

**UNIVERSIDADE DO EXTREMO SUL CATARINENSE  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE**

**DEISE CRISTINA VERON**

**EFEITOS COMPORTAMENTAIS E NEUROQUÍMICOS DO  
TRATAMENTO COM CETAMINA EM RATOS MACHOS E FÊMEAS  
SUBMETIDOS AO MODELO ANIMAL DE PRIVAÇÃO MATERNA**

**CRICIÚMA, DEZEMBRO DE 2020**

**DEISE CRISTINA VERON**

**EFEITOS COMPORTAMENTAIS E NEUROQUÍMICOS DO  
TRATAMENTO COM CETAMINA EM RATOS MACHOS E FÊMEAS  
SUBMETIDOS AO MODELO ANIMAL DE PRIVAÇÃO MATERNA**

Dissertação de mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde da Universidade do Extremo Sul Catarinense - UNESC, como requisito para a obtenção do título de Mestre em Ciências da Saúde

Orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Gislaine Zilli Réus  
Coorientador: Prof. Dr. João Luciano de Quevedo

**CRICIÚMA, DEZEMBRO DE 2020**

## **FOLHA INFORMATIVA**

A dissertação foi elaborada seguindo o estilo Vancouver com adaptações descritas na Resolução n. 7/2015 do Colegiado de Coordenação do Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde (PPGCS). Este trabalho foi realizado nas instalações do Laboratório de Psiquiatria Translacional, pertencente ao PPGCS da UNESC e no Laboratório de Neurobiologia de Processos Metabólicos e Inflamatórios da Universidade do Sul de Santa Catarina (UNISUL).

*“Para Célio e Leo,  
porque são parte de tudo que sou.”*

## AGRADECIMENTOS

À Deus porque ele sempre esteve à frente, porque nada fiz sozinha e por vezes foi seu colo de pai amoroso que me sustentou.

Aos meu pais, que são a razão de tudo.

Aos maiores amores da minha vida, Célio e Leonardo, meu braço forte e minha maior motivação. Amo vocês infinitamente.

À Gislaine Zilli Réus, minha orientadora e amiga, por me conduzir nesse caminho, cheio de descobertas e conquistas, por me acolher e me permitir.

À Thayse, que abriu a porta e me mostrou que eu podia voar, gratidão eterna.

Ao meu amigo Airam, que tornou tantas sextas-feiras os melhores dias da semana, ele é sempre o abraço mais fraterno em todo o campus. Amigo para a vida toda.

Aos meus irmãos de alma tão queridos que amo tanto e que estiveram comigo desde o primeiro dia Olga, Luciana, Roberta, Junior, Fêfe, Gabi e Mig, amo vocês. Estamos todos de mãos dadas desde aquele domingo à noite.

Às amigas que fiz no mestrado, as quais tenho grande admiração e carinho Carol Dagostin, Morgana, Anelise, Natalia e Anita.

À Helena Abelaira pela contribuição na construção deste trabalho.

Aos professores do PPGCS que contribuíram tão brilhantemente para que eu chegasse até aqui.

Aos meus alunos e aos amigos do trabalho que são inspiração, motivação e superação; meu coração só agradece por tudo e por tanto.

*“Os que esperam no Senhor renovam as suas forças,  
correm e não se cansam, caminham e não se fatigam”*

*Isaias 40:31*

## LISTA DE ABREVIATURAS

- ACTH - Hormônio Adenocorticotrófico (do inglês *Adrenocorticotropic hormone*)
- AMPA - ácido  $\alpha$ -amino-3-hidróxi-5-metil-4-isoxazol-propiónico (do inglês: *Aminomethylphosphonic acid*)
- ATP - Adenosina Trifosfato
- BDNF - Fator de Neutrótico-Derivado do Cérebro (do inglês *Brain-derived neurotrophic factor*)
- CAT - catalase
- CF - Córtex-Frontal
- DAMPs - Padrão Molecular Associado a Danos (do inglês *Damage-associated molecular patterns*)
- EAAT - transportador de aminoácidos excitatórios (do inglês *excitatory amino acid transporter*)
- EROs - Espécies Reativas de Oxigênio
- ERN - Espécie Reativa de Nitrogênio
- GABA - Ácido gama-aminobutírico (do inglês *Gamma-AminoButyric Acid*)
- GPx - glutaciona peroxidase
- GR - glutaciona redutase
- GST - glutaciona S transferase
- GSH - glutaciona reduzida
- 5-HT - 5-hidroxitriptamina, também chamada de Serotonina
- IDO - Enzima indoleamine-2,3Dioxigenase
- iGluR - Receptores Ionotrópicos de Glutamato (do inglês: *Ionotropic glutamate receptors*)
- IL-4 - Interleucina-4
- IL-6 - Interleucina-6
- IL-10 - Interleucina-10
- IL-23 - Interleucina-23
- IL-1 $\beta$  - Interleucina-1 $\beta$
- IL-10 - Interleucina-10
- INF- $\gamma$  - Interferon Gama
- ISRSs - Inibidores Seletivos da Recaptação da Serotonina

mGluR - Receptores Metabotrópicos de Glutamato (do inglês: *metabotropic glutamate receptors*)

MPO - mieloperoxidase

mtDNA - DNA Mitocondrial

NAC - N-acetilcisteína

NE – Norepinefrina, também chamada de Noradrenalina

NF - Fator Nuclear (do inglês *nuclear factor*)

NMDA - N-metil-D-aspartato

OMS - Organização Mundial da Saúde

PCR - Proteína C-reativa

PRR - Receptores de reconhecimento Padrão (do inglês *Pattern recognition receptors*)

SOD – Superóxido dismutase

SNC - Sistema Nervoso Central

TDM - Transtorno Depressivo Maior

TNF- $\alpha$  - Fatores de Necrose Tumoral Alfa (do inglês: *Tumor necrosis factor-alpha*)

VGLUTs - Transportadores de Glutamato Vesiculares (do inglês: *Vesicular glutamate transporters*)



## RESUMO

O transtorno depressivo maior (TDM) afeta uma porcentagem significativa da população mundial. Situações traumáticas ou estressoras no início da vida estão entre os fatores de risco mais importantes para o desenvolvimento do TDM. Estima-se que mais de um terço dos indivíduos que sofrem de TDM são resistentes ao tratamento. A cetamina, um antagonista do receptor N-metil-D-aspartato (NMDA), tem apresentado um grande avanço no tratamento do TDM, porém o mecanismo pelo qual ela exerce efeitos antidepressivos ainda não foi totalmente elucidado. Há evidências de uma relação entre estresse oxidativo bem como da neuroinflamação com a fisiopatologia do TDM. Assim, este estudo teve como objetivo avaliar os efeitos da cetamina, em parâmetros comportamentais, de estresse oxidativo e de inflamação, em cérebros de ratos machos e fêmeas submetidos ao modelo animal de privação materna (PM). Ratos Wistar machos e fêmeas foram privados dos cuidados maternos nos 10 primeiros dias de vida (três horas diárias), enquanto os animais do grupo controle de ambos os sexos (não-privados) permaneceram com suas mães. Quando adultos, os ratos machos e fêmeas foram divididos em 3 grupos experimentais: 1) controle+salina 2) privado+salina; 4) privado+cetamina (15 mg/kg). O comportamento foi avaliado através dos testes de campo aberto e de nado forçado (tempos de imobilidade, nado e escalada). Após os testes comportamentais os animais foram mortos por decapitação e o córtex frontal (CF) e o hipocampo foram removidos para análise de dano oxidativo, atividade das enzimas antioxidantes superóxido dismutase (SOD) e catalase, atividade da mieloperoxidase (MPO) e níveis de interleucina-6 (IL-6). Os resultados demonstraram que a PM induziu comportamento do tipo depressivo nos ratos machos e a cetamina foi capaz de reverter estas alterações. Nos machos houve uma diminuição da atividade exploratória no grupo privado+cetamina. O comportamento das fêmeas não foi alterado pela PM ou pelo tratamento com cetamina. A PM induziu aumento da peroxidação lipídica no CF e hipocampo dos machos e no hipocampo de fêmeas, porém o tratamento com cetamina reverteu tais efeitos somente nos machos. A carbonilação de proteínas foi aumentada no CF e hipocampo dos machos e no CF das fêmeas, sendo que a cetamina diminuiu tais efeitos. A concentração de nitrito/nitrato aumentou no CF e hipocampo dos machos e no CF das fêmeas, sendo que a cetamina diminuiu esse parâmetro somente no CF dos machos. A atividade das enzimas SOD e catalase diminuiu nas estruturas cerebrais de ratos machos e fêmeas privados e o tratamento agudo com cetamina não foi capaz de reverter essas alterações. A atividade da MPO e os níveis de IL-6 aumentaram no hipocampo de ratos machos submetidos a PM e a cetamina reverteu esse efeito. Já nas fêmeas houve alteração apenas nos níveis de MPO no CF, sendo que a cetamina reduziu a atividade nas fêmeas submetidas a PM. Os resultados sugerem que eventos estressantes no início da vida podem induzir alterações comportamentais e neuroimunes e induzir estresse oxidativo a longo prazo, porém tais efeitos dependem do sexo e da área cerebral estudada. A cetamina apresenta propriedades anti-inflamatórias e antioxidantes e pode ser considerada uma alternativa para indivíduos com TDM resistentes aos tratamentos clássicos.

**Palavras-chave:** Estresse oxidativo. Interleucina-6. Cetamina. Privação materna. Transtorno depressivo maior.

## ABSTRACT

Major depressive disorder (MDD) affects a significant percentage of the world population. Traumatic or stressful situations in early life are among the most important risk factors for the development of MDD. It is estimated that more than a third of individuals suffering from MDD are resistant to treatment. Ketamine, an N-methyl-D-aspartate (NMDA) receptor antagonist, has shown a great advance in the treatment of MDD, however the mechanism by which it exerts antidepressant effects has not yet been fully elucidated. There is evidence of a relationship between oxidative stress as well as neuroinflammation with the pathophysiology of MDD. Therefore, this study aimed to evaluate the effects of ketamine, on behavioral parameters, oxidative stress and inflammation in the brains of male and female rats submitted to the animal model of maternal deprivation (MD). Male and female Wistar rats were deprived of maternal care in the first 10 days of life (three hours daily), while the animals of both sexes in the control group (non-deprived) remained with their mothers. As adults, male and female rats were divided into 3 experimental groups: 1) control + saline 2) deprived + saline; 4) deprived + ketamine (15 mg / kg). The behavior was evaluated through open field and forced swimming tests (immobility, swimming and climbing times). After behavioral tests the animals were killed by decapitation and the frontal cortex (FC) and hippocampus were removed for analysis of oxidative damage, activity of the antioxidant enzymes superoxide dismutase (SOD) and catalase, myeloperoxidase (MPO) activity and levels of interleukin-6 (IL-6). The results showed that MD induced depressive behavior in male rats and ketamine was able to reverse these changes. In males there was a decrease in exploratory activity in the deprived + ketamine group. The females' behavior was not altered by MD or ketamine treatment. MD induced an increase in lipid peroxidation in the FC and hippocampus of males and in the hippocampus of females, however treatment with ketamine reversed these effects only in males. Protein carbonylation was increased in the FC and hippocampus of males and in the FC of females, with ketamine decreasing such effects. The concentration of nitrite / nitrate increased in the FC and hippocampus of the males and in the FC of the females, whereas the ketamine decreased this parameter only in the FC of the males. The activity of SOD and catalase enzymes decreased in the brain structures of male and female deprived rats and the acute treatment with ketamine was not able to reverse these changes. MPO activity and IL-6 levels increased in the hippocampus of male rats subjected to MD and ketamine reversed this effect. In females, there was only a change in MPO levels in the FC, with ketamine reducing the activity in females submitted to MD. The results suggest that stressful events in early life can induce long term behavioral and neuroimmune changes and induce oxidative stress, however such effects depend on sex and brain area. Ketamine has anti-inflammatory and antioxidant properties and can be considered an alternative for individuals who are resistant to classical treatments.

**Keywords:** Oxidative stress. Interleukin-6. Ketamine. Maternal deprivation. Major depressive disorder.

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO.....</b>	<b>12</b>
1.1 TRANSTORNO DEPRESSIVO .....	12
1.2 O TDM E A DIFERENÇA ENTRE OS SEXOS .....	14
1.3 REGIÕES CEREBRAIS ENVOLVIDAS NO TDM .....	15
1.4 SISTEMA GLUTAMATÉRGICO E TDM.....	16
1.5 CETAMINA E O TDM.....	19
1.6 PRIVAÇÃO MATERNA E O TDM .....	20
1.7 TDM E ESTRESSE OXIDATIVO .....	21
1.8 NEUROINFLAMAÇÃO .....	23
<b>2 OBJETIVOS.....</b>	<b>25</b>
2.1 OBJETIVO GERAL.....	25
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	25
<b>3. METODOLOGIA.....</b>	<b>26</b>
3.1 ASPECTOS ÉTICOS .....	26
3.2 PROTOCOLO DE PRIVAÇÃO MATERNA .....	26
3.3 GRUPOS EXPERIMENTAIS E TRATAMENTO FARMACOLÓGICO.....	27
3.4 TESTES COMPORTAMENTAIS .....	27
3.4.1 TESTE DE NADO FORÇADO .....	27
3.4.2 ATIVIDADE MOTORA .....	27
3.5 ANÁLISES BIOQUÍMICAS .....	28
3.6.1 DANO OXIDATIVO AOS LIPÍDIOS .....	28
3.6.2. DANO OXIDATIVO ÀS PROTEÍNAS CARBONILADAS.....	28
3.6.3. DANO OXIDATIVO ÀS PROTEÍNAS PELA AVALIAÇÃO DE INTEGRIDADE DE GRUAMENTOS SULFIDRILAS .....	28
3.6.4. NITRITO E NITRATO (N/N) .....	29
3.6.5 ATIVIDADE ENZIMÁTICA DA SUPERÓXIDO DISMUTASE (SOD) .....	29
3.6.6 ATIVIDADE ENZIMÁTICA DA CATALASE.....	30
3.6.7. NORMALIZAÇÃO DAS DOSAGENS .....	30
3.6.8 ATIVIDADE DE MIELOPEROXIDASE (MPO) .....	30
3.6.9 ANÁLISE DE CITOCINAS .....	31
3.7 ANÁLISE ESTATÍSTICA .....	31

<b>4. RESULTADOS.....</b>	<b>32</b>
4.1 EFEITOS DA PRIVAÇÃO MATERNA E DO TRATAMENTO COM CETAMINA SOBRE O COMPORTAMENTO DE RATOS WISTAR MACHOS E FÊMEAS .....	32
4.2 EFEITOS DA PRIVAÇÃO MATERNA E DO TRATAMENTO COM CETAMINA SOBRE PARÂMETROS DE DANO OXIDATIVO NO CF E HIPOCAMPO DE RATOS WISTAR MACHOS E FÊMEAS .....	33
4.3 EFEITOS DA PRIVAÇÃO MATERNA E DO TRATAMENTO COM CETAMINA SOBRE A ATIVIDADE DAS ENZIMAS ANTIOXIDANTES SOD E CAT NO CF E HIPOCAMPO DE RATOS WISTAR MACHOS E FÊMEAS .....	37
4.4 EFEITOS DA PRIVAÇÃO MATERNA E DO TRATAMENTO COM CETAMINA SOBRE PARÂMETROS INFLAMATÓRIOS NO CF E HIPOCAMPO DE RATOS WINSTAR MACHOS E FÊMEAS .....	38
<b>DISCUSSÃO .....</b>	<b>41</b>
<b>CONCLUSÃO.....</b>	<b>49</b>
<b>REFERÊNCIAS .....</b>	<b>50</b>
<b>ANEXOS.....</b>	<b>67</b>

# 1 INTRODUÇÃO

## 1.1 Transtorno Depressivo Maior

Segundo a Organização Mundial da Saúde (OMS) a depressão afeta globalmente, mais de 264 milhões de pessoas de todas as idades, o que corresponde em torno de 4,4% da população mundial (OMS, 2020). Diferente das flutuações usuais de humor e respostas emocionais de curta duração aos desafios da vida cotidiana, a depressão é um transtorno mental caracterizado por tristeza persistente e pela anedonia, acompanhadas da incapacidade de realizar atividades diárias (OMS, 2017).

De acordo com o Manual Diagnóstico e Estatístico de Doenças Mentais, V edição de 2014 da Associação Americana de Psiquiatria (DSM-V) o conceito de depressão é excessivamente abrangente e de pouca precisão; entretanto, um estudo realizado por Vandeleur et al. (2017), observando a prevalência e correlatos dos principais transtornos depressivos e relacionados do DSM-V na comunidade, revelou que dentre os transtornos de humor, o transtorno depressivo maior (TDM) é encontrado em 28,2% da população ao longo da vida. Briley e Moret (2000) destacam que o transtorno clínico é heterogêneo, entretanto indivíduos do sexo feminino apresentam maior suscetibilidade. Em dados publicados pela OMS no ano de 2017 o Brasil liderava o ranking de países da América do Sul em números de indivíduos diagnosticados com TDM, correspondente a 11 milhões de pessoas afetadas. Tal condição psiquiátrica, pode ser duradoura ou recorrente, prejudicando substancialmente a capacidade de um indivíduo de atuar em suas atividades de vida, o que resulta em alta taxa de morbidade e mortalidade, tornando-se um problema de saúde pública. Larsen et al. (2010) ainda ressaltam que o TDM resulta em perda na qualidade de vida das pessoas.

A persistência de sintomas como humor deprimido e perda de interesse ou prazer no período de duas semanas são indícios do desencadeamento do TDM, porém, a somatória de outros fatores deverá estabelecer o diagnóstico (DSM-V, 2014). Desta forma, a insônia, a perda de energia e de apetite, distúrbios do sono, agitação ou retardo psicomotor, diminuição da energia, sentimentos de inutilidade e culpa e/ou ideação suicida poderão juntamente com os sinais anteriormente citados caracterizar o TDM. Para o diagnóstico, os sintomas devem ser persistentes e ainda causar prejuízo significativo do funcionamento social, profissional e pessoal (Larsen

et al.,2010). Além disso, é importante considerar o impacto econômico e social resultantes do grande número de indivíduos acometidos pela depressão em todas as suas formas (Nemeroff e Owens, 2002).

Múltiplos fatores estão envolvidos com o desenvolvimento do TDM dentre estes, fatores genéticos e não genéticos. O estresse, traumas afetivos e infecções virais são fatores que influenciam no desenvolvimento do transtorno, porém seus mecanismos fisiopatológicos não estão totalmente elucidados (Nemeroff e Owens, 2002). Acredita-se que a fisiopatologia do TDM seja decorrente de uma alteração nos sistemas de neurotransmissores monoaminérgicos, tais como a serotonina (5-HT), a dopamina e a noradrenalina (NE), os quais apresentam grande importância na neuroplasticidade e regulação do humor. Entretanto, o longo período de uma resposta terapêutica nos pacientes leva a hipótese de que outros sistemas estejam envolvidos com a neurobiologia do TDM. De fato, estudos mostram que outras vias, principalmente as que estão envolvidas com a neuroplasticidade e com a sinalização e sobrevivência celular poderiam direta ou indiretamente ser responsáveis pela desregulação do humor, assim como pelo mecanismo de ação dos fármacos antidepressivos (Réus et al., 2013a, 2014b; Abelaira et al., 2013a; Abelaira et al., 2014b; Hoyo-Becerra et al., 2014).

Em função da variabilidade das características do TDM, observa-se grande dificuldade para determinar a etiologia da doença, e conseqüentemente na decisão médica quanto a utilização de fármacos como forma de tratamento. Contudo, a partir de 1960 após o descobrimento da eficácia do mecanismo de ação dos antidepressivos, foram propostas hipóteses mais complexas, focalizando as alterações em múltiplos sistemas de neurotransmissão e às adaptações celulares e moleculares aos medicamentos antidepressivos (Belmaker, 2008).

A deficiência ou desequilíbrio nos neurotransmissores monoaminérgicos, tais como dopamina, 5-HT e NE amparam a utilização de agentes terapêuticos, inibidores da monoamina oxidase e inibidores seletivos da recaptação da serotonina (ISRSs) que promovem o aumento do conteúdo sináptico dos neurotransmissores monoaminérgicos (Morilak, 2004).

Muito embora a ação dos fármacos esteja envolvida com a modulação dos neurotransmissores monoaminérgicos e sua utilização represente geralmente resultados seguros e efetivos, sua ação em longo prazo ainda não está totalmente elucidada e, um terço dos pacientes que sofrem de TDM, é resistente ao tratamento

e para a maioria destes, o uso de antidepressivos monoaminérgicos está inadequado (Trivedi et al., 2006). Assim, é evidente a necessidade da elaboração e utilização de inovadoras terapias, com o objetivo de promover mecanismos de ação com maior eficácia no tratamento do TDM (Lapidus et al., 2013).

## **1.2 O TDM e a diferença entre os sexos**

A distinção entre homens e mulheres, no que diz respeito aos sintomas, assim como aspectos epidemiológicos, clínicos e terapêuticos relacionados ao TDM tem sido um tema evidente para fundamentar o manejo clínico do indivíduo acometido (Angst et al., 2002).

Algumas evidências apontam para ação do estrogênio como fator que distingue a suscetibilidade das mulheres para o TDM, considerando que o hormônio é sintetizado nos ovários, placenta, tecido adiposo e cérebro. Assim, pode contribuir nas alterações de humor e na cognição, atuando não só no hipotálamo, mas também no hipocampo e cerebelo (Li e Shen, 2005).

As múltiplas ações do estrogênio no sistema nervoso central (SNC) estão relacionadas com arborização dendrítica, sinaptogênese e modulação da produção e liberação de neurotransmissores assim como, a proteção contra citotoxicidade glutamatérgica (Li e Shen, 2005).

Muito embora a mulher apresente benefícios relacionados a ação do estrogênio, sua carga de estresse tende a ser maior. Entretanto, os fatores que agem ou agravam os sinais depressivos, ainda precisam ser elucidados (Aube et al., 2000; Martire et al., 2000)

Um estudo realizado por Cavanagh et al. (2016) observou que ao contrário das mulheres deprimidas, os homens deprimidos tendem a relatar sintomas alternativos que não estão listados como critérios de diagnóstico padrão. Desta forma, o diagnóstico do TDM em homens pode ser comprometido.

Em uma pesquisa que utilizou dados da *National Comorbidity Survey Replication* (NCS-R), Lisa et al. (2013), argumentam que os homens podem experimentar sintomas alternativos de depressão, parte porque os sintomas depressivos tradicionais como humor deprimido e anedonia, estão em desacordo com os ideais sociais de masculinidade. Os homens podem relutar em relatar esses sintomas.

Através de uma revisão sistemática Cavanagh et al. (2017), observaram que a grande maioria de homens diagnosticados com TDM, apresentavam comportamento agressivo, e uso indiscriminado de álcool e drogas. Labaka et al. (2018) observaram diferentes padrões biológicos em pessoas com TDM, dependendo do sexo. Especificamente, as mulheres apresentaram níveis mais elevados de marcadores inflamatórios, neurotróficos e serotoninérgicos e uma correlação mais forte entre os níveis de alguns fatores inflamatórios e neurotróficos e a gravidade dos sintomas.

Em pesquisa realizada por Jentsch et al. (2020), sobre diferenças de gênero no desenvolvimento de diagnósticos de TDM com base em biomarcadores, evidenciaram diferenças nos níveis de biomarcadores entre homens e mulheres. Dos 28 biomarcadores, 21 foram significativamente diferentes entre os gêneros. Tal resultado pode impactar a classificação precisa do TDM, quando o gênero não é levado em consideração.

### **1.3 Regiões cerebrais envolvidas no TDM**

Durante as últimas décadas, estudos de neuroimagem *in vivo* permitiram insights significativos sobre a localização geral de regiões cerebrais disfuncionais no TDM. Em paralelo, outros estudos neuroanatômicos, farmacológicos e bioquímicos de tecido cerebral *post-mortem* estão permitindo novos insights sobre a fisiopatologia do TDM (Stockmeier et al., 2004).

No TDM, as regiões cerebrais mais estudadas são as áreas frontais e suas conexões, bem como as áreas temporais (Rozenhal et al., 2004). O córtex frontal (CF) se destaca, pois, mantém íntima relação com as vias límbicas implicadas com a regulação dos aspectos emocionais (Rozenhal et al., 2004). Estudos *post mortem* mostraram que indivíduos deprimidos apresentaram uma diminuição na espessura cortical, tamanho neuronal e perda de células da glia nas camadas II-IV do córtex orbito frontal rostral (Coryell et al., 2005; Wilczyńska et al., 2018). Assim como, reduções gliais e neuronais, em todas as camadas do CF dorsolateral bem como redução do tamanho e perda de células da glia no CF subgenuar, características associadas ao TDM (Stockmeier et al. 2004).



As projeções do sistema de neurotransmissão monoaminérgico no CF e as anormalidades em seus receptores, transportadores e sistemas de segundo mensageiros são também descritas no TDM (Mintun et al., 2000).

Exames de imagem como ressonância magnética realizados em pacientes deprimidos, mostram significativa redução do volume do hipocampo, em comparação a indivíduos saudáveis (Sheline et al., 1996, 1999; Shah et al., 1998; Bremner et al., 2000; Bell-McGinty et al., 2002; MacQueen et al., 2003). Achados desta natureza parecem estar relacionados com a associação entre a depressão aguda e disfunções na memória declarativa e memória de recordação (Mac-Queen et al., 2003).

A amígdala, estrutura localizada na região antero-inferior do lobo temporal cerebral também vem sendo amplamente estudada nos transtornos afetivos devido a sua importância com o aprendizado emocional (Wilczyńska et al., 2018); e ainda, diferentemente do CF e do hipocampo, a amígdala apresenta a atividade e a morfologia aumentadas em pacientes diagnosticados com TDM (Drevets, 2003).

O núcleo accumbens também é um importante estrutura relacionada com os efeitos do TDM; faz parte da composição do núcleo estriado ventral, e se destaca como estrutura cerebral na qual a neuroplasticidade pode estar relacionada aos efeitos do estresse e aos sintomas depressivos. O núcleo accumbens, ainda desempenha um papel central nos mecanismos de defesa natural, pois alterações nessas estruturas estão relacionadas ao TDM, principalmente aos sintomas de anedonia (Dunn et al., 2002; Nestler e Carlezon, 2006). O estresse agudo e crônico, podem exercer diversos efeitos nas diferentes funções e regiões cerebrais, este dado tem grande relevância para melhor compreensão da fisiopatologia do TDM.

#### **1.4 Sistema glutamatérgico e TDM**

Dentre os neurotransmissores envolvidos com o TDM, destaca-se o glutamato, principal neurotransmissor excitatório do SNC. O glutamato desempenha importante função na plasticidade sináptica, no aprendizado e na memória, entre outros processos (Pitsillou et al., 2020). Alguns estudos observaram que através de mecanismos intracelulares, o glutamato provoca alterações na eficiência sináptica, transcrição gênica e morfologia neural. Entretanto, o glutamato também possui papel fundamental no mecanismo de algumas doenças neurodegenerativas, tais como

doença de Alzheimer e doença de Parkinson (Kind e Neumann, 2001; Pitsillou et al., 2020).

O glutamato é sintetizado nos terminais pré-sinápticos, predominantemente a partir da glutamina através da ação da enzima glutaminase, mas pode provir do  $\alpha$ -cetoglutarato, via glutamato desidrogenase e  $\alpha$ -cetoglutarato aminotransferase (Pál B, 2018).

O excesso do glutamato na fenda sináptica resulta em excitotoxicidade e pode levar a estimulação excessiva dos receptores glutamatérgicos com consequente morte neuronal (Sattler, 2006). Entretanto, a ação excitatória do glutamato é finalizada através da sua captação pelas células gliais ou pelos neurônios pré-sinápticos, onde é armazenado em vesículas sinápticas (Pál B, 2018).

A liberação do glutamato na fenda sináptica se dá a partir do empacotamento do glutamato em vesículas sinápticas cálcio-dependentes através dos transportadores de glutamato vesiculares (VGLUTs, (do inglês: *Vesicular glutamate transportes*) (Figura 1) (Meloni et al., 1993). Em seguida, as proteínas do complexo SNARE (*soluble N-ethylmaleimide-sensitive factor [NSF]- attachment protein receptor*) promovem sua exocitose para a fenda sináptica (Lesch et al., 2002) permitindo sua ligação a receptores ionotrópicos (iGluR, do inglês: *Ionotropic glutamate receptors*) e metabotrópicos (mGluR, do inglês: *metabotropic glutamate receptors*).

Os receptores iGluR são subdivididos em receptores N-metil-D-aspartato (NMDA), ácido-alfa-amino-3-hidroxi-5-metil-isoxosol-4-propiónico (AMPA, do inglês: *Aminomethylphosphonic acid*) e cainato. Estes possuem canais iônicos com condutância seletiva para  $\text{Ca}^{2+}$  e  $\text{Na}^{+}$ . Uma vez, ativados, ocorre o influxo desses cátions favorecendo a despolarização do neurônio (Dingledine et al., 1999). Já os mGluR iniciam sua cascata de transdução de sinal através de seu acoplamento a proteína G, e dessa forma, são divididos em três grupos: grupo I (mGluR1 e mGluR5), grupo II (mGluR2 e mGluR3) e grupo III (mGluR4, mGluR6, mGluR7, mGluR8) (Pilc et al., 2008).

Nas últimas décadas, houve maior foco no neurotransmissor excitatório. A excitação glutamatérgica e a sinalização do receptor NMDA desempenham um papel central na fisiopatologia do TDM (Niciu et al., 2014; Ghasemi et al., 2014).

Um estudo *post-mortem* realizado por Hashimoto et al. (2007), evidenciou o aumento dos níveis corticais de glutamato em pacientes com TDM. Auer et al. (2000) demonstraram diminuição nos níveis de glutamato, glutamina e Ácido Gama-

Aminobutilico (GABA, do inglês *Gamma-AminoButyric Acid*) em pacientes diagnosticados com TDM, e ainda; Sanacora et al. (2004; 2008) também observaram em indivíduos igualmente diagnosticados com TDM, um aumento do glutamato cortical juntamente com uma diminuição nos níveis de (GABA), além de uma alteração nos receptores (NMDA) e (AMPA) em algumas áreas cerebrais. É crescente o corpo de evidências que caracterizam a disfunção na neurotransmissão glutamatergica particularmente na via de receptores (NMDA), relativos a neurobiologia do TDM (Amidfar et al., 2019).

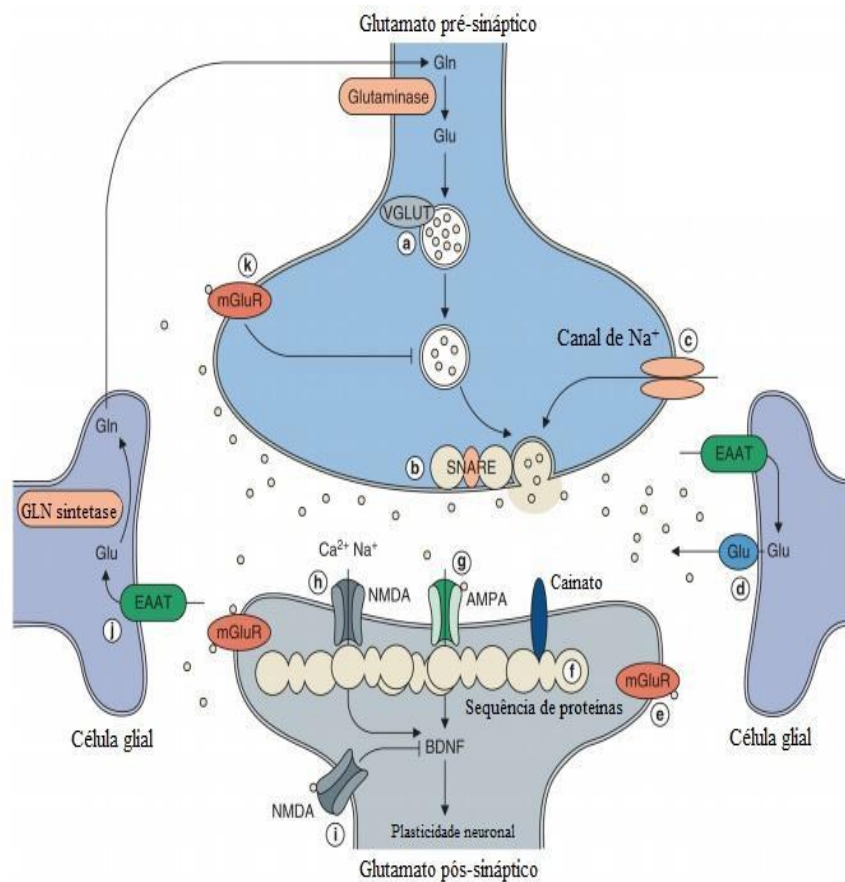


Figura 1: Representação da sinapse glutamatérgica. A glutaminase converte a glutamina (Gln) em glutamato (Glu). Após o empacotamento do glutamato em vesículas pré-sinápticas através dos transportadores de glutamato vesiculares (VGLUTs), ocorre sua liberação na fenda sináptica possibilitando ligação do glutamato aos seus receptores mGluR ou iGluR. O glutamato do espaço extracelular poderá ser recaptado para o interior do neurônio pré-sináptico ou para a célula glial através de transportadores de aminoácidos excitatórios (EAAT, do inglês *excitatory amino acid transporter*). Os EAATs estão presentes em astrócitos e em neurônios. Nos astrócitos o glutamato é convertido em glutamina (Gln), que é liberada no espaço extracelular e captada pelos neurônios onde novamente será convertida em glutamato (Adaptado de Niciu et al., 2012).

É de grande relevância clínica os agentes direcionados aos sistemas glutamatérgico e gabaérgico, uma vez que exibem uma resposta rápida em relação aos antidepressivos convencionais. Os fármacos de resposta rápida têm o potencial

de transformar o tratamento do TDM, demonstrando redução dos sintomas depressivos de forma rápida, em oposição às semanas observadas com antidepressivos convencionais. A busca pela descoberta de agentes moduladores do sistema glutamatérgico pode ser uma alternativa promissora no tratamento do TDM (Raguett et al., 2019).

### **1.5 Cetamina e o TDM**

A cetamina é referida na literatura como um “anestésico dissociativo”, em função da perda sensorial marcante na analgesia, amnésia e paralisia do movimento, sem perda real da consciência. É derivada do cloridrato de fenciclidina (Micallef et al., 2003).

O uso da cetamina é observado em casos de trauma e em procedimentos cirúrgicos de emergência, bem como na medicina veterinária (Wagner et al., 2002). A cetamina interage com vários tipos de receptores em diversos locais de ligação, incluindo os receptores de glutamato, tanto NMDA quanto não-NMDA; opióides; gabaérgicos; serotoninérgicos; além de agir, direta ou indiretamente, sobre as monoaminas: 5-HT, NE e dopamina (Wagner et al., 2002).

A cetamina apresenta duas formas isoméricas, a S (+) e R (-), que apresentam propriedades farmacológicas diferentes (Luft e Mendes, 2005). A cetamina S (+) apresenta mais afinidade ao sítio fenciclidina no receptor NMDA (Pfenninger et al., 2002). Com a disponibilidade do isômero S (+) e o potencial de causar menos efeitos psicomiméticos, a cetamina tem sido amplamente utilizada também pelas suas propriedades antidepressivas.

Berman et al. (2000), demonstraram em estudo que a cetamina foi capaz de inibir o receptor NMDA e que infusões sub-anestésica de cetamina (0,5 mg/kg durante 40 minutos) diminuiram os sintomas depressivos em pacientes resistentes a outros tratamentos.

O efeito da cetamina nos neurônios glutamatergicos e gabaérgicos emergiu de estudos pré-clínicos realizados a mais de uma década (Harrasz et al., 2016). Segundo Lener et al. (2017), os esforços atuais concentram-se em ampliar a eficácia antidepressiva da cetamina, descobrindo os mecanismos neurobiológicos responsáveis pela atividade antidepressiva da cetamina em subgrupos biologicamente enriquecidos e biomarcadores de resposta ao tratamento para

personalizar a seleção de antidepressivos.

A cetamina antagoniza os receptores NMDA nos interneurônios gabaérgicos e esta ação desinibe os neurônios glutamatérgicos corticais (Homayoun et al., 2007), enquanto sua ação nos neurônios pós-sinápticos aumenta a síntese de fatores de crescimento intracelulares, como o fator neurotrófico-derivado do cérebro (BDNF, do inglês *Brain-derived neurotrophic factor*) que desempenha um papel fundamental na plasticidade neuronal e memória, e conseqüentemente na saúde celular (Li et al., 2010a; 2011b).

Evidências sugerem que a administração aguda e crônica de cetamina exerce efeitos antidepressivos rápidos e prolongados em distintos modelos animais de depressão, tais como o teste do desamparo aprendido, teste de nado forçado e anedonia (Chatuverdi et al., 2001; Garcia et al., 2008a, b; Maeng e Zarate, 2008; Réus et al., 2015a).

Modelos animais são importantes ferramentas para investigação da neurobiologia do TDM bem como de alvos terapêuticos para seu tratamento (Abelaira et al., 2013). Em experimento realizado por Réus et al. (2015), a privação materna causou comportamento depressivo em ratos adultos e o tratamento com a cetamina reverteu alterações no tempo de imobilidade. Um estudo realizado por Garcia et al. (2008), apresentou efeitos semelhantes. Entretanto, apesar de a cetamina ter apresentado eficácia terapêutica em diversos estudos, os mecanismos moleculares responsáveis por tais efeitos antidepressivos ainda não foram totalmente elucidados, especialmente no que refere as diferenças relacionadas a sexo.

## **1.6 Privação materna e o TDM**

Modelos animais de privação materna têm sido amplamente utilizados em estudos, pois apresentam uma importante correlação com distúrbios humanos relacionados ao estresse e ao TDM (Farkas et al., 2009).

Em mamíferos, o início da vida consiste nos cuidados maternos. Para animais recém nascidos, a separação precoce corresponde à um evento traumático que pode promover alterações comportamentais e neuroquímicas no animal na idade adulta (Vetulani et al., 2013).

Inúmeros estudos realizados na última década demonstraram que estressores perinatais observados em modelos animais de privação materna, podem induzir a

mudanças comportamentais assim como alterações bioquímicas no animal adulto e vem demonstrando uma relação entre a neuroinflamação e o desenvolvimento de comportamento depressivo (Giridharan et al., 2019).

Um estudo realizado por Réus et al. (2010), observou aumento nos níveis do hormônio adrenocorticotrófico (ACTH, do inglês *Adrenocorticotropic hormone*) em ratos submetidos a privação materna em comparação ao grupo não privado. O mesmo estudo evidenciou ainda, a redução dos níveis do fator neurotrófico derivado do cérebro (BDNF) tanto no hipocampo quanto na amígdala dos ratos privados da mãe em comparação ao grupo controle. Tais evidências apoiam a ideia de que alterações neuroquímicas podem contribuir para doenças relacionadas ao estresse assim como o TDM.

A análise bioquímica apresentada no estudo de Giridharan et al. (2019), apoiam a hipótese de que a neuroinflamação e a ativação microglial, principalmente no córtex frontal, podem estar envolvidas com alterações nas células residentes do cérebro após a privação materna, tais alterações podem estar associadas ao desenvolvimento de condições psiquiátricas tardias. O estudo ainda destaca o aumento das interleucinas: IL-5, IL-6, IL7 e IL-10, assim como do fator de necrose tumoral (TNF- $\alpha$ , do inglês: *Tumor necrosis factor-alpha*) e interferon gama (INF- $\gamma$ ).

### **1.7 TDM e estresse oxidativo**

O estresse oxidativo é definido como o estado de produção excessiva de espécies reativas de oxigênio (EROs) e representa um dos denominadores mais comuns de toxicidade, promovendo danos moleculares potenciais em tecidos e células e ainda desempenha um papel importante na fisiopatologia de transtornos psiquiátricos, incluindo o TDM (Pandya et al., 2013).

O desequilíbrio entre oxidantes e antioxidantes resulta em proteínas, lipídios e ácidos nucleicos oxidados. Desta forma, o estresse oxidativo é indicado pelo aumento do número de EROs e espécies reativas de nitrogênio (ERN) circulando no corpo (Palta et al., 2014). Segundo Harman (1993) 5% do oxigênio inalado é convertido em radicais livres, e os principais são EROs e ERN.

Parte das moléculas do oxigênio metabolizados nas mitocôndrias são desviados para outra via metabólica, e reduzidas de forma univalente, dando origem aos radicais livres como o superóxido ( $O_2^{\cdot}$ ), hidroxila ( $OH^{\cdot}$ ) e, ainda, peróxido de

hidrogênio ( $H_2O_2$ ). Tal processo conduz à oxidação de biomoléculas com consequente perda de suas funções biológicas, desequilíbrio homeostático e danos em células e tecidos (Barbosa et al., 2010).

Níveis moderados de EROs são essenciais para o crescimento e desenvolvimento de neurônios, entretanto o aumento e a expressão amplificada dos genes controlados por estresse oxidativo têm sido correlacionados com a patogênese e progressão do TDM (Bhatt et al., 2020).

As alterações resultantes do excesso de radicais livres associadas a lipídios, proteínas e DNA leva a modificações moleculares e alteração na ativação de diferentes fatores de transcrição, consequentemente, aumento de citocinas pró- e anti-inflamatórias (Birben et al., 2012).

O equilíbrio antioxidante ocorre através de enzimas como superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT), glutathione peroxidase (GPx), glutathione reductase (GR) e a glutathione S transferase (GST). Assim como por substâncias não enzimáticas, como a glutathione reduzida (GSH), vitamina C, vitamina E, N-acetilcisteína (NAC), entre outros (Pandya et al., 2013).

A vulnerabilidade do cérebro em relação ao estresse oxidativo, se dá em função do maior consumo de oxigênio, maior conteúdo de lipídios e a redução de seus antioxidantes incluindo colesterol de lipoproteína de alta densidade (HDL-C), atividade da paraoxonase 1, lecitina-colesterol aciltransferase, vitamina E e coenzima  $Q_{10}$  (CoQ) (Morris et al., 2020).

O esgotamento das defesas antioxidantes e o aumento da geração de EROs, foram associados a alteração da estrutura cerebral em estudos pré-clínicos e clínicos e essa hipótese, é conhecida como 'hipótese do estresse oxidativo dos transtornos depressivos' (Bhatt et al., 2020).

O TDM tem grande relação com o desequilíbrio entre vários fatores que afetam a neurodegeneração e a neuroproteção, incluindo o BDNF e o fator nuclear (NF) -  $\kappa B$  (Bakunina et al., 2015). As EROs atuam como mensageiros secundários indispensáveis na transdução de sinal, desta forma afetam significativamente as vias inflamatórias ao ativar o NF $\kappa B$  e a família da proteína quinase ativada por estimulação à proliferação celular que estressam as quinases. E ainda, as EROs podem afetar os constituintes celulares com a formação de moléculas pró-inflamatórias, como o malondialdeído (MDA), 4-hidroxi-nonenal, neoepítomos e padrões moleculares associados ao dano, promovendo a resposta imunológica e apoptose (Bakunina et al.,

2015).

A relação do desequilíbrio oxidativo na fisiopatologia do TDM é fortemente baseada em resultados obtidos com modelos animais e é compatível com dados bioquímicos obtidos de pacientes. Os estudos sugerem que os mecanismos oxidativos parecem ser um fator patogênico comum nos transtornos psiquiátricos, e, se essa hipótese for correta, pode-se considerar novos alvos para o desenvolvimento de intervenções terapêuticas (NG et al., 2008).

O estresse oxidativo e a inflamação são interdependentes e se complementam resultando no TDM. Assim as EROs são geradas por células inflamatórias e podem iniciar a sinalização intracelular levando à expressão de genes pró-inflamatórios (Bhatt et al., 2020).

### **1.8 Neuroinflamação**

Análises neurobiológicas, confirmam a relação entre a inflamação e o TDM, assim como, a associação dos sintomas clínicos do transtorno, e níveis plasmáticos mais elevados de citocinas pró-inflamatórias como TNF $\alpha$ , IL-1 $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-4, IL-5, IL-6, IL-12, IFN- $\gamma$  e proteína C reativa (PCR) (Kohler et al., 2017; Khandaker et al., 2018). Nesse sentido, as citocinas pró-inflamatórias atuam como neuromoduladores, mediando os aspectos neuroquímicos, neuroendócrinos e comportamentais dos transtornos depressivos (Vismari et al., 2008).

O estresse oxidativo modula a sinalização neuronal e extraneuronal no cérebro, resultando em inflamação neuronal e morte celular, neste sentido, estudos revelaram que níveis aumentados de marcadores inflamatórios combinados com estresse oxidativo são uma característica onipresente no TDM (Bhatt et al., 2020).

As interleucinas e o TNF- $\alpha$  são expressas sob condições patológicas e envolvidas na regulação da neuroinflamação, processos imunológicos e reparo tecidual (Aloisi et al., 2005). No TDM as citocinas podem servir como biomarcadores e ainda apresentam alterações após o tratamento com antidepressivos (Schmidt et al., 2011).

Pacientes com TDM apresentam aumento no número de leucócitos sanguíneos periféricos, em razão do aumento de CD4 + /CD8 +, alteração igualmente observada com relação ao aumento da concentração plasmática de proteínas inflamatórias de fase aguda, como a haptoglobina e a PCR, diminuição na resposta celular a



mitógenos, redução do número de linfócitos e da atividade de células NK, ainda observa-se a alteração na expressão de antígenos, e aumento nos níveis sanguíneos de citocinas pró-inflamatórias e seus receptores, tais como IL-6 e IL-23 (Sublette et al., 2004).

Considerando a ativação crônica do sistema imunológico inato, estudos mais recentes sugerem um papel importante do sistema imunológico adaptativo no TDM (Woelfer et al., 2019). O dano celular ou as respostas ao estresse podem alertar a resposta imune inata e induzir uma "resposta imune inflamatória estéril". Desta forma moléculas próprias ou endógenas são reconhecidas como sinais de perigo quando liberadas no espaço extracelular. Essas moléculas de padrão molecular associado a danos (DAMPs, do inglês *Damage-associated molecular patterns*) desencadeiam respostas imunes inatas também por meio da ligação de receptores de reconhecimento padrão (PRR, do inglês *Pattern recognition receptors*) (Culmsee et al., 2019). Alguns componentes mitocondriais, como trifosfato de adenosina (ATP), peptídeos N-formil ou DNA mitocondrial (mtDNA) funcionam como DAMPs e são detectados por (PRRs) distintos, promovendo assim uma resposta inflamatória (Krysko et al., 2011).

Neurônios, astrócitos e microglia expressam a enzima indoleamina-2,3 dioxigenase (IDO), que atua principalmente na regulação do sistema imune e converte triptofano em quinurenina. A microglia e os monócitos metabolizam a quinurenina em ácido quinolínico, um agonista do receptor NMDA, e os astrócitos degradam a quinurenina em ácido quinurênico, um antagonista do receptor NMDA e que tem um potente efeito neurotóxico, desencadeando a liberação do glutamato, a inibição de sua captação pelas células gliais causando maior concentração do mesmo no meio extracelular, e por fim induzindo a modificações de conectividade entre vias cerebrais relacionadas ao TDM (Guillemin, 2012; Sundaram et al., 2014).

Estudos também evidenciaram níveis elevados de IL-6 e PCR no contexto de inflamação sistêmica correlacionados com conectividade prejudicada entre o córtex cingulado anterior subgenual e amígdala, córtex pré-frontal medial, núcleo accumbens, bem como estriado ventral (Felger et al., 2016). A investigação de marcadores inflamatórios associados ao desenvolvimento do TDM pode contribuir para o diagnóstico, monitoramento, prognóstico e tratamento do transtorno de forma eficaz.

## **2. OBJETIVOS**

### **2.1 Objetivo Geral**

Avaliar os efeitos comportamentais e neuroquímicos da cetamina em ratos machos e fêmeas submetidos à privação materna.

### **2.2 Objetivos Específicos**

Avaliar o tempo de imobilidade, escalada e nado através do teste do nado forçado em ratos Wistar machos e fêmeas submetidos ao modelo animal de privação materna e tratados com cetamina.

Avaliar a atividade motora espontânea de ratos Wistar machos e fêmeas submetidos ao modelo animal de privação materna e tratados com cetamina.

Investigar o dano em lipídeos e proteínas em CF e hipocampo de ratos Wistar machos e fêmeas submetidos ao modelo animal de privação materna e tratados com cetamina.

Avaliar as atividades das enzimas antioxidantes SOD e CAT em CF e hipocampo de ratos Wistar machos e fêmeas submetidos ao modelo animal de privação materna e tratados com cetamina.

Avaliar os níveis da citocina IL-6 e a atividade da enzima mieloperoxidase (MPO) em CF e hipocampo de ratos Wistar machos e fêmeas submetidos ao modelo animal de privação materna e tratados com cetamina.

### 3. METODOLOGIA

#### 3.1 Aspectos éticos

Todos os procedimentos experimentais foram realizados de acordo com as recomendações internacionais para o cuidado e o uso de animais de laboratório, além das recomendações para o uso de animais da Sociedade Brasileira de Neurociências e comportamento (SBNeC). O projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA) da UNESC sob número 132-2019 (Anexo I).

#### 3.2 Protocolo de privação materna

Conforme a Figura 2, os filhotes foram privados da mãe durante 3 horas por dia, durante os 10 primeiros dias. A privação consistia em retirar a mãe da caixa e manter os filhotes na caixa original, para ficarem na presença do odor materno. Os animais não privados (controles) permaneceram imperturbáveis na caixa original com sua mãe. As caixas em ambos os grupos só foram trocadas no 11º dia após o período pré-natal. Os ratos de ambos os sexos foram desmamados apenas no 21º dia após o período pré-natal (Réus et al., 2019). A aplicação farmacológica, testes comportamentais e neuroquímicos foram realizados apenas quando os animais atingiram a vida adulta no 61º dia. Após a aplicação dos testes comportamentais os animais foram eutanasiados com guilhotina.

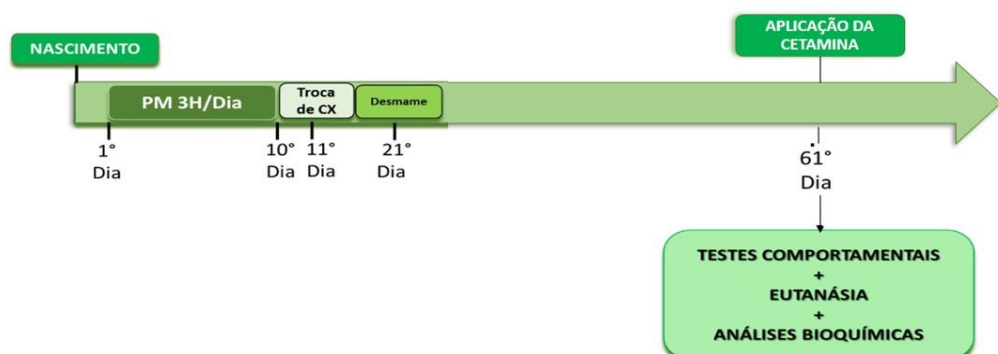


Figura 2: Representação da cronologia da privação materna, desmame, aplicação da cetamina, e de testes comportamentais, eutanásia e retirada de tecido para análise bioquímica.

### **3 Grupos experimentais e tratamento farmacológico**

Diferentes grupos de ratos de ambos os sexos (n = 12 machos e n =12 fêmeas, para cada grupo) quando adultos foram distribuídos nos seguintes grupos: 1) Controle+Sal; 2) Privado+Sal; e 3) Privado+Cetamina. A cetamina foi administrada por via intraperitoneal (IP) na dose de 15 mg/kg 60 minutos antes dos testes comportamentais. Todos os tratamentos foram administrados em um volume de 1 mL/kg (Réus et al., 2015).

#### **3.4 Testes comportamentais**

##### **3.4.1 Teste do Nado Forçado**

Este teste consiste em dois dias de procedimentos no qual cada rato é posto em um cilindro com água a 23°C, a água deve ser suficiente para o animal não conseguir apoiar as patas no fundo. No período de treino, os animais foram forçados a nadar 15 minutos. No dia seguinte (24 horas após o treino) no período de teste, cada animal foi novamente forçado a nadar durante 5 minutos. Foram avaliados os parâmetros de tempo de imobilidade, nos quais incluem-se imobilidade total ou movimentos para manter a cabeça fora da água sem intenção de escapar, além do tempo de escalada e nado (Porsolt et al., 1977; Réus et al., 2019).

##### **3.4.2 Atividade motora**

Esse teste foi realizado em um campo aberto de 40 x 60 cm delimitado por 4 paredes com 50 cm de altura, sendo 3 de madeira e uma de vidro transparente. O piso do campo aberto é dividido em 12 quadrados iguais marcados por linhas pretas. Os animais foram cuidadosamente colocados no quadrado do canto posterior esquerdo do aparelho, a partir do qual podia explorar livremente o ambiente por 5 minutos. Foram contados pelo avaliador o número de cruzamentos (*crossings*) e o número de levantamentos (*rearings*) dos animais no período de 5 minutos (Réus et al., 2015).

### **3.5 Análises bioquímicas**

#### **3.6.1 Dano oxidativo aos lipídios**

O dano aos lipídios no CF e no hipocampo foi quantificado pela determinação dos níveis de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) (Esterbauer e Cheeseman 1990). Brevemente, as amostras foram homogeneizadas em tampão fosfato (Nuclear) e desproteinizadas com ácido tricloroacético 10% (Vetec) com centrifugação à 3.000rpm por 10min. A reação ocorreu ao adicionar ácido tiobarbitúrico 0,67% ao sobrenadante e aquecido à 100°C por 30 min. A absorbância foi realizada em 532 nm em espectrofotômetro utilizando 1,1,3,3-tetrametoxipropano (Sigma-Aldrich) como padrão externo. Os resultados estão expressos em nmol de malondialdeído equivalente por mg de proteína.

#### **3.6.2. Dano oxidativo às proteínas carboniladas**

O dano oxidativo às proteínas no CF e no hipocampo foi quantificado pela determinação dos níveis de grupos carbonilas, através da reação com dinitrofenilhidrazina (Sigma-Aldrich) (Levine et al., 1990). Brevemente, as proteínas foram precipitadas com ácido tricloroacético 20% (Vetec) e redissolvidas em dinitrofenilhidrazina (Sigma-Aldrich). A absorbância foi realizada em 340nm em espectrofotômetro. Os resultados estão expressos em nmol/mg de proteína.

#### **3.6.3. Dano oxidativo às proteínas pela avaliação de integridade de grupamentos sulfidrila**

A quantidade de grupamentos tióis totais no CF e no hipocampo foi determinada utilizando o 5,5-ditiobis(2-nitrobenzóico) (DTNB) (Aksenov e Markesbery, 2001). Resumidamente, 30 mL de uma amostra foi misturada com 1 ml de PBS / 1 mM EDTA (pH, 7,5). A reação foi iniciada pela adição de 30 mL de 10 mM de solução DTNB em PBS. As amostras de controle, que não incluem DTNB ou proteína, foram avaliadas simultaneamente. Após 30 min de incubação à temperatura ambiente, a absorbância de 412 nm, foi mensurada e quantidades de TNB formado (equivalente à quantidade de grupos SH formado) determinado. Os resultados estão expressos como níveis de proteínas sulfidrilas por miligrama de proteína.

#### **3.6.4. Nitrito e Nitrato (N/N)**

A concentração de N/N no CF e no hipocampo foi determinada pela reação de Griess. Brevemente, a reação é realizada pela adição do reagente de Griess (0,1% naphthylethylendiamide dihydrochloride e 1% sulfanilamida, proporção 1:1; Synth) e cloreto de Vanadium (III) (Sigma-Aldrich) nas amostras previamente homogeneizadas em tampão fosfato (Nuclear) (Green et al., 1982). Após 1h de incubação em temperatura ambiente ao abrigo da luz, a absorbância será realizada a 540 nm em espectrofotômetro. Os resultados foram expressos em nmol/mg de proteína.

#### **3.6.5. Atividade enzimática da superóxido dismutase (SOD)**

A atividade enzimática da superóxido dismutase no CF e no hipocampo foi determinada pela inibição da auto-oxidação da adrenalina. O CF e hipocampo foram homogeneizados em 1 mL de tampão glicina [pH10,2, contendo 0,75g de ácido aminoacético (glicina) em 200 mL de água purificada] e centrifugado por 10 min em 3000rpm, em temperatura ambiente. O reagente branco foi preparado a partir da mistura de 10µL de catalase 0,0024 g/mL (0,0018g de catalase em 720 µL de água purificada) com 970 µL de tampão glicina a 32°C. Após, foi adicionada a quantidade de 17µL de adrenalina 60mM (0,006 g de adrenalina em 300 µL de água purificada e 3 µL de HCl) (Bannister e Calabrese, 1987). A leitura do reagente branco foi realizada a cada 10 segundos, durante 180 segundos, a fim de determinar a curva de calibração. Este processo foi repetido após a leitura de quatro amostras e sempre que houve a troca de reagentes. As amostras foram preparadas a partir da mistura de 10µL de catalase 0,0024g/mL, 3 a 7 µL de amostra e 970 µL de tampão glicina a 32°C. A leitura da amostra foi realizada a cada 10 segundos, durante 180 segundos. As leituras foram realizadas em espectrofotômetro de lâmpada de deutério, em cubetas de plástico, a 480nm. A atividade da SOD está expressa em U de SOD/mg de proteína.

### **3.6.6. Atividade enzimática da catalase**

A atividade enzimática da catalase no CF e no hipocampo foi determinada pela diminuição no consumo de peróxido de hidrogênio. O CF e o hipocampo foram homogeneizados em 1 mL de tampão catalase [PBS+NaCl (pH 7,0), contendo 8,0086g de NaCl (136,9mM), 0,1496g de KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (1,1mM) e 0,0383g de Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> (0,27mM)] e centrifugado por 10min em 3000rpm, em temperatura ambiente. O reagente branco foi preparado a partir da mistura de 100µL de sobrenadante da amostra com 1mL de tampão catalase e foi utilizado para zerar o espectrofotômetro. O reagente amostra foi preparado a partir da mistura de 100 µL de sobrenadante da amostra com 1mL de tampão catalase contendo H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (25mL de tampão catalase e 400µL de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, protegido da luz) (Aebi, 1984). A leitura da amostra foi realizada em espectrofotômetro de lâmpada de deutério, em cubetas de quartzo, a 240 nm. Foram realizadas mensurações referentes ao decaimento de absorbância nos tempos 0, 30 e 60 segundos. O processo foi repetido para cada amostra. A atividade da CAT está expressa em U de CAT/mg de proteína.

### **3.6.7. Normalização das dosagens**

A quantificação de proteínas totais foi realizada para normalização das dosagens realizada. O método utilizado foi o proposto por Lowry et al. (1951) que utiliza albumina bovina sérica como padrão. A absorbância foi realizada em 700nm. Os resultados foram expressos em mg de proteínas.

### **3.6.8. Atividade de mieloperoxidase (MPO)**

O infiltrado de neutrófilos nos tecidos foi calculado através da atividade de MPO (De Young et al. 1989). O CF e o hipocampo foram homogeneizados (50 mg / mL) em brometo de hexadeciltrimetilamônio a 0,5% e centrifugados a 15.000 x g por 40 min. A suspensão foi então sonicada três vezes durante 30 segundos. Uma alíquota de sobrenadante foi misturada com uma solução de tetrametilbenzidina 1,6 mM e H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 1 mM. A atividade foi medida espectrofotometricamente como a mudança na absorbância a 650 nm a 37 ° C. Os dados estão expressos em mU por mg de proteína.

### **3.6.9. Análise de citocinas**

A dosagens das citocinas IL-6 foi realizada a partir das amostras de CF e hipocampo através dos kits comerciais disponíveis (DuoSet ELISA Development, R&D Systems, Inc., USA).

### **3.7 Análise Estatística**

Todos os dados estão apresentados como média  $\pm$  erro padrão da média (E.P.M.). As diferenças entre os grupos experimentais na avaliação dos testes comportamentais e de todos os ensaios bioquímicos foram determinadas por análise de variância de uma via (ANOVA), seguido do teste post hoc de Tukey. A significância estatística foi considerada para valores de P menores do que 0,05.



## 4. RESULTADOS

### 4.1 EFEITOS DA PRIVAÇÃO MATERNA E DO TRATAMENTO COM CETAMINA SOBRE O COMPORTAMENTO DE RATOS WISTAR MACHOS E FÊMEAS

A Figura 3A mostra os efeitos da privação materna e do tratamento com cetamina no teste do nado forçado em ratos Wistar machos e fêmeas. Nos machos, o grupo privado que recebeu solução salina teve um aumento no tempo de imobilidade quando comparado aos animais não-privados e o grupo privado tratado com cetamina foi capaz de reverter este aumento ( $F = (2-20) 11,323$ ;  $p = 0,001$ ). No tempo de escalada, os machos privados tratados com salina diminuíram este tempo quando comparado ao grupo não-privado ( $F = (2-20) 4,693$ ;  $p = 0,021$ ). Os machos privados tratado com cetamina aumentaram o tempo nado em comparação com o grupo privado tratado com salina ( $F = (2-20) 6,334$ ;  $p = 0,007$ ). As fêmeas não apresentaram diferenças estatísticas, em nenhum dos grupos, para os tempos de imobilidade ( $F = (2-20) 2,790$ ;  $p = 0,073$ ), escalada ( $F = (2-20) 2,790$ ;  $p = 0,073$ ) e nado ( $F = (2-20) 0,968$ ;  $p = 0,389$ ), quando comparado aos animais não-privados.

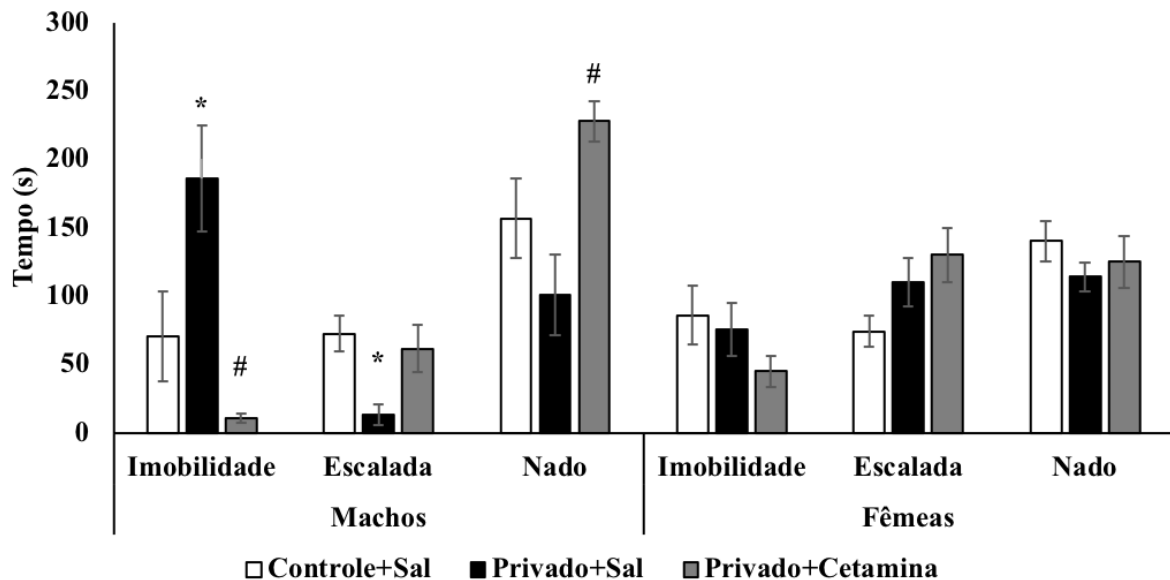


Figura 3A: Efeitos da privação materna e do tratamento com cetamina sobre o tempo de imobilidade, nado e escalada em ratos Wistar machos e fêmeas. Os valores são expressos como média  $\pm$  E.P.M. \* $p < 0,05$  vs. Controle + Sal; # $p < 0,05$  vs. Privado + Sal, de acordo com ANOVA de uma via seguida pelo teste post-hoc de Tukey.

A Figura 3B mostra os efeitos da privação materna e do tratamento com cetamina sobre a atividade locomotora de ratos Wistar machos e fêmeas. Nos machos, houve

uma diminuição do número de rearings no grupo privado tratado com cetamina em comparação com os animais não-privados ( $F = (2-20) 4,817$ ;  $p = 0,020$ ). Não houve diferença estatística no número de crossings nos machos privados tratados com salina e cetamina quando comparado com os animais controles ( $F = (2-20) 0,084$ ;  $p = 0,920$ ). Em relação as fêmeas, não houve diferença estatística, em nenhum dos grupos, para os números de crossings ( $F = (2-20) 1,237$ ;  $p = 0,301$ ) e rearings ( $F = (2-20) 1,535$ ;  $p = 0,228$ ) em comparação com as fêmeas não-privadas.

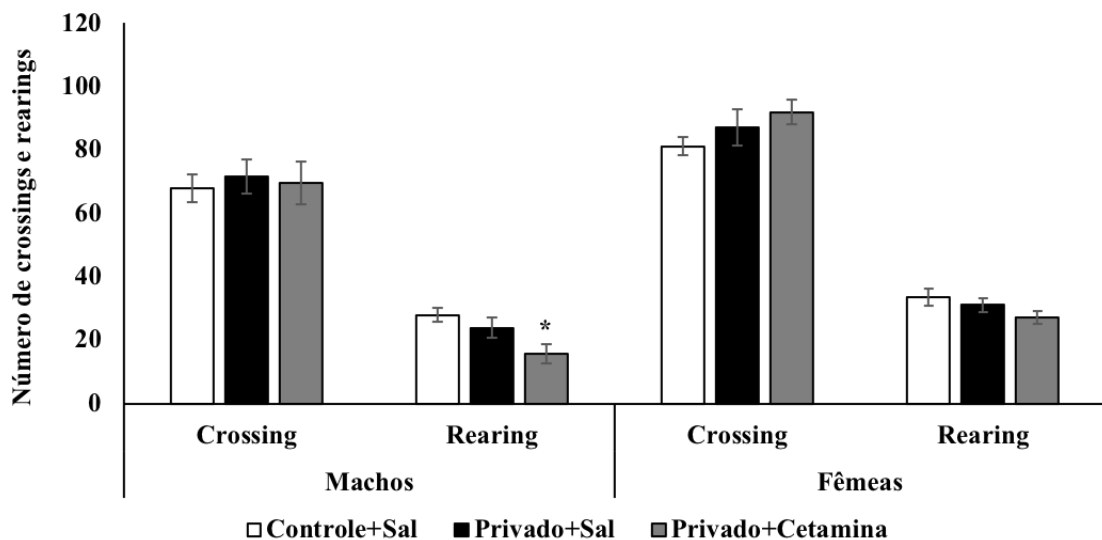


Figura 3B: Efeitos da privação materna e do tratamento com cetamina sobre o número de crossings e rearings em ratos Wistar machos e fêmeas. Os valores são expressos como média  $\pm$  E.P.M. \* $p < 0,05$  vs. Controle + Sal, de acordo com ANOVA de uma via seguida pelo teste post-hoc de Tukey.

#### 4.2 EFEITOS DA PRIVAÇÃO MATERNA E DO TRATAMENTO COM CETAMINA SOBRE PARÂMETROS DE DANO OXIDATIVO NO CF E HIPOCAMPO DE RATOS WISTAR MACHOS E FÊMEAS

A Figura 4 mostra os efeitos da privação materna e do tratamento com cetamina sobre parâmetros de estresse oxidativo no CF e hipocampo de ratos Wistar machos e fêmeas. Os ratos machos privados que receberam salina tiveram um aumento nos níveis de TBARS no CF ( $F = (2-12) 22,356$ ;  $p < 0,0001$ ) e no hipocampo ( $F = (2-14) 61,982$ ;  $p < 0,0001$ ) quando comparado com os machos controles, porém, no grupo privado tratado com cetamina houve uma diminuição dos níveis de TBARS em comparação ao grupo privado tratado com salina nas duas estruturas cerebrais. Nas fêmeas, no grupo privado tratado com salina houve um aumento dos níveis de TBARS em relação

ao controle no hipocampo ( $F = (2-15) 7,089$ ;  $p = 0,007$ ). Não foi observada diferença estatística no CF das fêmeas para nenhum dos grupos ( $F = (2-15) 0,418$ ;  $p = 0,666$ ).

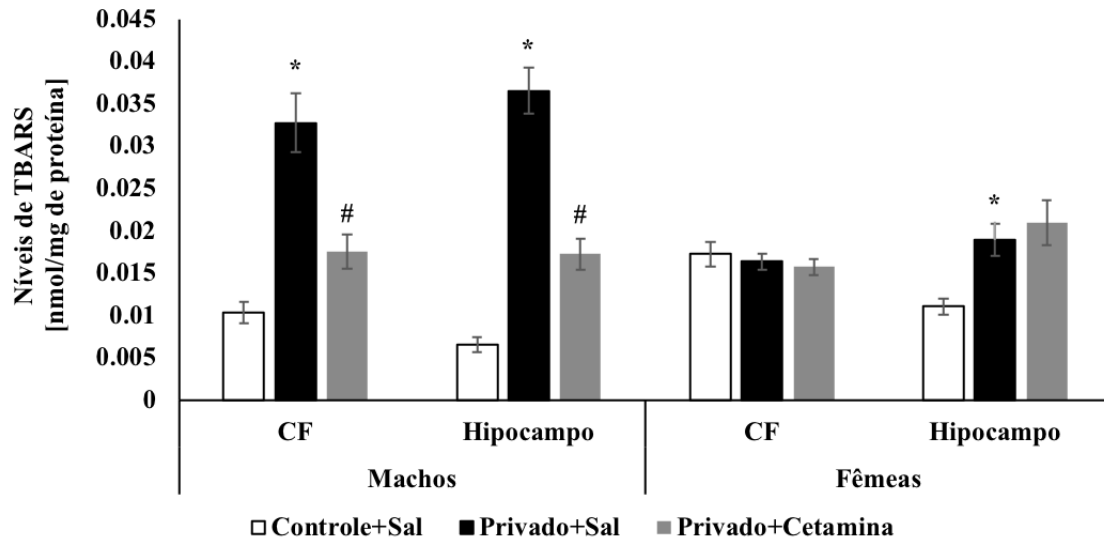


Figura 4A: Efeitos da privação materna e do tratamento com cetamina sobre os níveis de TBARS no CF e hipocampo de ratos Wistar machos e fêmeas. Os valores são expressos como média  $\pm$  E.P.M. \* $p < 0,05$  vs. Controle + Sal, # $p < 0,05$  vs. Privado + Sal, de acordo com ANOVA de uma via seguida pelo teste post-hoc de Tukey.

Já em relação aos níveis de carbonilação de proteínas observados na Figura 4B, no CF dos ratos machos, houve um aumento desses níveis no grupo privado tratado com salina em comparação com o grupo controle ( $F = (2-12) 8,275$ ;  $p = 0,006$ ). No hipocampo dos ratos machos também houve um aumento dos níveis de carbonilação de proteínas no grupo privado que recebeu salina em relação aos animais controles, porém, os animais privados tratados com cetamina reverteram este aumento ( $F = (2-14) 11,132$ ;  $p = 0,001$ ). Nas fêmeas, foi observado um aumento dos níveis de carbonilação de proteínas no CF quanto dos grupos privados que receberam salina em comparação ao grupo controle, porém, no CF ( $F = (2-15) 6,623$ ;  $p = 0,009$ ) e no hipocampo ( $F = (2-15) 8,432$ ;  $p = 0,004$ ) dos grupos privados tratado com cetamina houve uma redução da carbonilação de proteínas.

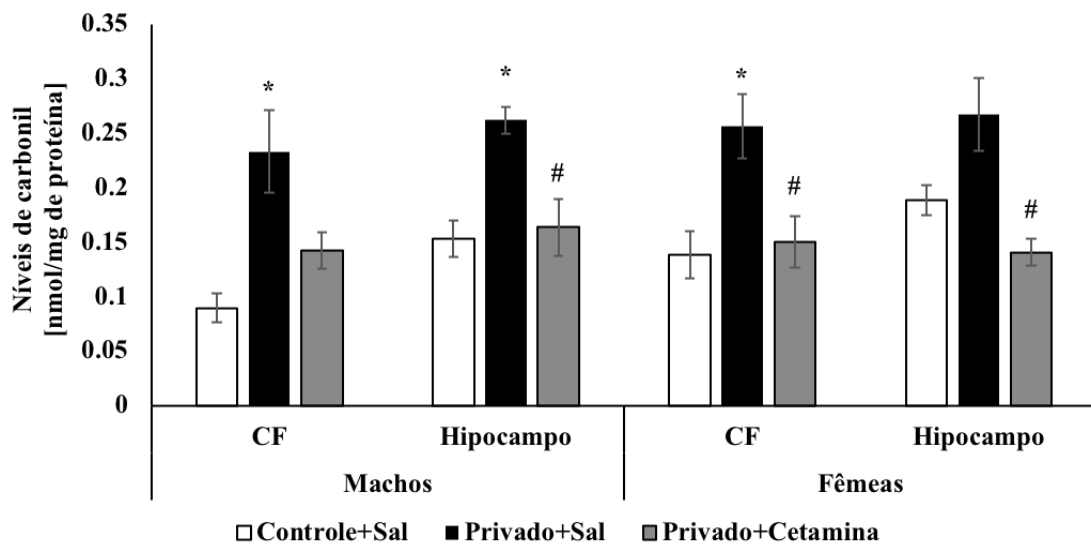


Figura 4B: Efeitos da privação materna e do tratamento com cetamina sobre os níveis de carbonilação de proteínas no CF e hipocampo de ratos Wistar machos e fêmeas. Os valores são expressos como média  $\pm$  E.P.M. \* $p < 0.05$  vs. Controle + Sal; # $p < 0.05$  vs. Privado + Sal, de acordo com ANOVA de uma via seguida pelo teste post-hoc de Tukey.

A concentração de nitrito/nitrato está ilustrada na Figura 4C. No CF dos ratos machos foi observado um aumento da concentração de nitrito/nitrato no grupo privado tratado com salina em comparação aos animais controles e no grupo privado tratado com cetamina foi observado uma reversão deste aumento ( $F = (2-13) 11,956$ ;  $p = 0,001$ ). Já no hipocampo dos ratos machos, houve um aumento da concentração de nitrito/nitrato nos animais privados que receberam salina em comparação ao grupo controle ( $F = (2-13) 8,329$ ;  $p = 0,05$ ). Nas fêmeas, foi observado um aumento da concentração de nitrito/nitrato somente no CF no grupo dos animais privados tratados com salina em relação ao controle ( $F = (2-15) 3,979$ ;  $p = 0,041$ ). Não foi observada diferença estatística no hipocampo das fêmeas para nenhum dos grupos ( $F = (2-15) 0,552$ ;  $p = 0,587$ ).

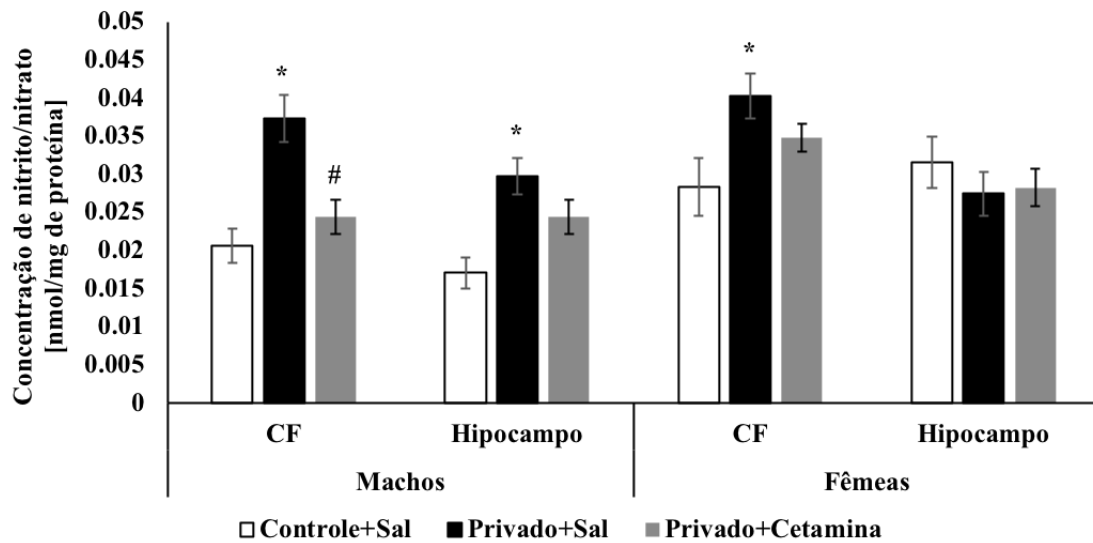


Figura 4C: Efeitos da privação materna e do tratamento com cetamina sobre a concentração de nitrito/nitrato no CF e hipocampo de ratos Wistar machos e fêmeas. Os valores são expressos como média  $\pm$  E.P.M. \* $p < 0.05$  vs. Controle + Sal; # $p < 0.05$  vs. Privado + Sal, de acordo com ANOVA de uma via seguida pelo teste post-hoc de Tukey.

Em relação ao conteúdo de sulfidrilas (Fig. 4D) foi encontrado uma redução tanto no CF ( $F = (2-12) 8,199$ ;  $p = 0,006$ ) quanto no hipocampo ( $F = (2-14) 21,731$ ;  $p < 0,0001$ ) de ratos machos privados, comparado com controle e tal efeito não foi revertido pelo tratamento com cetamina. No CF ( $F = (2-15) 0,897$ ;  $p = 0,429$ ) ou hipocampo ( $F = (2-15) 0,740$ ;  $p = 0,495$ ) de fêmeas não foi mostrado diferenças estatísticas nesse parâmetro.

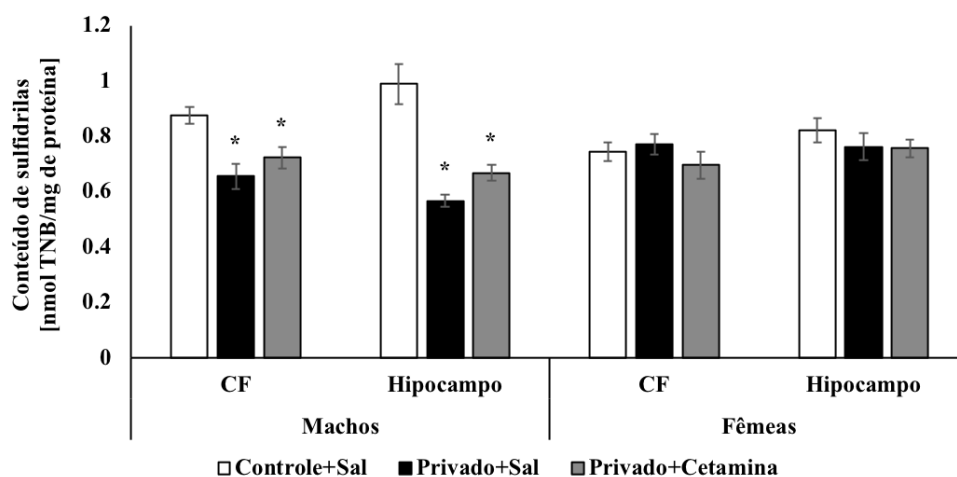


Figura 4D. Efeitos da privação materna e do tratamento com cetamina sobre o conteúdo de sulfidrilas no CF e hipocampo de ratos Wistar machos e fêmeas. Os valores são expressos como média  $\pm$  E.P.M. \* $p < 0.05$  vs. Controle + Sal, de acordo com ANOVA de uma via seguida pelo teste post-hoc de Tukey.

### 4.3 EFEITOS DA PRIVAÇÃO MATERNA E DO TRATAMENTO COM CETAMINA SOBRE A ATIVIDADE DAS ENZIMAS ANTIOXIDANTES SOD E CAT NO CF E HIPOCAMPO DE RATOS WISTAR MACHOS E FÊMEAS

A Figura 5 demonstra os efeitos da privação materna e do tratamento com cetamina sobre a atividade das enzimas antioxidantes SOD e CAT no CF e hipocampo de ratos Wistar machos e fêmeas. Como observado na Figura 5A, no hipocampo ( $F = (2-14) 47.833$ ;  $p < 0,0001$ ) e no CF ( $F = (2-12) 12.967$ ;  $p = 0,001$ ) dos ratos machos, a atividade da SOD foi diminuída nos grupos privados tratados com salina e cetamina quando comparado com os animais controles. Já nas fêmeas, houve uma diminuição da atividade da SOD no CF do grupo privado tratado com cetamina em comparação com o controle ( $F = (2-15) 4,689$ ;  $p = 0,026$ ) e uma diminuição no hipocampo dos grupos privados tratados com salina e cetamina em comparação com os animais controles ( $F = (2-14) 19,651$ ;  $p < 0,0001$ ).

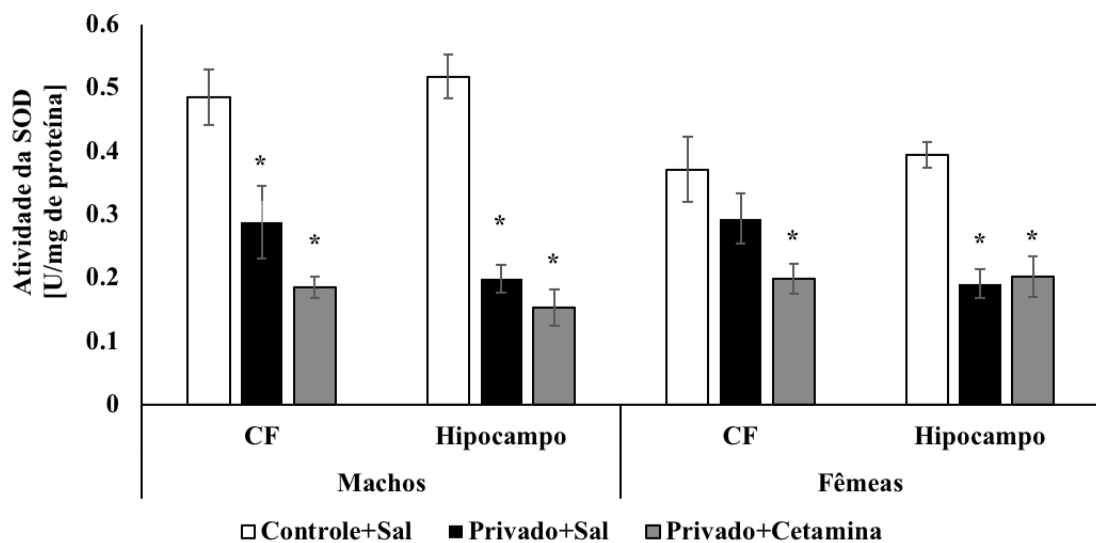


Figura 5A: Efeitos da privação materna e do tratamento com cetamina sobre a atividade da SOD no CF e hipocampo de ratos Wistar machos e fêmeas. Os valores são expressos como média  $\pm$  E.P.M. \* $p < 0,05$  vs. Controle + Sal, de acordo com ANOVA de uma via seguida pelo teste post-hoc de Tukey.

A atividade da enzima antioxidante CAT está ilustrada na Figura 5B. Nos ratos machos a atividade da CAT foi diminuída no CF ( $F = (2-13) 16,820$ ;  $p < 0,0001$ ) e no hipocampo ( $F = (2-14) 7,176$ ;  $p = 0,007$ ) dos animais privados tratados com salina e cetamina quando comparado com o grupo controle. Nas fêmeas, também foi observada uma diminuição na atividade da CAT no CF ( $F = (2-15) 20,465$ ;  $p < 0,0001$ )

e hipocampo ( $F = (2-15) 45,243$ ;  $p < 0,0001$ ) dos grupos privados tratados com salina e cetamina em comparação ao grupo controle.

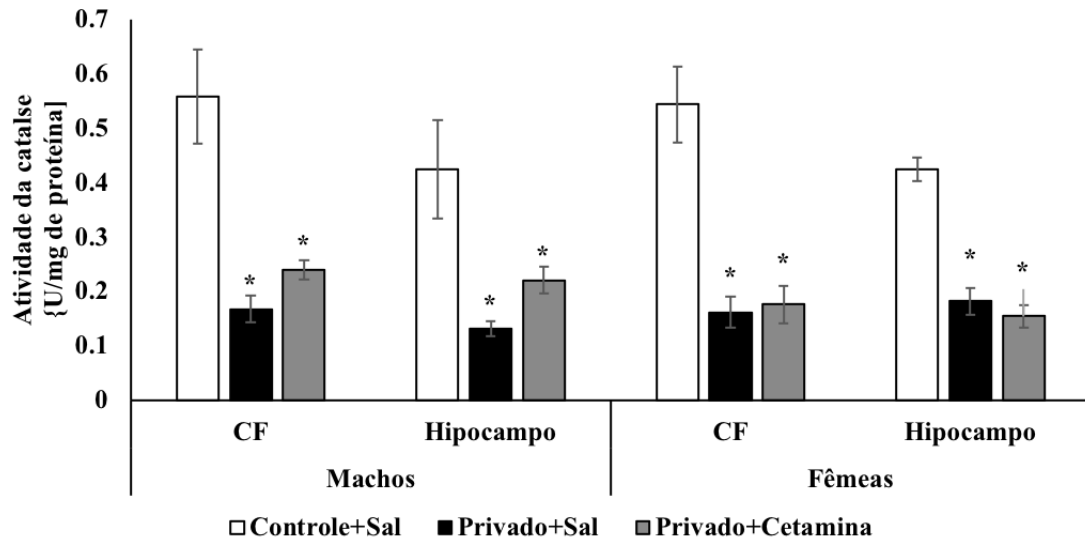


Figura 5B: Efeitos da privação materna e do tratamento com cetamina sobre a atividade da CAT no CF e hipocampo de ratos Wistar machos e fêmeas. Os valores são expressos como média ± E.P.M. \* $p < 0,05$  vs. Controle + Sal, de acordo com ANOVA de uma via seguida pelo teste post-hoc de Tukey.

#### 4.4 EFEITOS DA PRIVAÇÃO MATERNA E DO TRATAMENTO COM CETAMINA SOBRE PARÂMETROS INFLAMATÓRIOS NO CF E HIPOCAMPO DE RATOS WISTAR MACHOS E FÊMEAS

A Figura 6A demonstra que no hipocampo dos ratos machos privados tratados com salina houve um aumento da atividade da MPO quando comparado com o grupo controle, porém nos animais privados tratados com cetamina houve uma diminuição ( $F = (2-13) 165,004$ ;  $p < 0,0001$ ). Não foi observada diferença estatística no CF de ratos machos em nenhum dos grupos ( $F = (2-13) 2,931$ ;  $p = 0,089$ ). Já nas fêmeas, houve uma diminuição da atividade da MPO no CF do grupo privado tratado com cetamina em comparação ao grupo controle e ao grupo privado tratado com salina ( $F = (2-13) 12,654$ ;  $p = 0,001$ ). Não foi observada diferença estatística no hipocampo das fêmeas para nenhum dos grupos ( $F = (2-15) 2,542$ ;  $p = 0,112$ ).

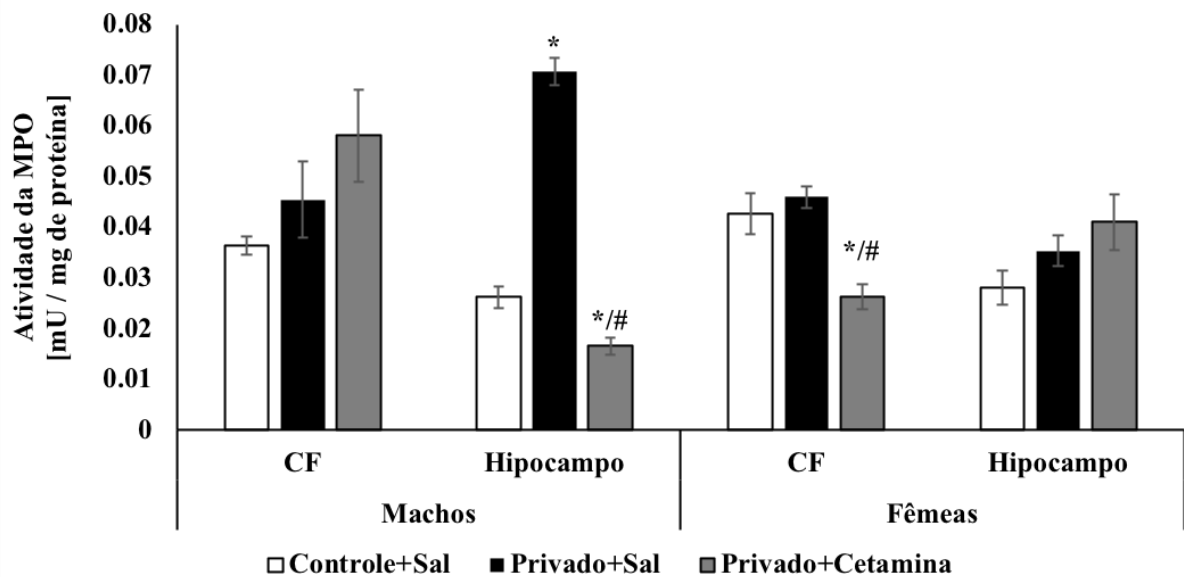


Figura 6A: Efeitos da privação materna e do tratamento com cetamina sobre a atividade da MPO no CF e hipocampo de ratos Wistar machos e fêmeas. Os valores são expressos como média  $\pm$  E.P.M. \* $p < 0.05$  vs. Controle + Sal; # $p < 0.05$  vs. Privado + Sal, de acordo com ANOVA de uma via seguida pelo teste post-hoc de Tukey.

A Figura 6B demonstra os efeitos da privação materna e do tratamento com cetamina sobre os níveis de IL-6 no CF e hipocampo de ratos Wistar machos e fêmeas. Nos ratos machos foi observado um aumento nos níveis de IL-6 no hipocampo dos ratos privados tratados com salina em comparação com o grupo controle e nos animais privados tratados com cetamina houve uma reversão desses efeitos ( $F = (2-12) 34.425$ ;  $p < 0,0001$ ). No CF dos ratos machos não houve diferença estatística para nenhum dos grupos ( $F = (2-11) 0.793$ ;  $p < 0,0001$ ). Já no CF ( $F = (2-12) 0,633$ ;  $p = 0,548$ ) e hipocampo ( $F = (2-12) 0,456$ ;  $p < 0,644$ ) das fêmeas também não houve diferença estatística para nenhum dos grupos.



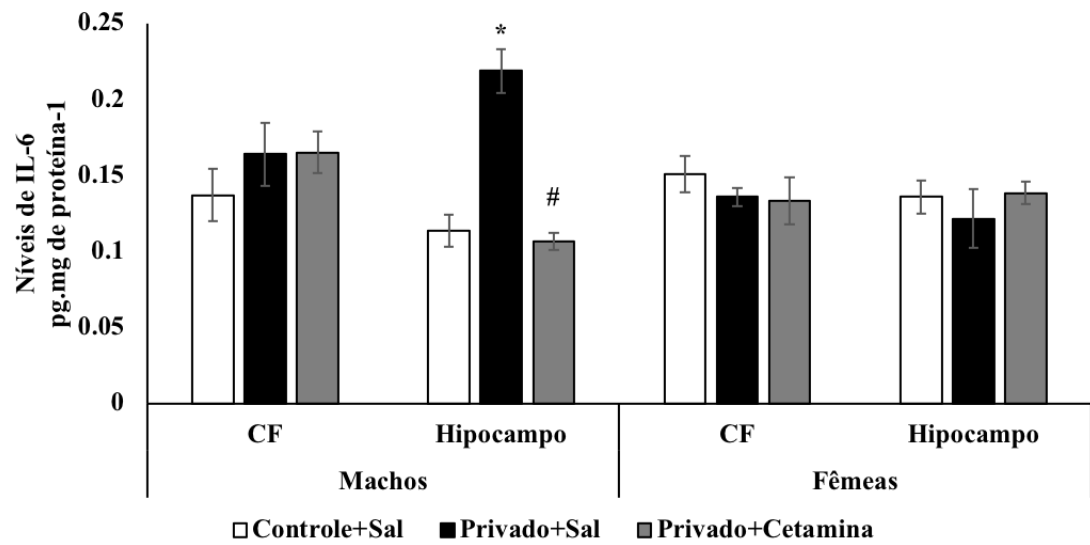


Figura 6B: Efeitos da privação materna e do tratamento com cetamina sobre os níveis de IL-6 no CF e hipocampo de ratos Wistar machos e fêmeas. Os valores são expressos como média  $\pm$  E.P.M. \*P < 0.05 vs. Controle + Sal; #p < 0.05 vs. Privado + Sal, de acordo com ANOVA de uma via seguida pelo teste post-hoc de Tukey.

## 5. DISCUSSÃO

Estatísticas apontam o TDM como um problema de saúde pública crescente, porém, os tratamentos disponíveis para este transtorno ainda têm limitações significativas, incluindo baixas taxas de remissão, efeitos colaterais abundantes e tempo de início da resposta terapêutica demorado, geralmente de duas a dez semanas (Machado-Vieira et al., 2008). Em sua manifestação clássica, o TDM apresenta sintomas crônicos de alterações do humor, afeto, psicomotricidade, funções neurovegetativas (sono, apetite, energia) e cognitivas, com sintomas que costumam ser persistentes e recorrentes (*American Psychiatric Association [APA]*, 2014). Dentre as principais funções cognitivas afetadas no TDM estão: atenção, memória, velocidade de processamento, aprendizagem e funções executivas (Lezak et al., 2012).

Outro achado frequente consiste na observação da maior prevalência do TDM entre as mulheres, na proporção de 2:1 (Bromet et al., 2011). Alguns estudos observaram diferenças entre o sexo feminino e o masculino nas respostas ao tratamento com antidepressivos (Khan et al., 2005), na capacidade de recordar e alterações de humor (Loewenthal et al., 1995) e na modulação dos sintomas depressivos (Wilhem e Parker, 1994). Ainda, a influência dos aspectos sociais e psicológicos parece importante não só na gênese propriamente dita dos estados depressivos, mas também no modo de apresentação dos sintomas e na função que estes podem ter nas relações sociofamiliares (Justo et al., 2007). Em alguns contextos, as mulheres parecem apresentar mais sintomas somáticos que os homens (Wenzel et al., 2005). Já em relação as possíveis diferenças nas manifestações depressivas entre homens e mulheres, em âmbito biológico, chamam a atenção o funcionamento hormonal e suas consequências (Justo et al., 2006). No que diz respeito ao tratamento farmacológico do TDM, existe controvérsia em relação à diferença de eficácia dos antidepressivos entre gêneros (Gorman, 2006).

A terapêutica mais comum para o TDM é o uso de antidepressivos, porém, estudos mostram que cerca de 50% dos pacientes não apresentam resposta ao primeiro tratamento com medicação antidepressiva, e até 46% evoluem para um quadro classificado como depressão resistente ao tratamento por não apresentarem melhora significativa mesmo após sucessivos ensaios terapêuticos (Thase, 2004; Lepine et al., 2012).

Reconhecendo a importância e urgência de buscar tratamentos de ação rápida, com menor incidência de efeitos colaterais e boa taxa de remissão para o tratamento da depressão resistente, estudos têm revelado resultados promissores no uso da cetamina, um anestésico antagonista do receptor NMDA (Green e Li, 2000; Scheidegger et al. 2016). Sabe-se que os receptores glutamatérgicos do tipo NMDA possuem papel importante nos transtornos mentais, como ansiedade e o TDM (Berman et al., 2000; Javitt, 2004). De fato, estudos clínicos e pré-clínicos já demonstraram que a cetamina foi capaz de apresentar efeitos antidepressivos rápidos dentro de poucas horas (Berman et al., 2000; Zarate et al., 2006; Garcia et al., 2008a; Abdallah et al., 2015; Réus et al., 2013, 2015).

Ainda, os mecanismos comportamentais e neurobiológicos subjacentes à ação antidepressiva da cetamina parecem estar relacionados a região do cérebro e a dose utilizada (Abdallah et al., 2015). Evidências pré-clínicas indicam que a cetamina possui efeitos rápidos sobre a sinaptogênese no CF e no hipocampo, duas regiões cerebrais que têm sido fortemente implicadas na fisiopatologia do TDM (Autry et al., 2011; Li et al., 2010). De fato, estudos mostram que estas duas regiões cerebrais têm sido fortemente implicadas nas respostas neurocomportamentais relacionadas ao sexo para tratamentos de estresse e antidepressivos (Groenewegen e Uylings, 2000; Celada et al., 2004; Drevets, 2007; Anderson et al., 2011; Carballedon et al., 2011; Pitychoutis et al., 2012). Especificamente, acredita-se que as alterações induzidas pela cetamina no hipocampo e no CF desencadeiam cascatas moleculares relacionadas à neuroplasticidade que, por sua vez, regulam a síntese de proteínas sinápticas envolvidas na sinaptogênese e na maquinaria de liberação pré-sináptica (Autry et al., 2011; Li et al., 2010; Muller et al., 2013).

Evidências indicam que as fêmeas são mais sensíveis aos antagonistas do receptor NMDA, como dizocilpina (MK-801), fenciclidina e cetamina do que os machos (Honack e Loscher, 1993; Auer, 1996; Shors et al., 2004). De fato, Honack e Loscher (1993) mostraram que ratas fêmeas são mais responsivas as propriedades motoras do MK-801 e a doses mais baixas do fármaco. Ainda, um estudo anterior demonstrou que ratas fêmeas tendem a dormir mais do que os machos após a administração de doses anestésicas de cetamina (Douglas e Dagirmanjian, 1975). Jevtovic-Todorovic e colaboradores (2001) observaram que os efeitos neurotóxicos da cetamina (40-80 mg/kg) no córtex retrosplenial é mais grave nas ratas fêmeas. Além disso, estudos clínicos mostraram que mulheres que receberam cetamina, em doses anestésicas,

apresentaram mais efeitos psicotrópicos, como alucinações, do que nos homens (Knox et al., 1970; Jevtovic-Todorovic et al., 2001). Apesar do fato de que as mulheres possam desenvolver o TDM em aproximadamente o dobro da taxa dos homens (Holden, 2005; Marcus et al., 2005; Grigoriadis e Robinson, 2007), pesquisas sobre os relevantes efeitos antidepressivos neurobiológicos da cetamina, concentraram-se quase exclusivamente no sexo masculino.

O período pós-natal é uma etapa do desenvolvimento em que todos os mamíferos apresentam como característica em comum a completa dependência de uma relação com a mãe (Abelaira et al., 2013; Rutter, 1995). Algumas evidências têm sustentado que alterações no cuidado materno também poderiam ser responsáveis por induzir efeitos neuroendócrinos duradouros do organismo frente ao estresse, especialmente nos primeiros anos de vida, já que os recém-nascidos não são ainda preparados para responder a estressores ambientais (Kuma et al., 2004).

Os modelos animais de estresse precoce têm sido amplamente utilizados em estudos que objetivam mimetizar as consequências desenvolvimentais da exposição à adversidade durante o início da vida (Kuma et al., 2004; Rentesi et al., 2013; Holland et al., 2014). Dentre os diversos modelos, a PM é considerada um dos modelos mais robustos e capazes de gerar um comportamento tipo-depressivo (Rutter, 1995; Barreau et al., 2004; Rentesi et al., 2013; Réus et al., 2013, 2015). Estudos demonstraram que a exposição à PM aumentou os níveis plasmáticos do hormônio adrenocorticotrópico (ACTH) e corticosterona na prole adulta, sugerindo uma hiperativação do eixo hipotálamo-hipófise-adrenal (HPA) e insensibilidade ao *feedback* negativo do hormônio do estresse, o cortisol (Plotsky e Meaney, 1991; Gesing et al., 2001; Daniels et al., 2001). Além disso, a resposta do cortisol ao estresse já mostrou diferenças entre os sexos ao diminuir durante as fases de alto estradiol do ciclo menstrual nas fêmeas (Albert e Newhouse, 2019).

O presente estudo mostrou que ratos machos submetidos a PM aumentaram o tempo de imobilidade e diminuíram o tempo de escalada no teste do nado forçado, demonstrando um comportamento do tipo-depressivo e a cetamina foi capaz de reverter estas alterações, mostrando um efeito antidepressivo. Corroborando o presente estudo, outros achados também demonstraram o efeito antidepressivo da cetamina em ratos machos submetidos a PM e testados no teste do nado forçado (Réus et al., 2013, 2015; Maciel et al., 2018; Shepard et al., 2018). Diferentemente dos machos, a PM não foi capaz de induzir um comportamento do tipo-depressivo nas

fêmeas. De fato, diferenças de sexo já foram descritas (Drossopoulou et al., 2004; Dalla et al., 2005, 2008; Mikail et al., 2012; Kokras et al., 2015), indicando que ratos machos exibem maior tempo de imobilidade do que nas fêmeas (Barros e Ferigolo, 1998; Bielajew et al., 2003), apesar de estudos anteriores terem relatado resultados contraditórios (Drossopoulou et al., 2004; Dalla et al., 2005). Carrier e colaboradores (2013) e Franceschelli e colaboradores (2015) demonstraram que as ratas fêmeas foram mais sensíveis aos efeitos antidepressivos rápidos da cetamina no teste do nado forçado. Esta variação dos resultados pode estar relacionada as mudanças comportamentais associadas ao ciclo estral das fêmeas (Contreras et al., 1998; Frye e Wall, 2002).

Já no teste do campo aberto o presente estudo mostrou que houve uma diminuição no número de *rearings* nos ratos machos privados tratados com cetamina, sem alteração significativa para o número de *crossings* nos machos e *crossings* e *rearings* nas fêmeas. Estudos prévios já mostraram que a cetamina não apresentou efeitos no teste do campo aberto (Garcia et al., 2008a, b). Porém, outro estudo mostrou que camundongos da linhagem C57BL/6 tratados com cetamina tiveram um aumento na atividade locomotora em comparação com camundongos da linhagem Balb/c (Akillioglu et al., 2012). Os resultados do presente estudo sugerem que a diminuição do número de *rearings* no teste do campo aberto possa estar relacionado com o aumento do tempo de imobilidade no teste do nado forçado, porém mais estudos são necessários para explicar por que a cetamina apresentou esse efeito nos animais privados.

A exposição constante a diferentes protocolos de estresse, induz a formação de um quadro de estresse oxidativo, o qual se caracteriza pelo desequilíbrio entre o aumento da produção de espécies altamente reativas e a diminuição da capacidade antioxidante tecidual (Fontella et al., 2005; De Vasconcellos et al., 2006; Enache et al., 2008; Hovatta et al., 2010; Schiavone et al., 2013; Teixeira et al., 2014). Diferenças sexuais nos parâmetros de estresse oxidativo foram observadas em estudos pré-clínicos e clínicos, em que os machos apresentaram maior estresse oxidativo do que as fêmeas (Dantas et al., 2004; Jung et al., 2004; Wong et al., 2015; Khalifa et al., 2017). As diferenças de sexo foram observadas na enzima NADPH oxidase (NOX) (Dantas et al., 2004; Edirimanne et al., 2007; Miller et al., 2007; Wong et al., 2015), que é um importante gerador de estresse oxidativo nas células (Drummond et al., 2011).

Estudos apontam a presença elevada de marcadores de estresse oxidativo e inflamação em ratos submetidos à PM (Holland et al., 2014; Réus et al., 2017). De fato, o presente estudo mostrou que nos ratos machos privados houve um aumento dos níveis de TBARS no CF e no hipocampo, porém o tratamento com cetamina foi capaz de reverter este aumento. Nas fêmeas privadas, houve um aumento dos níveis de TBARS no hipocampo. Em relação aos níveis da carbonilação de proteínas, tanto nos machos privados quanto nas fêmeas privadas, houve um aumento dos níveis de TBARS e o tratamento com cetamina reduziu estes níveis. Corroborando o presente trabalho, um estudo prévio mostrou que ratos machos submetidos ao protocolo de PM tiveram um aumento nos níveis de peroxidação lipídica e carbonilação de proteínas e que a administração de uma única dose de cetamina-S reverteu este dano, quando avaliado 14 dias após a aplicação (Réus et al., 2015a, b). A PM promove a hiperfunção do eixo HPA e liberação exacerbada de corticosterona e inúmeros estudos correlacionam o aumento dos glicocorticoides com o aumento do estresse oxidativo (Costantini et al., 2011; Chitty et al., 2015; Liu et al., 2002; McIntosh et al., 1998; Schiavone et al., 2013, 2015).

Estudos têm demonstrado que a superprodução de espécies reativas ao nitrogênio resulta em processos oxidativos e inflamatórios, levando a neurotoxicidade (Sayre et al., 2008). De fato, achados na literatura já demonstraram que níveis aumentados de óxido nítrico e nitrito estão associados a fisiopatologia do TDM (Maes et al., 2011). O presente estudo mostrou um aumento na concentração de nitrito/nitrato no CF e hipocampo dos ratos machos privados e o tratamento com cetamina reverteu este aumento somente no CF. Já nas fêmeas privadas, houve um aumento da concentração de nitrito/nitrato no CF, contudo o tratamento com cetamina não foi capaz de reverter este aumento. Maciel e colaboradores (2018) mostraram que o tratamento com cetamina foi capaz de reverter o aumento da concentração de nitrito/nitrato em ratos machos submetidos aos protocolos de PM e de estresse crônico moderado somente em algumas regiões cerebrais. Este é o primeiro estudo que mostra os efeitos da PM e do tratamento com cetamina sobre a concentração de nitrito/nitrato em ratas fêmeas. Estes resultados sugerem que o efeito neuroprotetor da cetamina sobre a concentração de nitrito/nitrato pode estar relacionado ao sexo e diferentes regiões cerebrais.

O presente estudo também demonstrou um aumento da atividade da MPO no hipocampo de ratos machos submetidos a PM e o tratamento com cetamina foi capaz

de reverter este aumento; e nas fêmeas privadas, o tratamento com cetamina diminuiu a atividade da MPO no CF em relação ao grupo controle e ao privado. De fato, o aumento da atividade da MPO foi correlacionado com a peroxidação lipídica e sintomas depressivos em humanos (Vaccarino et al., 2008; Galecki et al., 2010). A enzima MPO está presente nos neutrófilos, monócitos e células microgliais. Ainda, além das EROs, a MPO induz a uma produção de citocinas pró-inflamatórias envolvidas em doenças neurodegenerativas (Lefkowitz e Lefkowitz, 2008) e na perda da neurogênese no hipocampo (Ekdahl et al., 2003). Pesquisas mostraram que níveis altos da enzima MPO foi relacionada com o TDM (Maciel et al., 2018; Vaccarino et al., 2008). Corroborando os presentes achados, Maciel e colaboradores (2018), mostraram que o tratamento agudo com cetamina foi capaz de diminuir a atividade da MPO em algumas estruturas cerebrais relacionadas ao TDM. Desta forma, o presente estudo sugere que a cetamina é capaz de apresentar um efeito neuroprotetor sobre a atividade da MPO.

Os grupos sulfidril (SH) são considerados os maiores e mais frequentes antioxidantes no plasma (Pérez et al., 2012). Como se sabe, à redução nos níveis de sulfidril indicam maior dano oxidativo à proteína, pois a maioria das proteínas plasmáticas possui grupamentos sulfidril livres, que podem ser oxidados pela ação de radicais livres (Zoppi et al., 2003; Souza et al., 2010). Assim, a quantificação da concentração plasmática dos grupamentos sulfidril totais fornece uma ideia do nível de ataque oxidativo a proteínas plasmáticas (Zoppi et al., 2003). Ainda, diversas patologias como doenças cardiovasculares, aterosclerose, câncer e doenças neurodegenerativas se associam com oxidação ou modificação dos grupamentos sulfidril de maneira a sugerir sua atuação na fisiopatologia desses quadros (Oliveira e Laurindo, 2018). De fato, o presente estudo mostrou que somente os ratos machos submetidos a PM diminuíram o conteúdo de sulfidrilas no CF e no hipocampo, sugerindo que a PM levou a um maior dano a proteínas nestas regiões cerebrais e que isto também possa estar relacionado ao sexo. Além disso, a cetamina não exerceu efeitos no conteúdo de sulfidrilas de ratos machos ou fêmeas que foram submetidos à PM. Este é o primeiro estudo que mostra o efeito da cetamina sobre o conteúdo de sulfidrilas em regiões cerebrais em ratos machos e fêmeas submetidos a PM, sugerindo que o efeito antidepressivo da cetamina possa estar relacionado a outras vias cerebrais relacionadas ao estresse oxidativo, tais como peroxidação lipídica e carbonilação de proteínas.

O sistema de defesa enzimático inclui as enzimas SOD e CAT. Essas enzimas agem por meio de mecanismos de prevenção, impedindo e/ou controlando a formação de radicais livres e espécies não-radicaais, envolvidos com a iniciação das reações em cadeia que culminam com propagação e amplificação do processo e, conseqüentemente, com a ocorrência de danos oxidativos (Ferreira e Matsubara, 1997; Schneider e Oliveira, 2004). Alguns estudos já demonstraram que a atividade da SOD e da CAT estão reduzidas em pacientes com TDM (Herken et al., 2007; Padurariu et al., 2010).

O presente estudo mostrou que a PM foi capaz de diminuir a atividade da SOD e da CAT no CF e hipocampo dos ratos machos e fêmeas. De fato, outros autores já observaram que em animais submetidos ao protocolo de PM, as atividades da SOD e CAT encontram-se reduzidas nas regiões cerebrais relacionadas à regulação do humor, tais como CF, hipocampo e núcleo acumbens (Che et al., 2015; Liu et al 2015; Réus et al., 2015a; Ortmann et al., 2016; Maciel et al., 2018). Além disso, o presente estudo também mostrou que os ratos machos e fêmeas privados tratados com cetamina não tiveram alterações na atividade da SOD e da CAT. Gazal e colaboradores (2014) demonstraram que o tratamento com cetamina foi capaz de diminuir a atividade das enzimas antioxidantes SOD e CAT em animais submetidos a um modelo animal de mania. Ainda, Hou e colaboradores (2013) mostraram que a administração crônica de cetamina, em animais submetidos ao modelo animal de esquizofrenia, foi capaz de aumentar o óxido nítrico no CPF, hipocampo e soro e diminuiu a atividade da SOD no hipocampo. No entanto, dependendo do tempo em que a cetamina é administrada, esta pode ter um efeito antioxidante. Como mostrado por Réus e colaboradores (2015d), a atividade da SOD foi aumentada nos animais controles que receberam cetamina por 14 dias no CF e núcleo acumbens e foi diminuída nos animais privados que receberam salina e cetamina.

Estudos já mostraram que mulheres e homens têm diferenças na ativação imunológica (Fish et al, 2008) e, que estas diferenças na ativação, podem estar relacionadas com a sintomatologia e prevalência do TDM. De fato, diferenças sexuais nos marcadores inflamatórios relacionados ao TDM foram relatadas por Domenici e colaboradores (2010), que encontrou interações significativas entre sexo e diagnóstico, incluindo hormônio de crescimento e proteínas envolvidas na resposta imune.



A IL-6 é uma citocina inflamatória potente, com atividade redundante e pleiotrópica que medeia uma série de funções fisiológicas, incluindo a diferenciação de linfócitos, proliferação e sobrevivência celular, além de potencializar sinais apoptóticos (Heinrich et al., 1998; Kamimura et al., 2003). Adicionalmente, a IL-6 exerce efeitos na formação óssea, metabolismo geral e funções endócrinas, tendo a habilidade de afetar diversos tecidos e órgãos (Wolvekamp e Marquet, 1990; Ershler, 1993). Estudos clínicos e com animais têm mostrado que a IL-6 pode ter um importante papel na fisiopatologia do TDM bem como nos efeitos do seu tratamento (Nukina et al., 2001; Jankord et al., 2010; Augustine et al., 2014). Níveis aumentados de IL-6 podem levar a uma disfunção do eixo HPA, alterações na neurotransmissão sináptica e redução dos fatores neurotróficos (Ting et al., 2020). O presente trabalho mostrou que os ratos machos privados tiveram aumento nos níveis da IL-6 no hipocampo e o tratamento com cetamina foi capaz de reverter este efeito. Nukina e colaboradores (2001) demonstraram que concentrações plasmáticas de IL-6 aumentaram após uma hora de estresse, e logo após, diminuíram gradativamente. Ainda, outro estudo mostrou que houve um aumento na expressão de RNAm da IL-6 juntamente com um aumento de quatro vezes nos níveis da IL-6 circulante no hipotálamo de ratos submetidos ao protocolo de estresse (Jankord et al., 2010). Em relação ao tratamento com cetamina, Yang e colaboradores (2013) mostraram que administração deste fármaco diminuiu significativamente o tempo de imobilidade dos ratos no teste do nado forçado e diminuiu a expressão de IL-6 no CF e hipocampo. Os achados do presente estudo sugerem que a PM foi capaz de induzir um estado inflamatório em algumas regiões cerebrais relacionadas ao TDM e os efeitos antidepressivos induzidos pela cetamina podem estar associados à diminuição dos níveis cerebrais de IL-6.

## 6. CONCLUSÃO

Em consonância ao objetivo geral deste trabalho, os dados obtidos com a pesquisa, possibilitaram observar as diferenças da ação da cetamina em áreas cerebrais envolvidas com o TDM e ainda, a atividade de biomarcadores associados a comportamentos depressivos em animais machos e fêmeas. Tais resultados contemplam a cetamina como uma promissora forma de tratamento do TDM, considerando a redução e a reversão de biomarcadores neuroinflamatórios.

O modelo experimental de privação materna também foi fundamental para obtenção dos resultados. Entretanto, se faz necessário observar as variáveis destacadas na discussão apresentada, considerando os resultados obtidos em ratos machos e fêmeas assim como as variáveis observadas em regiões distintas do cérebro envolvidas com o TDM.

Neste contexto ainda que os resultados apresentem eficácia em relação aos biomarcadores inflamatórios e de estresse oxidativo, sugere-se novos estudos com o objetivo de avaliar o comportamento de fêmeas e machos em outros períodos da vida, assim como a possível inibição do ciclo estral, para averiguação das discrepâncias observadas com relação a privação materna e os efeitos da cetamina em outras fases de vida, especialmente das fêmeas.

Por fim, considera-se que os achados deste estudo contribuirão para pesquisas futuras na busca de novas e, cada vez mais eficazes alternativas de tratamento para o TDM.

## REFERÊNCIAS

- Abdallah CG. Ketamine and rapid-acting antidepressants: a window into a new neurobiology for mood disorder therapeutics. *Annual Review of Medicine*. Jan. 2015; v.66 p.509-523, doi: 10.1146/annurev-med-053013-062946
- Abelaira HM, Reus GZ, Neotti MV, Quevedo J. The role of mTOR in depression and antidepressant responses. *Life Sciences*. 2014;(101):10–14.
- Abelaira HM, Reus GZ, Quevedo J. Animal models as tools to study the pathophysiology of depression. *Rev Bras Psiquiatr*. 2013;(35):112–120.
- Aebi H. Catalase in vitro. *Oxygen Radicals in Biological Systems*. 1984;121–126.
- Akillioglu K, Melik EB, Melik E, Boga A. Effect of ketamine on exploratory behaviour in BALB/C and C57BL/6 mice. *Pharmacol Biochem Behav*. 2012;(100):513-517
- Aksenov MY, Markesbery WR. Changes in thiol content and expression of glutathione redox system genes in the hippocampus and cerebellum in Alzheimer's disease. *Neurosci Lett*. 2001; 302(2-3):141-5.
- Aloisi F. In: *Neuroglia*. 2nd ed Kettenmann H, Ransom BR, editors. Oxford University Press; New York: 2005;285–301.
- Albert KM, Newhouse PA. Estrogen, Stress, and Depression: Cognitive and Biological Interactions. *Annu Rev Clin Psychol*. 2019 May 7;15:399-423. doi: 10.1146/annurev-clinpsy-050718-095557.
- American Psychiatric Association . *Manual diagnóstico e estatístico de transtornos mentais: DSM-5*. 5ªed. Porto Alegre: Artmed. 2014
- Amidfar M, Woelfer M, Réus GZ, Quevedo J, Walter M, Kim YK. The role of NMDA receptor in neurobiology and treatment of major depressive disorder: Evidence from translational research. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*. 2019;Aug 30;94:109668. doi: 10.1016/j.pnpbp.2019.109668. Epub 2019 Jun 14. PMID: 31207274.
- Anderson IM, Juhasz G, Thomas E, Downey D, McKie S, Deakin JF, Elliott R. The effect of acute citalopram on face emotion processing in remitted depression: a pharmacMRI stud., *Eur Neuropsychopharmacol* 2011; 21 (1): 140-8.
- Angst J. Gender differences in depression: epidemiological findings from the European Depres I and II studies. *Eur Arch Psychiatry Clin Neurosci*. 2002;252(5):201-9.
- Augustine LF, Nair KM, Rao SF, Rao MV, Ravinder P, Balakrishna N, Laxmaiah A, Vazir S. Adolescent life-event stress in boys is associated with elevated il-6 and hepcidin but not hypoferremia. *J. Am. Coll. Nutr*. 2014;33, 354–362.

- Auer DP, Pütz B, Kraft E, Lipinski B, Schill J, Holsboer F. Reduced glutamate in the anterior cingulate cortex in depression: an in vivo proton magnetic resonance spectroscopy study. *Biol Psychiatry*. 2000;47:305–313.
- Auer RN. Effect of age and sex on N-methyl-D-aspartate antagonist-induced neuronal necrosis in rats. *Stroke* 1996;(27) 743-6. 8.
- Autry AE, Adachi M, Nosyreva E, Na ES, Los MF, Cheng PF, Kavalali ET, Monteggia LM. NMDA receptor blockade at rest triggers rapid behavioural antidepressant responses. *Nature* 2011;(475)91-5. 3.
- Bakunina, N., Pariante, CM e Zunszain, PA. Mecanismos imunológicos ligados à depressão via estresse oxidativo e neuroprogressão. *Immunology*. 2015;144: 365-373. doi: 10.1111 / imm.12443.
- Bannister J V, Calabrese L. Assays for superoxide dismutase. *Methods Biochem Anal*. 1987;32:279–312.
- Barbosa KBF., Costa N.M.V., Gonçalves RC, Paula SO, Rodrigues VP, Bressan J. Estresse oxidativo: conceito, implicações e fatores modulatórios *Rev. Nutr., Campinas*. Jul./ago 2010;23(4):629-643.
- Barros HM , Ferigolo M. Ethopharmacology of imipramine in the forced-swimming test: gender differences *Neurosci. Biobehav Rev*. 1998(23); pp. 279-286
- Berman, R M. Antidepressant effects of ketamine in depressed patients. *Biological Psychiatry*. Feb.2000; v.47, n 4, p.351-354. doi: 10.1016/S0006-3223 (99)00 230-9
- Bell-McGinty s, Butters MA, Meltzer CC, Greer PJ, Reynolds CF, Becker JT. Brain morphometric abnormalities in geriatric depression: Long-term neurobiological effects of illness duration. *Am J Psychiatry*. 2002;159:1424–1427.
- Belmaker RH, Agam G. Major depressive disorder. *N Engl J Med*.2008;358: 55–68.
- Berman RM, Cappiello A, Anand A, et al. Antidepressant effects of ketamine in depressed patients. *Biol Psychiatry*. 2000;47:351-354.
- Bielajew C, Konkle A, Kentiner A, Baker S, Stewart A, Hutchins A. *et al*. Strain and gender specific effects in the forced swim test: effects of previous stress exposure. *Estress*. 2003(6); pp. 269-280.
- Bhatt S, Nagappa AN, Patil CR. Role of oxidative stress in depression. *Drug Discov Today*. 2020 Jul;25(7):1270-1276. doi: 10.1016/j.drudis.2020.05.001. Epub 2020 May 8. PMID: 32404275.
- Bremner JD, Narayan M, Anderson ER, Staib LH, Miller HL, Charney DS. Hippocampal volume reduction in major depression. *Am J Psychiatry*. 2000;157:115 118.
- Briley M, Moret C. Present and future anxiolytics. *IDrugs* 2000;(3): 695–9.

Bromet E, Andrade LH, Hwang I, Sampson NA, Alonso J, Girolamo G, et al. Cross-national epidemiology of DSM-IV major depressive episode. *BMC Med* 2011;9:90.

Carballedo A, Scheuerecker J, Meisenzahl E, Schoepf V, Bokde A, Moller HJ, Doyle M, Wiesmann M, Frodl T. Functional connectivity of emotional processing in depression, *J Affect Disord* 2011;(134) 272-9. 23.

Carrier N, Kabbaj M. Sex differences in the antidepressant-like effects of ketamine. *Neuropharmacology* 2013;(70) 27-34. 18.

Cavanagh A, Wilson CJ, Caputi P, Kavanagh DJ. Symptom endorsement in men versus women with a diagnosis of depression: A differential item functioning approach. *Int J Soc Psychiatry*. 2016 Sep;62(6):549-59. doi: 10.1177/0020764016653980. Epub 2016 Jun 21. PMID: 27335340.

Cavanagh A, Wilson CJ, Kavanagh DJ, Caputi P. Differences in the Expression of Symptoms in Men Versus Women with Depression: A Systematic Review and Meta-analysis. *Harv Rev Psychiatry*. 2017 Jan/Feb;25(1):29-38. doi: 10.1097/HRP.000000000000128. PMID: 28059934.

Cavanagh A, Wilson CJ, Caputi P, Kavanagh DJ. Symptom endorsement in men versus women with a diagnosis of depression: A differential item functioning approach. *Int J Soc Psychiatry*. 2016;62(6):549-559 doi:10.1177/0020764016653980

Celada P, Puig M, Amargos-Bosch M, Adell A, Artigas F. The therapeutic role of 5-HT<sub>1A</sub> and 5-HT<sub>2A</sub> receptors in depression. *J Psychiatry Neurosci* 2004;(29) 252- 65. 21.

Chatuverdi HK, Bapna JS, Chandra D. Effect of fluvoxamine and N-methyl-D aspartate receptor antagonists on shock-induced depression in mice. *Indian J Physiol Pharmacol* 2001;45:199–207.

Chitty KM, Lagopoulos J, Hickie IB, Hermens DF. A longitudinal proton magnetic resonance spectroscopy study investigating oxidative stress as a result of alcohol and tobacco use in youth with bipolar disorder. *Journal of affective disorders*. v.175C, p. 481- 487, 2015.

Clarkson PM, Thompson HS. Antioxidants: what role do they play in physical activity and health? *Am J Clin Nutr*. 2000; 72(2):637-46.

Costantini D, Marasco V, Moller A. A meta-analysis of glucocorticoids as modulators of oxidative stress in vertebrates. *Journal of comparative physiology. B, biochemical systemic, and environmental physiology*. 2011;v.181, n.4, p.447–456.

Contreras C, Martínez-Mota L, Saavedra M. Desipramine restricts estral cycle oscillations in swimming. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*. 1998;(22) pp. 1121-1128

Coryell W, Nopoulos P, Drevets W, Wilson T, Andreasen NC. Subgenual prefrontal cortex volumes in major depressive disorder and schizophrenia: diagnostic specificity and prognostic implications. *Am J Psychiatry*. 2005 Sep;162(9):1706-12. doi: 10.1176/appi.ajp.162.9.1706. PMID: 16135631.

Culmsee C, Michels S, Scheu S, Arolt V, Dannlowski U, Alferink J. Mitochondria, Microglia, and the Immune System-How Are They Linked in Affective Disorders? *Front Psychiatry*. 2019 Jan 9;9:739. doi: 10.3389/fpsy.2018.00739. PMID: 30687139; PMCID: PMC6333629.

Dalla C, Drossopoulou G, Xagoraris M, Kokras N, Sfikakis A, Papadopoulou-Daifoti Z. Chronic mild stress impact: are females more vulnerable?. *Neuroscience*. 2005;(135), pp.703-714.

Dalla C, Antoniou K, Kokras N, Drossopoulou G, Papathanasiou G, Bekris S, Daskas S, Papadopoulou-Daifoti Z. Sex differences in the effects of two stress paradigms on dopaminergic neurotransmission *Physiol. Behav*. 2008;(93), pp. 595-605

Dantas AP, do Franco MC, Silva-Antonialli MM, Tostes RC, Fortes ZB, Nigro D, Carvalho MH. Gender differences in superoxide generation in microvessels of hypertensive rats: role of NAD(P)H-oxidase. *Cardiovasc Res*. 2004;61(1):22–9.

De Young LM, Kheifets JB, Ballaron SJ, Young JM. Edema and cell infiltration in the phorbol ester-treated mouse ear are temporally separate and can be differentially modulated by pharmacologic agents. *Agents Actions*. 1989;26(3–4):335–41.

Dingledine RB, Bowie D, Traynelis, SF. The glutamate receptor ion channels. *Pharmacol Rev*.1999; (51):7-61.

Drevets WC. Neuroimaging abnormalities in the amygdala in mood disorders. *Annals of the New York Academy of Sciences*. 2003; 985: 420–444.

Douglas BG, Dagirmanjian R. The effects of magnesium deficiency of ketamine sleeping times in the rat. *Br J Anaesth* 1975;(47) 336-40.

Domenici E, Willé DR, Tozzi F, Prokopenko I, Miller S, McKeown A. Plasma protein biomarkers for depression and schizophrenia by multi analyte profiling of case-control collections. *PLoS One*. 2010;5: e9166 10.1371/journal.pone.0009166

Drossopoulou G, Antoniou K, Kitraki E, Papathanasiou G, Papalexi E, Dalla C, Papadopoulou-Daifoti Z. Sex differences in behavioral, neurochemical and neuroendocrine effects induced by the forced swim test in rats. *Neuroscience*, 2004;(126), pp. 849-857

Drevets WC. Orbitofrontal cortex function and structure in depression, *Ann N Y Acad Sci*. 2007;(1121) 499-527. 22.

Drummond GR, Selemidis S, Griendling KK, Sobey CG. Combating oxidative stress in vascular disease: NADPH oxidases as therapeutic targets. *Nature Reviews Drug Discovery*. 2011;10(6):453–71

Dunn RT, Kimbrell TA, Ketter TA, Frye MA, Willis MW, Luckenbaug DA, Post RM. Principal components of the Beck Depression Inventory and regional cerebral metabolism in unipolar and bipolar depression. *Biological Psychiatry*. 2002; 51:387-399.

Edirimanne VE, Woo CW, Siow YL, Pierce GN, Xie JY, KO Homocysteine stimulates NADPH oxidase-mediated superoxide production leading to endothelial dysfunction in rats. *Can J Physiol Pharmacol*. 2007;85(12):1236-47.

Ekdahl CT, Claassen JH, Bonde S, Kokaia Z, Lindvall O. Inflammation is detrimental for neurogenesis in adult brain. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2003; 100(23): 13632-13637.

Enache M, Van Waes V, Vinner E, Lhermitte M, Maccari S, Darnaudéry M. Impact of an acute exposure to ethanol on the oxidative stress status in the hippocampus of prenatal restraint stress adolescent male rats. *Brain research*. 2008;v.29, n.1191, p.55-62.

Ershler WB. Interleukin-6: a cytokine for gerontologists. *J Am Geriatr Soc*. 1993;41, 176-181.

Esterbauer H, Cheeseman KH. Determination of aldehydic lipid peroxidation products: Malonaldehyde and 4-hydroxynonenal. *Methods Enzymol*. 1990;186(C):407-21.

Farber NB, Newcomer JW, Olney JW. The glutamate synapse in neuropsychiatric disorders. Focus on schizophrenia and Alzheimer's disease. *Prog Brain Res*. 1998; 116:421-37.

Farkas J, Reglodi D, Gaszner B, et al. Effects of maternal separation on the neurobehavioral development of newborn Wistar rats. *Brain Res Bull*. 2009;79(3-4):208-214. doi:10.1016/j.brainresbull.2008.12.011

Felger JC, Li Z, Haroon E, Woolwine BJ, Jung MY, Hu X, Miller AH. Inflammation is associated with decreased functional connectivity within corticostriatal reward circuitry in depression. *Mol Psychiatry*. 2016 Oct;21(10):1358-65. doi: 10.1038/mp.2015.168. Epub 2015 Nov 10. PMID: 26552591; PMCID: PMC4862934.

Ferreira ALA, Matsubara LS. Radicais livres: conceitos, doenças relacionadas, sistema de defesa e estresse oxidativo. *RAMB*. 1997;43(1):61-8.

Fish EN. The X-files in immunity: sex-based differences predispose immune responses. *Nat Rev Immunol*. 2008; 7:37-44.

Fontella FU, Siqueira IR, Vasconcellos AP, Tabajara, AS, Netto CA, Dalmaz C. Repeated restraint stress induces oxidative damage in rat hippocampus. *Neurochemical research*. 2005;v. 30, n. 1, p. 105-111.

Franceschelli A, Sens J, Herchick S, Thelen C, Pitychoutis PM. Sex differences in the rapid and the sustained antidepressant-like effects of ketamine in stress-naive and "depressed" mice exposed to chronic mild stress. *Neuroscience* 2015;(219) 49-60.

Frye C, Walf A. Changes in progesterone metabolites in the hippocampus can modulate open field and forced swim test behavior of proestrous rats. *Horm Behav.* 2002 (41), pp.306-315

Garcia LS, Comim CM, Valvassori SS, Réus GZ, Barbosa LM, Andreazza AC, Stertz L, Fries GR, Gavioli EC, Kapczinski F, Quevedo J. Acute administration of ketamine induces antidepressant-like effects in the forced swimming test and increases BDNF levels in the rat hippocampus, *Prog. Neuropsychopharmacol. Biol. Psychiatry* 2008; (32),140–144.

Gałecki P, Florkowski A, Bobińska K, Śmigielski J, Bieńkiewicz M, Szemraj J. Functional polymorphism of the myeloperoxidase gene (G463A) in depressive patients. *Acta Neuropsychiatr* 2010; 22(5): 218- 222.

Garcia LS, Comim CM, Valvassori SS, Réus GZ, Andreazza AC, Stertz L. Chronic administration of ketamine elicits antidepressant-like effects in rats without affecting hippocampal brain-derived neurotrophic factor protein levels basic. *Clin pharmacol Toxicol.* 2008;(103), pp.502-506.

Gesing A, Bilang-Bleuel A, Droste SK, Linthorst AC, Holsboer F, Reul JM. Psychological stress increases hippocampal mineralocorticoid receptor levels: involvement of corticotropin-releasing hormone. *J Neuroscience.* 2001;21:4822–4829.

Ghasemi M, Kazemi MH, Yoosefi A, Ghasemi A, Paragomi P, Amini H, Afzali MH. Rapid antidepressant effects of repeated doses of ketamine compared with electroconvulsive therapy in hospitalized patients with major depressive disorder. *Psychiatry Res.* 2014; 28; 215:355-361.

Giridharan VV, Réus GZ, Selvaraj S, Scaini G, Barichello T, Quevedo J. Maternal deprivation increases microglial activation and neuroinflammatory markers in the prefrontal cortex and hippocampus of infant rats. *J Psychiatr Res.* 2019;115:13-20. doi:10.1016/j.jpsychires.2019.05.001

Gorman JM. Gender differences in depression and response to psychotropic medication. *Gend Med.* 2006 Jun;3(2):93-109. doi: 10.1016/s1550-8579(06)80199-3. PMID: 16860269 Grigoriadis, G.E. Robinson. Gender issues in depression, *Ann Clin Psychiatry* 2007;(19) 247-55.

Green LC, Wagner DA, Glogowski J, Skipper PL, Wishnok JS, Tannenbaum SR. Analysis of nitrate, nitrite, and [<sup>15</sup>N]nitrate in biological fluids. *Anal Biochem.* 1982;126(1):131–8.



Green SM, Li J. Ketamine in adults: what emergency physicians need to know about patient selection and emergence reactions. *Acad Emerg Med*. 2000 7:278-281. Doi: 10.1111/j.1553-2712.2000.tb01076.x 2000.

Groenewegen HJ, Uylings HB. The prefrontal cortex and the integration of sensory, limbic and autonomic information. *Prog Brain Res* 2000;(126) 3-28.

Guillemin GJ. Quinolinic acid: neurotoxicity. *FEBS J*. 2012 Apr;279(8):1355. doi: 10.1111/j.1742-4658.2012.08493.x. Epub 2012 Mar 27. PMID: 22251552.

Harraz MM, Tyagi R, Cortes P, Snyder SH. Antidepressant action of ketamine via mTOR is mediated by inhibition of nitroergic Rheb degradation. *Mol Psychiatry*. 2016; 3:313–319.

Hashimoto K, Sawa A, Iyo M. Increased levels of glutamate in brains from patients with mood disorders. *Biol Psychiatry* 2007;62:1310–16.

Heinrich PC, Behrmann I, Muller-Newen G, et al. Interleukin-6- type cytokine signalling through the gp130/Jak/STAT pathway. *Biochem J*. 1998;334(Pt 2), 297–314.

Herken H, Gurel A, Selek S. Adenosine deaminase, nitric oxide, superoxide dismutase, and xanthine oxidase in patients with major depression: impact of antidepressant treatment. *Archives of Medical Research*. 2007;vol. 38, pp. 247–252.

Holden C. Sex and the suffering brain. *Science* 2005;(308) 1574.

Holland FH, Ganguly P, Potter DN, Chartoff EH, Brenhouse HC. Early life stress disrupts social behavior and prefrontal cortex parvalbumin interneurons at an earlier time-point in females than in males. *Neuroscience letter*. 2014;v. 30, n.566, p. 131-136.

Honack D, Loscher W. Sex differences in NMDA receptor mediated responses in rats. *Brain Res* 1993;(620) 167-70. 9.

Hovatta I, Juhila J, Donner J. Oxidative stress in anxiety and comorbid disorders. *Neuroscience research*. 2010;v.68, n.4, p.261–275.

Hoyo-Becerra C, Schlaak JF, Hermann DM. Insights from interferon-alpha-related depression for the pathogenesis of depression associated with inflammation. *Brain Behav Immun*. 2014;42:222–231.

Holland FH, Ganguly P, Potter DN, Chartoff EH, Brenhouse HC. Early life stress disrupts social behavior and prefrontal cortex parvalbumin interneurons at an earlier time-point in females than in males. *Neuroscience letter*. 2014;v.30, n.566, p.131-136.

Homayoun H, Moghaddam B. NMDA receptor hypofunction produces opposite effects on prefrontal cortex interneurons and pyramidal neurons. *J Neurosci*. 2007; 27:11496–11500.

Hovatta I, Juhila J, Donner J. oxidative stress in anxiety and comorbid disorders. *neuroscience research*. v. 68, n.4, p. 261–275, 2010.

Jacinto E, Loewith R, Schmidt A, Lin S, Ruegg MA, Hall A, Hall MN. Mammalian TOR complex 2 controls the actin cytoskeleton and is rapamycin insensitive. *Nature Cell Biol.* 2004;6:1122–28.

Jankord, R.; Zhang, R.; Flak, J.N.; Solomon, M.B.; Albers, J.; Herman, J.P. Stress activation of IL-6 neurons in the hypothalamus. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* 2011; 299, R343–R351.

Javitt DC. Glutamate as a therapeutic target in psychiatric disorders. *Molecular Psychiatry.* 2004;v. 9, p.984-997. doi: 10.1038/sj.mp.4001551

Jentsch MC, Burger H, Meddens MBM, et al. Gender Differences in Developing Biomarker-Based Major Depressive Disorder Diagnostics. *Int J Mol Sci.* 2020;21(9):3039. Published 2020 Apr 25. doi:10.3390/ijms21093039

Jevtovic-Todorovic V, Wozniak DF, Benshoff ND, Olney JW. A comparative evaluation of the neurotoxic properties of ketamine and nitrous oxide. *Brain Res* 2001;(895) 264-7.

Jung O, Schreiber JG, Geiger H, Pedrazzini T, Busse R, Brandes RP. gp91phox-containing NADPH oxidase mediates endothelial dysfunction in renovascular hypertension. *Circulation.* 2004;109(14):1795–801.

Justo LP, Borsonelo EC, de Borja Gonçalves Guerra A, Calil HM. A survey on anxious and depressive complaints of Brazilian women. *J Affect Disord.* 2007 Sep;102(1-3):259-64. doi: 10.1016/j.jad.2006.09.030. Epub 2006 Nov 14. PMID: 17109968.

Justo LP, Calil HM. Depression – does it affect equally men and women? *Rev. Psiq. Clín.* 2006;33 (2); 74-79.

Kamimura D, Ishihara K, Hirano T. IL-6 signal transduction and its physiological roles: the signal orchestration model. *Rev Physiol Biochem Pharmacol.* 2003;149, 1–38.

Kennedy SH, Javanmard M, Vaccarino FJ. A review of functional neuroimaging in mood disorders: positron emission tomography and depression. *Can J Psychiatry.* 1997; 42:467-75.

Khalifa AR, Abdel-Rahman EA, Mahmoud AM, Ali MH, Noureldin M, Saber SH, Mohsen M, Ali SS. Sex-specific differences in mitochondria biogenesis, morphology, respiratory function, and ROS homeostasis in young mouse heart and brain. *Physiol Rep.* 2017;5(6)

Khan A, Brodhead AE, Schwartz KA, Kolts RL, Brown WA. Sex differences in antidepressant response in recent antidepressant clinical trials. *J Clin Psychopharmacol* 2005;25(4): 318-24.

Khandaker GM, Zammit S, Burgess S, Lewis G, Jones PB. Longitudinal association between inflammatory markers and specific symptoms of depression in a prospective birth cohort. *Brain, Behavior, and Immunity*. 2018 (69), 264–272.

Kind PC, Neumann PE. Plasticity: downstream of glutamate. *Trends Neuroscience* 2001;24:553-5.

Knox JW, Bovill JG, Clarke RS, Dundee JW. Clinical studies of induction agents. XXXVI: Ketamine. *Br J Anaesth* 1970;(42) 875-85.

Kokras N, Antoniou K, Mikail HG, Kafetzopoulos V, Papadopoulou-Daifoti Z, Dalla C. Forced swim test: What about females? *Neuropharmacology*. 2015 Dec;99:408-21.

Kuma, H. et al. Early maternal deprivation induces alterations in brain-derived neurotrophic factor expression in the developing rat hippocampus. *Neuroscience Letters*, [s. l.], 2004;v. 372, n. 1–2, p. 68–73.

Krysko DV, Agostinis P, Krysko O, Garg AD, Bachert C, Lambrecht BN, et al. . Papel emergente de padrões moleculares associados a danos derivados de mitocôndrias na inflamação . *Trends Immunol*. 2011; 32: 157–64. 10.1016 / j.it.2011.01.005

Labaka A, Goñi-Balentziaga O, Lebeña A, Pérez-Tejada J. Biological Sex Differences in Depression: A Systematic Review. *Biol Res Nurs*. 2018 Jul;20(4):383-392. doi: 10.1177/1099800418776082. Epub 2018 May 14. PMID: 29759000.

Lefkowitz DL, Lefkowitz SS. Microglia and myeloperoxidase: a deadly partnership in neurodegenerative disease. *Free Radic Biol Med* 2008; 45(5):726-731.

Lepine BA, Moreno RA, Campos RN, Couttolenc BF. Treatment-resistant depression increases health cost and resource utilization. In: *Rev. Bras. Psiquiatr*. 2012; 34: 379 – 388.

Lener MS, Niciu MJ, Ballard ED, Park M., Park LT., Nugent AC, Zarate Jr C A. Glutamate and Gamma-Aminobutyric Acid Systems in the Pathophysiology of Major Depression and Antidepressant Response to Ketamine. *Biological psychiatry*. 2017;81(10), 886-897. PMID: 27449797.

Lesch KP, Schmitt A. Antidepressants and gene expression profiling: how to SNARE novel drug targets. *Pharmacogenomics J*. 2002;2:346–8.

Levine RL, Garland D, Oliver CN, Amici A, Climent I, Lenz AG, Ahn BW, Shaltiel S, Stadtman ER. Determination of carbonyl content in oxidatively modified proteins. *Methods Enzymol*. 1990;186, 464–478. [https://doi.org/10.1016/0076-6879\(90\)86141-h](https://doi.org/10.1016/0076-6879(90)86141-h)

Lezak MD, Howieson DB, Bigler ED, Tranel D. *Neuropsychological assessment* (5th ed.). New York, NY: Oxford University Press. (2012)

- Lepine BA, Moreno RA, Campos RN, Couttolenc BF. Treatment-resistant depression increases health cost and resource utilization. In: Rev. Bras. Psiquiatr. 2012;34: 379 – 388.
- Liu Y, Fiskum G, Schubert D. Generation of reactive oxygen species by the mitochondrial electron transport chain. Journal neurochemical. 2002;v. 80, s/n, p. 780– 787.
- Li N, Lee B, Liu RJ, Banasr M, Dwyer JM, Iwata M, Li XY, Aghajanian G, Duman RS. mTOR-dependent synapse formation underlies the rapid antidepressant effects of NMDA antagonists. Science 2010;(329)959-64.
- LI R., SHEN Y. - Estrogen and brain: synthesis, function and diseases. Front Biosc. 2005;10:257-67.
- Loewenthal K, Goldblatt V, Gordon T, Lubitsch G, Bicknell H, Fellowes D, et al. Gender and depression in Anglo-Jewry. Psychol Med 1995; 25(5): 1051-63.
- Lowry OH, Rosebrough, NJ, Farr A L, Randall R J. Protein measurement with the Folin phenol reagent. The Journal of biological chemistry.1951; 193(1), 265–275.
- Luft A, Mendes FF. Low S(+) ketamine doses: a review. Revista Brasileira de Anestesiologia. 2015;55: 460-469.
- Luo Z, Walsh K, Guarente L, Zang M. Hepatic overexpression of SIRT1 in mice attenuates endoplasmic reticulum stress and insulin resistance in the liver. FASEB J 2011;25(5):1664-1679.
- Maciel AL, Abelaira HM, de Moura AB, de Souza TG, Rosa T, Matos D, Tuon T, Garbossa L, Strassi AP, Fileti ME, Goldim MP, Mathias K, Petronilho F, Quevedo J, Réus GZ. Acute treatment with ketamine and chronic treatment with minocycline exert antidepressant-like effects and antioxidant properties in rats subjected different stressful events. Brain Res Bull. 2018 Mar;137:204-216.
- Maes M, Galecki P, Chang YS, Berk M. A review on the oxidative and nitrosative stress (O&NS) pathways in major depression and their possible contribution to the (neuro)degenerative processes in that illness. Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry 2011; 35(3):676–692
- Machado-Vieira R, Salvadore G, Luckenbaugh DA, Manji HK, Zarate Jr. CA. Rapid onset of antidepressant action: a new paradigm in the research and treatment of major depressive disorder. J Clin Psychiatry. 2008; 69: 946–958.
- Macqueen GM, Campbell S, McEwen B, Macdonald K, Amano S, Joffe RT, et al. Course of illness, hippocampal function and volume in major depression. Proc Natl Acad Sci USA. 2003;100:1387–1392.
- Maeng S, Zarate CA Jr, Du J, Schloesser RJ, McCammon J, Chen G, Manji HK. Cellular mechanisms underlying the antidepressant effects of ketamine: role of alpha-amino-3-hydroxy-5-methylisoxazole-4-propionic acid receptors. Biol Psychiatry.

2008;63:349-352.

Marcus SM, Young EA, Kerber KB, Kornstein S, Farabaugh AH, Mitchell J, Wisniewski SR, Balasubramani GK, Trivedi MH, Rush AJ. Gender differences in depression: findings from the STAR\*D study. *J Affect Disord* 2005; (87) 141-50. 15. S.

Mcintosh LJ, Cortopassi, KM, Sapolsky RM. Glucocorticoids may alter antioxidant enzyme capacity in the brain: kainic acid studies. *Brain research*. 1998;v.27, n.791, p.215-22.

Meloni D, Gambarana C, DE Montis MG, ET AL. Dizocilpine antagonizes the effect of chronic imipramine on learned helplessness in rats. *Pharmacol Biochem Be*. 1993;46:423–6.

Micallef J, Tardieu S, Gentile S, Fakra E, Jouve E, Sambuc R, Blin O. Effects of a subanaesthetic dose of ketamine on emotional and behavioral state in healthy subjects. *Neurophysiol Clin*. 2003; 33:138-147.

Miczek KA, YAP JJ, Covington III HE. Social stress, therapeutics and drug abuse: Preclinical models of escalated and depressed intake. *Pharmacology therapeutics*. 2008;v.120, n.2, p. 102-128.

Mikail HG, Dalla C, Kokras N, Kafetzopoulos V, Papadopoulou-Daifoti Z. Sertraline behavioral response associates closer and dose-dependently with cortical rather than hippocampal serotonergic activity in the rat forced swim stress *Physiol. Behav*. 2012;107, pp. 201-206.

Miller AA, Drummond GR, Mast AE, Schmidt HH, Sobey CG. Effect of gender on NADPH-oxidase activity, expression, and function in the cerebral circulation: role of estrogen. *Stroke*. 2007;38(7):2142–9.

Mintun MA, Sheline YI, Moerlein SM, Snyder AZ. Regional [<sup>18</sup>F]altanserin binding in the treatment of major depression. *Neuroimage* 11:S83.2000.

Morilak DA, Frazer A. Antidepressants and brain monoaminergic systems: a dimensional approach to understanding their behavioural effects in depression and anxiety disorders. *Int J Neuropsychopharmacol*. 2004;7:193–218.

Morris G, Walder KR, Berk M, Marx W, Walker AJ, Maes M, Puri BK. The interplay between oxidative stress and bioenergetic failure in neuropsychiatric illnesses: can we explain it and can we treat it? *Mol Biol Rep*. 2020 Jul;47(7):5587-5620. doi: 10.1007/s11033-020-05590-5. Epub 2020 Jun 20. PMID: 32564227.

Muller HK, Wegener G, Liebenberg N, Zarate CA, Popoli M Jr, Elfving B. Ketamine regulates the presynaptic release machinery in the hippocampus. *J Psychiatr Res*. 2013;(47) 892-9.

Nemeroff CB, Owens MJ. Treatment of mood disorders. *Nature neurosci*. 2002;5:1068-70.

- Nestler EJ, Carlezon JR WA. The mesolimbic dopamine reward circuit in depression. *Biological Psychiatry*. 2006; 59:1151–1159.
- Niciu MJ, Kelmendi B, Sanacora G. Overview of glutamatergic neurotransmission in the nervous system. *Pharmacol Biochem Be*. 2014 100:656-64.
- Nukina H, Sudo N, Aiba Y, Oyama N, Koga Y, Kubo C. Restraint stress elevates the plasma interleukin-6 levels in germ-free mice. *J. Neuroimmunol*. 2001;115, 46–52. [CrossRef]
- Ortmann CF, Réus GZ, Ignácio ZM, Abelaira HM, Titus SE, de Carvalho P, Arent CO, Dos Santos MA, Matias BI, Martins MM, de Campos AM, Petronilho F, Teixeira LJ, Morais MO, Streck EL, Quevedo J, Reginatto FH. Enriched Flavonoid Fraction from *Cecropia pachystachya* Trécul Leaves Exerts Antidepressant-like Behavior and Protects Brain Against Oxidative Stress in Rats Subjected to Chronic Mild Stress. *Neurotox Res*. 2016; 29(4): 469-483.
- Pál B. Involvement of extrasynaptic glutamate in physiological and pathophysiological changes of neuronal excitability. *Cell Mol Life Sci*. 2018 Aug;75(16):2917-2949. doi: 10.1007/s00018-018-2837-5. Epub 2018 May 15. PMID: 29766217.
- Palta P, Samuel LJ, Miller ER, Szanton SL. Depression and Oxidative Stress: Results From a Meta-Analysis of Observational. *Medicina psicossomática: janeiro de 2014 - Volume 76 - Edição 1 - p 12-19* doi: 10.1097
- Padurariu M, Ciobica A, Dobrin I, Stefanescu C. Evaluation of antioxidant enzymes activities and lipid peroxidation in schizophrenic patients treated with typical and atypical antipsychotics. *Neuroscience Letters*. 2010; vol. 479, no. 3, pp. 317–320,
- Pandya CD., Kristy R, Pillai HA. Antioxidantes como potencial terapêutico para distúrbios neuropsiquiátricos. *Biol. Psychiatry*, 46 (2013), pp 214-223
- Paul IA, Nowak G, Layer RT, Popik P, Skolnick P. Adaptation of the N-methyl-D-spartate receptor complex following chronic antidepressant treatments. *J Pharmacol Exp Ther*.1994;269:95–102.
- Pérez Y, Pérez L, Netto R, Lima D, Lima E. Malondialdehyde and the sulfhydryl groups as biomarkers of oxidative stress in patients with systemic lupus erythematosus. *Revista Brasileira de Reumatologia*.2012; 52: 656-660.
- Pfenninger EG1, Durieux ME, Himmelseher S. Cognitive impairment after small-dose ketamine isomers in comparison to equianalgesic racemic ketamine in human volunteers. *Anesthesiology*. 2002;96(2):357-66.
- Pilc A, Chaki S, Nowak G, Witkin JM. Mood disorders: Regulation by metabotropic glutamate Receptors. *Biochem Pharmacol*. 2008; 75: 997 – 1006.
- Pitychoutis PM, Dalla C, Sideris AC, Tsonis PA, Papadopoulou-Daifoti Z. 5-HT(1A), 5-HT(2A), and 5-HT(2C) receptor mRNA modulation by antidepressant treatment in the chronic mild stress. *Neuroscience*. 2012 May 17;210:152-67.

Pitsillou E, Bresnehan SM, Kagarakis EA, Wijoyo SJ, Liang J, Hung A, Karagiannis TC. The cellular and molecular basis of major depressive disorder: towards a unified model for understanding clinical depression. *Mol Biol Rep.* 2020 Jan;47(1):753-770. doi: 10.1007/s11033-019-05129-3. Epub 2019 Oct 14. PMID: 31612411.

Plotsky PM, Meaney MJ. Early, postnatal experience alters hypothalamic corticotropin-releasing factor (CRF) mRNA, median eminence CRF content and stress-induced release in adult rats. *Molecular brain research.* 1993;18:195–200. doi: 10.1016/0169-328X(93)90189-V.

Ragguett, R, Tamura J, McIntyre R. Acompanhando os avanços clínicos: Depressão. *CNS Spectrums.* 2019;24 (S1), 25-37. doi: 10.1017 / S1092852919001159.

Rentesi G. et al. Early maternal deprivation-induced modifications in the neurobiological, neurochemical and behavioral profile of adult rats. *Behavioural Brain Research,* [s. l.]. 2013;v. 244, p. 29–37.

Réus GZ, Nacif MP, Abelaira HM, Tomaz DB, dos Santos MA, Carlessi AS, da Luz JR, Gonçalves RC, Vuolo F, Dal-Pizzol F, Carvalho AF, Quevedo J. Ketamine ameliorates depressive-like behaviors and immune alterations in adult rats following maternal deprivation. *Neurosci Lett.* 2015 Jan 1;584:83-7. doi: 10.1016/j.neulet.2014.10.022. Epub 2014 Oct 20.

Réus GZ, Abelaira HM, dos Santos MA, Carlessi AS, Tomaz DB, Neotti MV, Liranço JL, Gubert C, Barth M, Kapczinski F, Quevedo J. Ketamine and imipramine in the nucleus accumbens regulate histone deacetylation induced by maternal deprivation and are critical for associated behaviors. *Behav Brain Res.* 2013 Nov 1;256:451-6. doi: 10.1016/j.bbr.2013.08.041. Epub 2013 Sep 1.

Réus GZ, Jansen K, Titus S, Carvalho AF, Gabbay V, Quevedo J. Kynurenine pathway dysfunction in the pathophysiology and treatment of depression: Evidences from animal and human studies. *J Psychiatr Res.* 2015a; 68:316-328.

Réus GZ, Carlessi AS, Titus SE, Abelaira HM, Ignácio ZM, da Luz JR, Matias BI, Bruchchen L, Florentino D, Vieira A, Petronilho F, Quevedo J. A single dose of S-ketamine induces long-term antidepressant effects and decreases oxidative stress in adulthood rats following maternal deprivation. *Dev Neurobiol.* 2015 Nov;75(11):1268-81.

Réus GZ, Stringari RB, Ribeiro KF, et al. Maternal deprivation induces depressive-like behaviour and alters neurotrophin levels in the rat brain. *Neurochem Res.* 2011;36(3):460-466. doi:10.1007/s11064-010-0364-3

Réus GZ, Fernandes GC, de Moura AB, Silva RH, Darabas AC, de Souza TG, Abelaira HM, Carneiro C, Wendhausen D, Michels M, Pescador B, Dal-Pizzol F, Macêdo DS, Quevedo J. Early life experience contributes to the developmental programming of depressive-like behaviour, neuroinflammation and oxidative stress. *J Psychiatr Res.* 2017 Dec;95:196-207.

Réus, G. Z., Silva, R. H., de Moura, A. B., Presa, J. F., Abelaira, H. M., Abatti, M., Vieira, A., Pescador, B., Michels, M., Ignácio, Z. M., Dal-Pizzol, F., & Quevedo, J. Early Maternal Deprivation Induces Microglial Activation, Alters Glial Fibrillary Acidic Protein Immunoreactivity and Indoleamine 2,3-Dioxygenase during the Development of Offspring Rats. *Molecular neurobiology*. 2019;56(2), 1096–1108. <https://doi.org/10.1007/s12035-018-1161-2>

Réus GZ, Nacif MP, Abelaira HM, Tomaz DB, dos Santos MA, Carlessi AS, Matias BI, da Luz JR, Steckert AV, Jeremias GC, Scaini G, Morais MO, Streck EL, Quevedo J. Ketamine treatment partly reverses alterations in brain derived- neurotrophic factor, oxidative stress and energy metabolism parameters induced by an animal model of depression. *Curr Neurovasc Res*. 2015d; 12:73-84

Rentesi G. Early maternal deprivation-induced modifications in the neurobiological, neurochemical and behavioral profile of adult rats. *Behavioural Brain Research*, [s. l.], v. 244, p. 29–37, 2013.

Rozenhal M, Laks J, Engelhardt E. Aspectos neuropsicológicos da depressão. *R Psiquiatr RS*. 2004; 26: 204-212.

Rutter M. Maternal deprivation. *Handbook of parenting, Vol 4: Applied and practical parenting*. [s. l.], 1995; v. 16, p. 3–31.

Sayre LM, Perry G, Smith MA. Oxidative stress and neurotoxicity. *Chem Res Toxicol* 2008; 21:172-188

Sanacora G, Gueorguieva R, Epperson CN, ET AL. Subtype-specific alterations of gamma-aminobutyric acid and glutamate in patients with major depression. *Arch Gen Psychiatry*. 2004; 61:705–13.

Sanacora G, Zarate CA, Krystal JH, Manji HK. Targeting the glutamatergic system to develop novel, improved therapeutics for mood disorders. *Nature rev*. 2008;7: 426-37.

Sattler R, Rothstein JD. Regulation and dysregulation of glutamate transporters. *Handb Exp Pharmacol*. 2006;(175):277-303. doi: 10.1007/3-540-29784-7\_14. PMID: 16722241.

Shah PJ, Ebmeier KP, Glabus MF, Goodwin GM. Cortical grey matter reductions associated with treatment resistant chronic unipolar depression. Controlled magnetic resonance imaging study. *Br J Psychiatry*. 1998;172:527–532.

Sheline Y, Wang P, Gado M, Csernansky J, Vannier M. Hippocampal atrophy in recurrent major depression. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1996; 93:3908–3913.

Shepard RD, Langlois LD, Browne CA, Berenji A, Lucki I, Nugent FS. Ketamine Reverses Lateral Habenula Neuronal Dysfunction and Behavioral Immobility in the Forced Swim Test Following Maternal Deprivation in Late Adolescent Rats. *Front Synaptic Neurosci*, 2018 Oct 30;10:39.



- Scheidegger M, Henning A, Walter M, Boeker H, Weidegan A, Seifritz E & Grimm S. Effects of ketamine on cognition-emotion interaction in the brain. In: *Neuroimage*. 2016;124; 8 – 15.
- Schiavone S, Jaquet, V, Trabace L, Krause KH. Severe life stress and oxidative stress in the brain: from animal models to human pathology. *antioxidants & redox signaling*. 2013;v. 18, n.12, p. 1475-1490.
- Schiavone S, Colaianna M, Curtis L. Impact of early life stress on the pathogenesis of mental disorders: relation to brain oxidative stress. *Current pharmaceutical design*. 2015;v.21,n.11, p. 404-412.
- Schneider CD, Oliveira AR. Radicais livres de oxigênio e exercício: mecanismos de formação e adaptação ao treinamento físico. *RBME*. 2004; 10(10):308-13
- Schmidt HD, Shelton RC, Duman RS. Functional biomarkers of depression: diagnosis, treatment, and thophysiology. *Neuropsychopharmacology*. 2011;36:2375–94
- Spiers JG, Chen HJ, Sernia C, Lavidis NA. Activation of the hypothalamic-pituitary-adrenal stress axis induces cellular oxidative stress. *Frontiers in neuroscience*. 2015;v.8, n.456, p.1-6.
- Shors TJ, Falduto J, Leuner B. The opposite effects of stress on dendritic spines in male vs. female rats are NMDA receptor-dependent. *Eur J Neurosci* 2004;(19) 145-50.
- Singh A, Kukreti R, Saso L, Kukreti S. Oxidative Stress: A Key Modulator in Neurodegenerative Diseases *Molecules*. 2019 Apr; 24(8): 1583
- Souza CT, Medeiros C, Silva LA, Silveira TC, Silveira PC, Pinho CA. et al. Serum measurement of muscle and oxidative damage in soccer players after a game. *Rev Bras Cineantropom Desempenho Hum*. 2010;12(4):269-274
- Spiers JG, Chen HJ, Sernia C,Lavidis NA. Activation of the hypothalamic-pituitary-adrenal stress axis induces cellular oxidative stress. *Frontiers in neuroscience*. 2015;v.8, n.456, p. 1-6.
- Stockmeier CA, Mahajan GJ, Konick LC, Overholser JC, Jurjus GJ, Meltzer HY, Uylings HB, Friedman L, Rajkowska G. Cellular changes in the postmortem hippocampus in major depression. *Biol Psychiatry*. 2004;56:640-50.
- Sublette ME, Russ MJ, Smith GS. Evidence for a role of the arachidonic acid cascade in affective disorders: a review. *Bipolar Disord*. 2004;6(2):95-105
- Sundaram G, Brew BJ, Jones SP, Adams S , Lim CK , Guillemin GJ. Toxicidade do ácido quinolínico em células oligodendrogliais: relevância para esclerose múltipla e estratégias terapêuticas. *J Neuroinflammation*. 2014;11 ( 1 ), p. 204.
- Teixeira BF, Santana DA SLN, Bezerra RF, Carvalho S, Fontes-Junior AE, Prediger DR, Crespo-Lopez EM, Maia CSF, Lima RR. Chronic ethanol exposure during

adolescence in rats induces motor impairments and cerebral cortex damage associated with oxidative stress. *Plos one*. 2014;v. 9. n.6.

Thase ME. Introduction: the dual-action debate: does pharmacology matter? In: *J Clin Psychiatry*. 2004;65: 3 – 4.

Trivedi MH, Rush AJ, Wisniewski SR, ET AL. STAR\*D Study Team. Evaluation of outcomes with citalopram for depression using measurement-based care in STAR\*D: implications for clinical practice. *Am J Psychiatry*. 2006;163:28–40.

Vaccarino V, Brennan ML, Miller AH, Bremner JD, Ritchie JC, Lindau F, Veledar E, Su S, Murrah NV, Jones L, Jawed F, Dai J, Goldberg J, Hazen SL. Association of major depressive disorder with serum myeloperoxidase and other markers of inflammation: a twin study. *Biol Psychiatry* 2008; 64(6): 476-83.

Vasconcellos AP, Nieto FB, Crema LM, Diehl LA, Almeida LM, Prediger ME, Rocha ER, Dalmaz C. Chronic lithium treatment has antioxidant properties but does not prevent oxidative damage induced by chronic variate stress. *Neurochemical research*. 2006;v. 31, n.9, p. 1141-1151.

Vetulani J. Early maternal separation: a rodent model of depression and a prevailing human condition. *Pharmacol Rep*. 2013;65(6):1451-1461. doi:10.1016/s1734-1140(13)71505-6

Vismari L, Alves GJ, Palermo 3rd. Depressão, antidepressivos e sistema imune: um novo olhar sobre um velho problema. *Rev Psiq Clín*. 2008;35(5):196-204

Wilhem K, Parker G. Sex differences in the lifetime depression rates: fact or artifact? *Psychol Med* 1994; 24(1): 97-111.

Vandeleur CL, Fassassi S, Castelão E, et al. Prevalence and correlates of DSM-5 major depressive and related disorders in the community. *Psychiatry Res*. 2017;250:50–58. doi:10.1016/j.psychres.2017.01.060

Wagner AE, Walton JA, Hellyer PW, Gaynor JS, Mama KR. Use of low doses of ketamine administered by constant rate infusion as an adjunct for postoperative analgesia in dogs. *J Am Vet Med Assoc*. 2002; 221:72-75.

Wenzel A, Steer RA, Beck AT. Are there any differences in frequency of self reported somatic symptoms of depression? *J Affect Disord* 2005; 89(1-3):177-81.

Wilczyńska K, Simonienko K, Konarzewska B, Szajda SD, Waszkiewicz N. Morphological changes of the brain in mood disorders. *Psychiatr Pol*. 2018 Oct 27;52(5):797-805. English, Polish. doi: 10.12740/PP/89553. Epub 2018 Oct 27. PMID: 30584814.

Woelfer M, Kasties V, Kahlfuss S, Walter M. The Role of Depressive Subtypes within the Neuroinflammation Hypothesis of Major Depressive Disorder. *Neuroscience*. 2019 Apr 1;403:93-110. doi: 10.1016/j.neuroscience.2018.03.034. Epub 2018 Mar 29. PMID: 29604382.

Wolvekamp MC, Marquet RL. Interleukin-6: historical background, genetics and biological significance. *Immunol Lett.* 1990; 24, 1–9.

Wong PS, Randall MD, Roberts RE. Sex differences in the role of NADPH oxidases in endothelium-dependent vasorelaxation in porcine isolated coronary arteries. *Vascul Pharmacol.* 2015;72:83–92.

World Health Organization. Depression; 2020. Available from: <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/depression>. Acesso: 28 de julho de 2020

Yi-Chih Ting E, Yang AC, Shih-Jen T. Role of Interleukin-6 in Depressive Disorder. *Int J Mol Sci.* 2020 Mar; 21(6): 2194.

Yang C, Hong T, Shen J, Ding J, Dai XW, Zhou ZQ, Yang JJ. Ketamine exerts antidepressant effects and reduces il-1beta and il-6 levels in rat prefrontal cortex and hippocampus. *Exp. Med.* 2013; 5, 1093–1096.

Zarate JR. A randomized trial of an N-methyl-D-aspartate antagonist in treatment-resistant major depression. *Archives of General Psychiatry.* 2006;v. 63, n. 8, p. 856-864. doi: 10.1001/archpsyc.63.8.856

Zoppi C, Antunes-Neto J, Catanho FO, Goulart LF, Motta e Moura N, Macedo DV. Alterações em biomarcadores de estresse oxidativo, defesa antioxidante e lesão muscular em jogadores de futebol durante uma temporada competitiva. *Rev Paul Educ Fis.* 2003;17(2):119-30

## ANEXO I



Universidade do Extremo Sul Catarinense  
Comissão de Ética no Uso de Animais



## CERTIFICADO

Certificamos que o projeto abaixo especificado, 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 foi **aprovado** pela Comissão de Ética no Uso de Animais - CEUA da Universidade do Extremo Sul Catarinense - UNESC, em reunião de **28/04/2020**.

<b>Título do projeto</b>	Investigação de alterações comportamentais e neuroquímicas mediadas pela via mTOR em ratos submetidos ao modelo animal de privação materna e tratados com cetamina
<b>Project title</b>	Investigation of mTOR-mediated behavioral and neurochemical changes in rats submitted to the maternal deprivation animal model and treated with ketamine
<b>Número do protocolo Protocol number</b>	132-2019
<b>Pesquisador principal Principal Investigator</b>	Gislaine Zilli Réus
<b>Pesquisadores Researchers</b>	Deise Cristina Veron, Anelise Scussel Carlessi Airam Barbosa de Moura, Ritele Hernandez Silva, Laura de Araujo Borba, Maria Eduarda Mendes Botelho, Clara Vitória Bencke, Natália Maciel Andrade, Camille Mezzari Generoso, Nicolý Serafim Martinello.

<b>Finalidade</b>	( ) Ensino ( X ) Pesquisa Científica
<b>Vigência da autorização</b>	30/04/2020 a 01/12/2020
<b>Espécie/linhagem/raça</b>	Rato heterogênico/Wistar
<b>Idade/Peso</b>	1-65 dias / 50 – 350g
<b>Número de animais</b>	51 (3 machos para acasalamento) + 60 (12 ratas grávidas)
<b>Total</b>	111
<b>Procedência</b>	Biotério UNESC

The Ethics Committee on Animal Use on Research, sanctioned by the resolution number 03/2017/Câmara Propex, in accordance with federal law number 11.794/08, has analyzed the Project that was Approved in its ethical and methodological aspects. Any alteration of the original version of this project must be previously submitted to the Committee for further analyzes. May you have further questions, please contact us by e-mail [ceua@unesc.net](mailto:ceua@unesc.net).

  
Samira da Silva Valvassori  
Coordenadora do CEUA

Criciúma-SC, 28 de abril de 2020.

## Dados Internacionais de Catalogação na Publicação

V547e Veron, Deise Cristina.

Efeitos comportamentais e neuroquímicos do tratamento com cetamina em ratos machos e fêmeas submetidos ao modelo animal de privação materna / Deise Cristina Veron. - 2020.

67 p. : il.

Dissertação (Mestrado) - Universidade do Extremo Sul Catarinense, Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde, Criciúma, 2020.

Orientação: Gislaine Zilli Réus.

Coorientação: João Luciano de Quevedo.

1. Transtorno depressivo maior. 2. Cetamina. 3. Privação dos pais. 4. Estresse oxidativo. 5. Neuroinflamação. 6. Interleucina-6. I. Título.

CDD 23. ed. 616.89

Bibliotecária Elisângela Just Steiner - CRB 14/1576  
Biblioteca Central Prof. Eurico Back - UNESC



UNIVERSIDADE DO EXTREMO SUL CATARINENSE – UNESC  
PRÓ-REITORIA ACADÊMICA - PROACAD  
DIRETORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO  
Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde (Mestrado e Doutorado)  
Recomendado pela CAPES – Homologado pelo CNE – Portaria Nº 609 de 14.03.2019

---

**ATA DE MESTRADO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE – Nº 373**

Com início às 14h (quatorze horas) do dia onze de dezembro de 2020 (dois mil e vinte), realizou-se, via ferramenta digital *Google Meet*, o seminário formal de apresentação dos resultados da dissertação de Mestrado de DEISE CRISTINA VERON, sob a orientação da Profa. Dra. Gislaire Zilli Réus e coorientada pelo Prof. Dr. João Luciano de Quevedo intitulada “EFEITOS COMPORTAMENTAIS E NEUROQUÍMICOS DO TRATAMENTO COM CETAMINA EM RATOS MACHOS E FÊMEAS SUBMETIDOS AO MODELO ANIMAL DE PRIVAÇÃO MATERNA”. A dissertação foi examinada por uma banca examinadora constituída pelos seguintes membros: Prof. Dr. Ricardo Andrez Machado de Ávila (Universidade do Extremo Sul Catarinense - UNESC) – Conceito final: Aprovada, Prof. Dr. Paulo Cesar Lock Silveira (Universidade do Extremo Sul Catarinense - UNESC) – Conceito final: Aprovada e Profa. Dra. Zuleide Maria Inácio (Universidade Federal da Fronteira do Sul - UFFS) – Conceito final: Aprovada. Com o resultado final: APROVADA, a aluna finalizou seus estudos em nível de Mestrado, fazendo jus ao grau de MESTRE EM CIÊNCIAS DA SAÚDE. Os trabalhos foram concluídos às 15h (quinze horas), dos quais eu, Fernanda Nunes Peruchi, Assistente Administrativo do Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde da Universidade do Extremo Sul Catarinense – UNESC lavrei a presente ata, que assino juntamente com o Prof. Dr. Felipe Dal Pizzol, Coordenador do Programa. Criciúma, 11 (onze) de dezembro de 2020 (dois mil e vinte).

**Prof. Dr. Felipe Dal Pizzol**  
Coordenador do PPGCS

**Fernanda Nunes Peruchi**  
Assistente Administrativo

