIN, M.; RODRIGUES, A.L.; TASCA, C.I. Antidepressant-like and neuroprotective effects of *Aloysia gratissima*: investigation of involvement of L-arginine-nitric oxide-cyclic guanosine monophosphate pathway. **Journal of Ethnopharmacology**, v.137, p.864-874, 2011.

ZOMKOWSKI, A.D.E.; ENGEL, D.; GABILAN, N.H.; RODRIGUES, A.L.S. Involvement of NMDA receptors and L-arginine-nitric oxide-cyclic guanosine monophosphate pathway in the antidepressant-like effects of escitalopram in the forced swimming test. **European Neurophysiology**, v.20, p.793-801, 2010.

Anexos

Anexo A – Comprovação do Comitê de Ética em Experimentação Animal



Pelotas, 13 de março de 2018

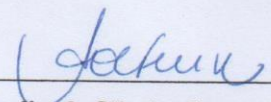
Certificado

Certificamos que a proposta intitulada “**Avaliação da atividade tipo-antidepressiva e tipo-ansiolítica de um composto orgânico de enxofre e os mecanismos envolvidos nestas ações**”, registrada com o nº 23110.008992/2017-28, sob a responsabilidade de **Cristiane Luchese** - que envolve a produção, manutenção ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto humanos), para fins de pesquisa científica (ou ensino) – encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), e recebeu parecer **FAVORÁVEL** a sua execução pela Comissão de Ética em Experimentação Animal, em reunião de 12/03/2018.

Finalidade	(X) Pesquisa () Ensino
Vigência da autorização	14/03/2018 a 01/12/2019
Espécie/linhagem/raça	<i>Mus musculus</i> /Swiss
Nº de animais	572
Idade	60 dias
Sexo	Machos
Origem	Biotério Central - UFPEL

Solicitamos, após tomar ciência do parecer, reenviar o processo à CEEA.

Salientamos também a necessidade deste projeto ser cadastrado junto ao **COBALTO** para posterior registro no **COCEPE** (código para cadastro nº **CEE A 8992-2017**).



M.V. Dra. Anelize de Oliveira Campello Felix
Presidente da CEEA

Anexo B- Autorização para publicação do artigo científico na dissertação

SPRINGER NATURE LICENSE TERMS AND CONDITIONS	
Jul 05, 2019	
This Agreement between Dr. Ethel Wilhelm ("You") and Springer Nature ("Springer Nature") consists of your license details and the terms and conditions provided by Springer Nature and Copyright Clearance Center.	
License Number	4622501158641
License date	Jul 05, 2019
Licensed Content Publisher	Springer Nature
Licensed Content Publication	Metabolic Brain Disease
Licensed Content Title	Contribution of serotonergic and nitrergic pathways, as well as monoamine oxidase-a and Na ⁺ , K ⁺ -ATPase enzymes in antidepressant-like action of ((4-tert-butylcyclohexylidene) methyl) (4-methoxystyryl) sulfide (BMMS)
Licensed Content Author	Renata L. de Oliveira, Guilherme T. Voss, Jaini J. Paltian et al
Licensed Content Date	Jan 1, 2019
Type of Use	Thesis/Dissertation
Requestor type	academic/university or research institute
Format	print
Portion	full article/chapter
Will you be translating?	no
Circulation/distribution	<501
Author of this Springer Nature content	yes
Title	Contribution of serotonergic and nitrergic pathways, as well as monoamine oxidase-a and Na ⁺ , K ⁺ -ATPase enzymes in antidepressant-like action of ((4-tert-butylcyclohexylidene) methyl) (4-methoxystyryl) sulfide (BMMS)
Institution name	Universidade Federal de Pelotas
Expected presentation date	Aug 2019
Order reference number	https://doi.org/10.1007/s11011-019-00436-x
Requestor Location	Dr. Ethel Wilhelm Victor Russumano, 250 Pelotas, 96077620 Brazil Attn: Dr. Ethel Wilhelm
Total	0.00 USD
Terms and Conditions	
Springer Nature Customer Service Centre GmbH Terms and Conditions	

This agreement sets out the terms and conditions of the licence (the **Licence**) between you and **Springer Nature Customer Service Centre GmbH** (the **Licensor**). By clicking 'accept' and completing the transaction for the material (**Licensed Material**), you also confirm your acceptance of these terms and conditions.

1. Grant of License

- 1. 1.** The Licensor grants you a personal, non-exclusive, non-transferable, world-wide licence to reproduce the Licensed Material for the purpose specified in your order only. Licences are granted for the specific use requested in the order and for no other use, subject to the conditions below.
- 1. 2.** The Licensor warrants that it has, to the best of its knowledge, the rights to license reuse of the Licensed Material. However, you should ensure that the material you are requesting is original to the Licensor and does not carry the copyright of another entity (as credited in the published version).
- 1. 3.** If the credit line on any part of the material you have requested indicates that it was reprinted or adapted with permission from another source, then you should also seek permission from that source to reuse the material.

2. Scope of Licence

- 2. 1.** You may only use the Licensed Content in the manner and to the extent permitted by these Ts&Cs and any applicable laws.
- 2. 2.** A separate licence may be required for any additional use of the Licensed Material, e.g. where a licence has been purchased for print only use, separate permission must be obtained for electronic re-use. Similarly, a licence is only valid in the language selected and does not apply for editions in other languages unless additional translation rights have been granted separately in the licence. Any content owned by third parties are expressly excluded from the licence.
- 2. 3.** Similarly, rights for additional components such as custom editions and derivatives require additional permission and may be subject to an additional fee. Please apply to Journalpermissions@springernature.com/bookpermissions@springernature.com for these rights.
- 2. 4.** Where permission has been granted **free of charge** for material in print, permission may also be granted for any electronic version of that work, provided that the material is incidental to your work as a whole and that the electronic version is essentially equivalent to, or substitutes for, the print version.
- 2. 5.** An alternative scope of licence may apply to signatories of the [STM Permissions Guidelines](#), as amended from time to time.

3. Duration of Licence

- 3. 1.** A licence for is valid from the date of purchase ('Licence Date') at the end of the relevant period in the below table:

Scope of Licence	Duration of Licence
Post on a website	12 months
Presentations	12 months
Books and journals	Lifetime of the edition in the language purchased

4. Acknowledgement

4. 1. The Licensor's permission must be acknowledged next to the Licenced Material in print. In electronic form, this acknowledgement must be visible at the same time as the figures/tables/illustrations or abstract, and must be hyperlinked to the journal/book's homepage. Our required acknowledgement format is in the Appendix below.

5. Restrictions on use

5. 1. Use of the Licensed Material may be permitted for incidental promotional use and minor editing privileges e.g. minor adaptations of single figures, changes of format, colour and/or style where the adaptation is credited as set out in Appendix 1 below. Any other changes including but not limited to, cropping, adapting, omitting material that affect the meaning, intention or moral rights of the author are strictly prohibited.

5. 2. You must not use any Licensed Material as part of any design or trademark.

5. 3. Licensed Material may be used in Open Access Publications (OAP) before publication by Springer Nature, but any Licensed Material must be removed from OAP sites prior to final publication.

6. Ownership of Rights

6. 1. Licensed Material remains the property of either Licensor or the relevant third party and any rights not explicitly granted herein are expressly reserved.

7. Warranty

IN NO EVENT SHALL LICENSOR BE LIABLE TO YOU OR ANY OTHER PARTY OR ANY OTHER PERSON OR FOR ANY SPECIAL, CONSEQUENTIAL, INCIDENTAL OR INDIRECT DAMAGES, HOWEVER CAUSED, ARISING OUT OF OR IN CONNECTION WITH THE DOWNLOADING, VIEWING OR USE OF THE MATERIALS REGARDLESS OF THE FORM OF ACTION, WHETHER FOR BREACH OF CONTRACT, BREACH OF WARRANTY, TORT, NEGLIGENCE, INFRINGEMENT OR OTHERWISE (INCLUDING, WITHOUT LIMITATION, DAMAGES BASED ON LOSS OF PROFITS, DATA, FILES, USE, BUSINESS OPPORTUNITY OR CLAIMS OF THIRD PARTIES), AND WHETHER OR NOT THE PARTY HAS BEEN ADVISED OF THE POSSIBILITY OF SUCH DAMAGES. THIS LIMITATION SHALL APPLY NOTWITHSTANDING ANY FAILURE OF ESSENTIAL PURPOSE OF ANY LIMITED REMEDY PROVIDED HEREIN.

8. Limitations

8. 1. BOOKS ONLY: Where '**reuse in a dissertation/thesis**' has been selected the following terms apply: Print rights of the final author's accepted manuscript (for clarity, NOT the published version) for up to 100 copies, electronic rights for use only on a personal website or institutional repository as defined by the Sherpa guideline (www.sherpa.ac.uk/romeo/).

9. Termination and Cancellation

9. 1. Licences will expire after the period shown in Clause 3 (above).

9. 2. Licensee reserves the right to terminate the Licence in the event that payment is not received in full or if there has been a breach of this agreement by you.

Appendix 1 — Acknowledgements:

For Journal Content:

Reprinted by permission from [the Licensor]: [Journal Publisher (e.g. Nature/Springer/Palgrave)] [JOURNAL NAME] [REFERENCE CITATION (Article name, Author(s) Name), [COPYRIGHT] (year of publication)]

For Advance Online Publication papers:

Reprinted by permission from [the Licensor]: [Journal Publisher (e.g. Nature/Springer/Palgrave)] [JOURNAL NAME] [REFERENCE CITATION (Article name, Author(s) Name), [COPYRIGHT] (year of publication), advance online publication, day month year (doi: 10.1038/sj.[JOURNAL ACRONYM].)]

For Adaptations/Translations:

Adapted/Translated by permission from [the Licensor]: [Journal Publisher (e.g. Nature/Springer/Palgrave)] [JOURNAL NAME] [REFERENCE CITATION (Article name, Author(s) Name), [COPYRIGHT] (year of publication)]

Note: For any republication from the British Journal of Cancer, the following credit line style applies:

Reprinted/adapted/translated by permission from [the Licensor]: on behalf of Cancer Research UK: : [Journal Publisher (e.g. Nature/Springer/Palgrave)] [JOURNAL NAME] [REFERENCE CITATION (Article name, Author(s) Name), [COPYRIGHT] (year of publication)]

For Advance Online Publication papers:

Reprinted by permission from The [the Licensor]: on behalf of Cancer Research UK: [Journal Publisher (e.g. Nature/Springer/Palgrave)] [JOURNAL NAME] [REFERENCE CITATION (Article name, Author(s) Name), [COPYRIGHT] (year of publication), advance online publication, day month year (doi: 10.1038/sj.[JOURNAL ACRONYM].)]

For Book content:

Reprinted/adapted by permission from [the Licensor]: [Book Publisher (e.g. Palgrave Macmillan, Springer etc)] [Book Title] by [Book author(s)] [COPYRIGHT] (year of publication)]

Other Conditions:

Version 1.2

Questions? customercare@copyright.com or +1-855-239-3415 (toll free in the US) or +1-978-646-2777.