

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL**  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM NEUROCIÊNCIAS  
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BÁSICAS DA SAÚDE

**AVALIAÇÃO DO EFEITO TIPO ANTIDEPRESSIVO DE N-ACETILCISTEÍNA NO  
MODELO DE ESTRESSE CRÔNICO IMPREVISÍVEL EM CAMUNDONGOS**

CÍCERO RAFAEL LEÃO GARCIA

PORTO ALEGRE, 2013.

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL**  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM NEUROCIÊNCIAS  
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BÁSICAS DA SAÚDE

**AVALIAÇÃO DO EFEITO TIPO ANTIDEPRESSIVO DE N-ACETILCISTEÍNA NO  
MODELO DE ESTRESSE CRÔNICO IMPREVISÍVEL EM CAMUNDONGOS**

Dissertação apresentada por Cícero Rafael  
Leão Garcia para obtenção do GRAU DE  
MESTRE em Neurociências

Orientadora: Profa. Dra. Elaine Elisabetsky

PORTO ALEGRE, 2013.

## AGRADECIMENTOS

Aos meus pais pelo apoio e companheirismo

À professora Elaine Elisabetsky, que mostrou imensa paciência, carinho e me ensinou muitas lições preciosas não só academicamente, mas também para toda a vida.

À Viviane pela ajuda e convivência durante o mestrado e me mostrou que eu também quero me casar

À Ana Paula por toda a força e camaradagem, principalmente nos momentos difíceis.

À Luciane pelas boas conversas e pela comida deliciosa.

À Luísa pela ajuda, boa convivência e ótimas conversas sobre música.

Ao Ricardo por todo o bom bate papo e pelo chamas que me ajudou a escrever

Aos alunos Guilherme, Marcus e Radharani, pela ajuda com os experimentos e pela ótima convivência e muitos bate-papos.

À minha namorada Emanuele, que me aguentou nos momentos difíceis, ouvindo todas as minhas reclamações e me faz uma pessoa feliz a cada dia que passa.

À todas as pessoas que de alguma forma contribuíram para esse trabalho.

À CAPES pelo apoio financeiro.

**SUMÁRIO**

	Página
<b>Lista de Abreviaturas</b>	<b>iv</b>
<b>Apresentação</b>	<b>vi</b>
<b>Resumo</b>	<b>vii</b>
<b>Abstract</b>	<b>viii</b>
<b>1. Introdução</b>	<b>1</b>
Depressão: definição e relevância	1
Fatores etiológicos da depressão	3
Bases neuroquímicas da depressão	6
Fármacos antidepressivos	9
N-acetilcisteína	11
<b>2. Objetivos</b>	<b>14</b>
Objetivo Geral	14
Objetivos Específicos	14
<b>3. Artigo Científico</b>	<b>15</b>
Effects of n-acetylcysteine in the mouse unpredictable chronic mild stress	16
<b>4. Discussão</b>	<b>35</b>
<b>5. Conclusão e Perspectivas</b>	<b>41</b>
<b>6. Referências</b>	<b>42</b>

**LISTA DE ABREVIATURAS**

ACTH	hormônio adeno-corticotrófico
AD	antidepressivos
AMPA	ácido $\alpha$ -amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazole propiônico
AMPC	monofosfato de adenosina cíclico
ANOVA	análise da variância
ANOVA-RM	análise da variância de medidas repetidas
CRH	hormônio liberador de corticotrofina
DALYS	Disability Adjusted Life Years
DM	depressão maior
DSM-IV-TR	Manual Diagnóstico e Estatístico de Transtornos Mentais 4ª edição, texto revisado
FST	Forced Swim Test (teste de nado forçado)
GABA	ácido gama amino butírico
GFAP	proteína glial fibrilar ácida
GSH	glutathiona
HPA	hipotálamo-pituitária-adrenal
MAO	monoamina oxidase
mGLURs	receptores metabotrópicos glutamatérgicos
NAC	N-acetilcisteína
NBQX	2,3-dihidróxi-6-nitro-7-sulfamoil-benzo[f]quinoxalino-2,3-dione,
NMDA	N-metil-D-aspartato
OMS	Organização Mundial da Saúde

PVN	núcleo paraventricular
S.E.M.	erro padrão da média
SNC	sistema nervoso central
SNK	Student Newman-Keuls
TST	Tail Suspension Test (teste de suspensão pela cauda)
UCMS	Unpredictable Chronic Mild Stress (estresse crônico moderado imprevisível)

## APRESENTAÇÃO

De acordo com o regulamento do Programa de Pós-graduação em Neurociências da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, esta dissertação de mestrado está estruturada na forma de coletânea de artigos científicos contendo os seguintes itens: o item **1. Introdução** oferece as bases teóricas para o desenvolvimento da dissertação; o item **2. Objetivos** define a hipótese do trabalho; o item **3. Artigo Científico** contém a metodologia empregada no trabalho juntamente com os resultados obtidos, discussão parcial e lista de referências bibliográficas; o item **4. Discussão** apresenta interpretações mais abrangentes sobre o que foi apresentado no artigo científico; o item **5. Conclusão e Perspectivas** apresenta as conclusões do trabalho bem como propostas futuras; o item **6. Referências** apresenta a bibliografia referente somente às citações empregadas na introdução e na discussão do trabalho.

## RESUMO

A depressão maior (DM) é a doença psiquiátrica mais diagnosticada em adultos, com caráter crônico e incapacitante. A Organização Mundial da Saúde estima que 17% da população mundial seja acometida pela doença. Entre os muitos fatores relevantes na etiologia da depressão, incluindo genéticos, inflamatórios, imunológicos, comportamentais e ambientais, o estresse vem sendo considerado como um dos principais para o surgimento e desenvolvimento da depressão. Por décadas a teoria monaminérgica da DM foi usada para explicar os substratos neuroquímicos da doença, servindo de base para o mecanismo de ação dos fármacos antidepressivos (AD). Há lacunas importantes na teoria, que se refletem também nos problemas com os ADs: longo tempo para melhora clínica, baixa adesão devido aos efeitos adversos e, sobretudo, resultados insatisfatórios de respostas clínicas consistentes. A descoberta de que a cetamina possui ação antidepressiva rápida e expressiva, chamou a atenção para a participação do sistema glutamatérgico nesta doença. Tornou-se de interesse a avaliação de drogas que modulam o sistema glutamatérgico e são destituídas dos efeitos adversos dos antagonistas glutamatérgicos semelhantes a cetamina. Uma destas é a N-acetilcisteína (NAC), com provas clínicas indicando sua utilidade como droga adjunta na fase depressiva do transtorno bipolar. Evidências pré-clínicas também mostram ação tipo-antidepressivas de NAC. O objetivo desse estudo foi agregar dados relevantes à elucidação do valor do NAC para DM, através do modelo de estresse crônico imprevisível (UCMS), um modelo com validades de face, construto e predição. Foram avaliados: estado do pelo, corticosterona plasmática, glicemia e imunorreatividade da proteína glial fibrilar ácida (GFAP) hipocampal. O UCMS levou a degradação da pelagem dos animais, a aumento nos níveis de corticosterona e diminuição dos níveis de glicemia; não houve alteração em GFAP. NAC e imipramina minimizaram a degradação da pelagem induzida pelo UCMS, mas nenhuma das drogas alterou corticosterona ou glicemia. O efeito de NAC sobre a degradação do pelo induzida pelo UCMS é um dado relevante, já que este é um parâmetro consistente do UCMS. Inconsistências nos outros parâmetros usualmente considerados neste modelo, e a ausência de medida específica de correlato animal de anedonia, impedem uma conclusão mais clara da avaliação de NAC no UCMS. O estudo aponta para as lacunas que devem ser sanadas, tais como doses e tempo de administração, para subsidiar provas clínicas que elucidem o valor de NAC para o tratamento da DM.



## ABSTRACT

Major depression (MD) is the psychiatric condition most frequently diagnosed in grownups, characterized by chronic and incapacitating traits. The World Health Organization estimates that 17% of the world population will suffer from MD. Among the many factors relevant to MD etiology, including genetic, inflammatory, immunologic, behavioral and environmental, stress have been considered as one of the major ones for the emergence and development of MD. For decades, the so called monoaminergic theory of MD was used to explain the neurochemical substrates for the disease, serving as basis for the mechanism of action of antidepressive drugs (AD). There are important gaps in this theory, which are reflected in the AD downsides: long latency for clinical benefits, poor adhesion due to adverse effects and, above all, unsatisfactory clinical outcomes. The discovery that ketamine possesses rapid and marked antidepressive properties called attention to the participation of the glutamate system in MD. It became of interest to evaluate drugs that modulate glutamate but devoid of the adverse effects common to glutamate antagonist such as ketamine. One of this is N-acetylcysteine (NAC), with clinical proofs of usefulness as add on medication for the depressive phase of bipolar disease. Pre-clinical evidence also indicate NAC antidepressive-like properties. The purpose of this study was to add relevant data to the elucidation of the value of NAC for treating MD, through its evaluation at the unpredictable chronic mild stress (UCMS) model in mice, one with accepted face, construct and predictability validities. The fur state, serum corticosterone, glycaemia, and the immunoreactivity of the hippocampal glial fibrillar acid protein (GFAP) were assessed. The UCMS induced fur degradation, increase in glucose levels and diminished corticosterone; no GFAP changes were observed. NAC and imipramine minimized the UCMS-induced fur degradation, but none of the treatments altered corticosterone or glycaemia. The effects of NAC on the degradation of the fur induced by UCMS is a relevant result, since this parameter is consistent with this model. Nevertheless, the inconsistencies of the other parameters usually taken into account with this experimental model and the lack of specific measure of a proper animal correlate of anhedonia, preclude a clear conclusion on the effects of NAC in the UCMS. This study points to knowledge gaps that need to be resolved, such as dose and duration of treatment, in order to subsidize clinical proofs that can decide on the value of NAC for treating MD.

## 1. INTRODUÇÃO

### **Depressão: definição e relevância**

A depressão maior (MD) é um transtorno psiquiátrico grave que apresenta um caráter crônico debilitante sendo, atualmente, a doença psiquiátrica mais comumente diagnosticada em adultos. De acordo com a organização mundial da saúde (OMS), são cerca de 121 milhões de pessoas diagnosticadas com depressão ao redor do mundo, o que representa aproximadamente 17% da população mundial (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2008).

O estudo Global Burden Disease Study tem como objetivo sistematizar as informações de casos não fatais na avaliação do status de saúde de uma população; para isso, usa medidas com base no tempo de anos de vida saudáveis perdidos devido à mortalidade prematura ou anos vividos com alguma incapacidade (com pesos variáveis segundo a gravidade da incapacitação). De acordo com o Global Burden Disease Study em sua versão atualizada em 2004 (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2008), a depressão maior ocupa a terceira posição no ranking das doenças incapacitantes. O estudo usa a unidade de comparação “DALYS”, da sigla de Disability Adjusted Life Years, sendo que a depressão maior contribui com 4,3% dos DALYS globais, atrás apenas de infecções respiratórias (6,2%) e doenças diarreicas (4,8%). A estimativa é que em 2030, a depressão maior venha a ocupar a primeira posição, com estimados 6,2% dos DALYS. Considerando que no ano 2000 a depressão já foi a quarta doença em termos de gastos em todo mundo (MEYER *et al.*, 2004) – com um gasto estimado em 83,1 bilhões de dólares apenas nos Estados Unidos da América – a estimativa do Global Burden Disease Study parece ser bastante plausível, o que reforça a necessidade de maior atenção dos órgãos de saúde pública para a doença em questão.

De acordo com o Manual Diagnóstico e Estatístico de Transtornos Mentais da Associação Psiquiátrica Americana, 4ª edição, texto revisado (DSM-IV-TR) (AMERICAN PSYCHIATRIC ASSOCIATION, 2000), a depressão é caracterizada por uma série de sintomas clínicos (vide Quadro 1). Para confirmação do diagnóstico é necessária a presença de no mínimo cinco dos sintomas listados – sendo pelo menos um dos sintomas humor deprimido ou anedonia – com duração mínima de duas semanas.

### Quadro 1 – Sintomas clínicos da Depressão Maior

1. Humor deprimido na maior parte do dia
2. Acentuada diminuição do interesse ou prazer em todas ou quase todas as atividades (anedonia)
3. Perda ou ganho significativo de peso
4. Insônia ou hipersonia
5. Agitação ou retardo psicomotor
6. Fadiga ou perda de energia
7. Sentimentos de inutilidade ou culpa excessiva ou inadequada
8. Capacidade diminuída de pensar ou concentrar-se, ou indecisão
9. Pensamentos de morte recorrentes

Fonte: DSM-IV-TR (AMERICAN PSYCHIATRIC ASSOCIATION, 2000)

As principais mudanças e respectivas definições encontradas no curso clínico da depressão podem ser vistas no quadro 2. A recuperação é o objetivo terapêutico almejado. No entanto, os riscos de recaída para um novo quadro depressivo são altos e, infelizmente, cada recaída aumenta a dificuldade no tratamento da doença.

### Quadro 2 – Etapas clínicas vistas na depressão e suas definições

Termos Chaves	Definição
Episódio	Definido como tendo um certo número de sintomas por um certo período de tempo, totalmente sintomático (e.g. critério DSM-IV-TR).
Remissão	Remissão parcial, onde o indivíduo não é mais totalmente sintomático, mas apresenta apenas sintomas mínimos. Remissão total é um breve período (2 – 8 semanas) onde o indivíduo é assintomático, com não mais do que sintomas mínimos.
Resposta	Remissão total ou parcial devido à intervenção via tratamento.
Recuperação	Definido como remissão total, livre de sintomas por um certo período (>8 semanas). Designa uma recuperação de um episódio.
Recaída	Um retorno antecipado de sintomas após uma resposta positiva, preenchendo os critérios da síndrome completa, que ocorre durante o período de remissão.
Retorno	Refere-se a um novo episódio, o que só pode ocorrer durante uma recuperação.

Fonte: Richards, Derek 2011 – Prevalence and clinical course of depression: A review

## Fatores etiológicos da depressão

Diferentemente de outras doenças crônicas e potencialmente fatais – como, por exemplo, a diabetes tipo II – a depressão continua sendo considerada uma doença multifatorial, para a qual ainda não se conhecem claramente as causas etiológicas. Muitos são os fatores já considerados e estudados que poderiam estar envolvidos na etiologia da depressão, incluindo fatores genéticos, inflamatórios, imunológicos, comportamentais e ambientais (PALAZIDOU, 2012). Dentre os diversos fatores etiológicos, o estresse vem sendo considerado como um dos principais componentes para o surgimento e desenvolvimento da depressão (KRISHNAN E NESTLER, 2008) e dada a sua relevância para este trabalho será aqui mais elaborado que os outros.

Todos os organismos vivos buscam um equilíbrio dinâmico, ao qual chamamos de homeostase (DE KLOET *et al.*, 2005). Podemos definir estresse como sendo qualquer tipo de estímulo externo que pode causar alterações nesse equilíbrio. É sabido que os organismos apresentam uma série de mecanismos que tem por objetivo manter a homeostase e, dessa forma, permitir a adaptação do organismo a diferentes situações e, em última análise, a sobrevivência. Dá-se a esses mecanismos o nome de alostase, termo cunhado a partir do grego e que literalmente significa “atingir o equilíbrio através da mudança” (MCEWEN, 2007). Pode-se dizer que o termo alostase está bem empregado no contexto fisiológico uma vez que, para manter a homeostase, são necessárias mudanças em diversos sistemas corporais, seja mobilizando reservas energéticas, alterando rotas fisiológicas ou modificando comportamentos. Os mecanismos alostáticos inevitavelmente acabam por causar algum desgaste ao organismo, devido aos esforços necessários para a execução e manutenção dos mesmos. Denomina-se carga alostática o conjunto dos efeitos, ou desgaste, provocados pelos mecanismos alostáticos. Em resumo, existe um processo fisiológico em que o organismo, ao perceber algum estímulo externo como sendo um agente estressor, mobiliza mecanismos alostáticos que reestabelecem a homeostase, mas que ao mesmo tempo determinam um aumento da carga alostática durante este processo. Esse processo fisiológico age de maneira coordenada, de forma que a homeostase seja atingida rapidamente e com a menor carga alostática possível (MCEWEN, 2007).

Existem, contudo, situações em que os mecanismos alostáticos não agem da forma como deveriam, ocasionando um aumento excessivo no desgaste corporal. Respostas alostáticas fora do padrão ideal podem ocorrer de diversas maneiras: há casos em que o organismo responde exacerbadamente ao estímulo estressor, assim como há casos em que o

organismo responde de forma insuficiente ao estímulo estressor; em alguns casos o estímulo estressor é tão forte que pode desestabilizar completamente os mecanismos alostáticos; e há também situações em que esses mecanismos não terminam como esperado, agindo de forma prolongada e causando um desgaste cada vez maior ao organismo (MCEWEN, 2007).

Podem-se dividir os principais mecanismos fisiológicos de resposta ao estresse em dois tipos de acordo com a velocidade de resposta: uma resposta rápida e de curta duração, mediada principalmente pelo sistema vegetativo, e uma resposta mais lenta e prolongada, mediada principalmente pelo eixo hipotálamo-pituitária-adrenal (eixo HPA). O cérebro é o principal mediador desses dois tipos de resposta, uma vez que é o responsável pela percepção do estímulo externo e sua classificação como sendo ou não um estímulo estressor. Ao perceber o estímulo estressor, o cérebro passa a desencadear tanto os mecanismos de resposta rápida como os mecanismos de resposta lenta. A resposta rápida se dá através da ativação do sistema neurovegetativo simpático, com liberação de catecolaminas, principalmente noradrenalina. Tal liberação leva ao conhecido “estado de fuga ou luta”, incluindo vasoconstrição periférica, aumento da frequência cardíaca e do fluxo sanguíneo para cérebro e músculo esquelético (permitindo dessa forma, que o sangue circule mais rapidamente levando mais oxigênio e nutrientes aos locais mais necessários no contexto), sudorese, diminuição da motilidade gastrointestinal, entre outras respostas que visam à adaptação e sobrevivência do organismo. A resposta lenta é mediada principalmente pela ativação do eixo HPA: a percepção do estresse leva à liberação do hormônio liberador de corticotrofina (CRH) pelas células do núcleo paraventricular (PVN) do hipotálamo que irão interagir com receptores localizados na hipófise anterior. A ação do CRH estimula a produção e liberação do hormônio adeno-corticotrófico (ACTH), que liberado na circulação sanguínea estimula a liberação de hormônios glicocorticoides pelo córtex da glândula adrenal. A ativação do eixo HPA leva, portanto, à liberação de cortisol em humanos, sendo a corticosterona o equivalente em roedores. Os hormônios do eixo HPA fazem retro-alimentação negativa sendo que o aumento de ACTH, CRH e cortisol levam a uma diminuição da liberação dos mesmos no hipotálamo, hipófise e glândula adrenal (KYROU & TSIGOS, 2009).

Quando o estresse é muito exacerbado ou demasiadamente prolongado, há uma hiperativação do eixo HPA, o que pode resultar em sérias alterações fisiológicas danosas ao organismo. A hiperativação pode levar a um quadro de excesso de liberação de cortisol, também conhecido como hipercortisolemia, que acarreta sérios problemas, como por exemplo, alterações no metabolismo de carboidratos e hipertrofia da glândula suprarrenal, além de alterações no sistema nervoso central. Dentre as principais áreas encefálicas afetadas pela

hipercortisolemia está o hipocampo, uma estrutura límbica que possui alta densidade de receptores glicocorticoides e por isso apresenta maior sensibilidade aos efeitos do excesso de cortisol. A estimulação excessiva dos receptores glicocorticoides e mineralocorticoides no hipocampo leva à diminuição do volume total do hipocampo, uma vez que o excesso de cortisol acarreta perda neuronal; modificações morfológicas nesta região também podem ser observadas como, por exemplo, a diminuição dos espinhos dendríticos de neurônios hipocampais (para uma revisão completa sobre o assunto, ver SAPOLSKY, 2000).

Hoje já se reconhece que a hiperativação sustentada do eixo HPA está intimamente relacionada com a fisiopatologia da depressão. Já foi relatado que pacientes com depressão apresentaram níveis aumentados de CRH no líquido cefalorraquidiano (FLORIO *et al.*, 2007; NEMEROFF *et al.*, 1984), bem como um aumento no número de células secretoras de CRH no hipotálamo (BAO *et al.*, 2008; RAADSCHEER *et al.*, 1994). Além disso, há dados na literatura mostrando que pacientes deprimidos apresentam alterações na secreção de cortisol (CARROLL *et al.*, 2007) bem como hiperplasia da glândula supra renal (KESSING *et al.*, 2011). Estudos mais recentes de ressonância magnética relatam que o volume encefálico encontra-se diminuído quando comparado com o encéfalo de controles saudáveis (CAMPBELL *et al.*, 2004), corroborando achados *post mortem* que mostraram que essa redução ocorre principalmente nas áreas do córtex pré-frontal (PITTENGER E DUMANN, 2008), giro do cíngulo, hipocampo (LEE *et al.*, 2002) e amígdala (BARDEN, 2004).

Além da perda neuronal, a hipercortisolemia também pode causar alterações em células da glia, o que pode contribuir para a redução do volume encefálico vista em pacientes com depressão maior (SAPOLSKY, 2000). Dentre as células da glia, acredita-se que as alterações ocorridas em astrócitos possam ser um fator etiológico na depressão maior já que astrócitos apresentam um importante papel ao regular o microambiente do sistema nervoso central: regulação no metabolismo de glicose, captação de neurotransmissores (particularmente glutamato), desenvolvimento e maturação das sinapses e manutenção da barreira hematoencefálica são atividades em que a participação dos astrócitos é crucial. Um dos principais marcadores utilizados para avaliar a função astrocitária é a proteína fibrilar glial ácida (GFAP), uma proteína presente no citoesqueleto dos astrócitos importante em diversos processos como, por exemplo, comunicação celular. Há estudos mostrando que estresse crônico leva a alterações na densidade e número de GFAP em áreas relevantes, tais como córtex pré-frontal e hipocampo (BANASR *et al.*, 2008, 2010; CZECH *et al.*, 2006).

Outra questão importante está no fato de o estresse ser um forte desencadeador de relapso em pacientes em remissão: altos níveis de cortisol são fatores que predispõem

possíveis recaídas para um novo episódio depressivo (MORRIS *et al.*, 2012). Além disso, de maneira interessante, mesmo eventos estressores de menor intensidade são capazes de fazer com que pacientes em remissão possam evoluir para um novo quadro depressivo. Acredita-se que o estresse e a depressão estejam relacionados de tal forma que com o desenvolvimento do quadro depressivo ocorra uma progressiva vulnerabilidade ao estresse; assim, gradativamente eventos estressantes de menor relevância sejam suficientes para induzir recaída em pacientes em remissão (MONROE & HARKNESS *et al.*, 2005). O fato é relevante já que se estipula que cada episódio depressivo aumenta gradativamente o risco de recaídas futuras: 60% dos indivíduos que já experimentaram um episódio depressivo recaem para um segundo episódio; 70% dos que já tiveram dois episódios recaem para um terceiro; e cerca de 90% dos indivíduos que já obtiveram três ou mais episódios acabam por apresentar recaídas futuras (AMERICAN PSYCHIATRIC ASSOCIATION, 2000; SOLOMON *et al.* 2000). Considerando que a recaída é um dos principais problemas envolvendo a depressão, os dados fortalecem ainda mais a participação do estresse na etiologia da depressão.

### **Bases neuroquímicas da depressão**

Durante a chamada “década de ouro da farmacologia”, entre os anos 1950 e 1960, começaram a surgir as primeiras teorias envolvendo os possíveis mecanismos e neurotransmissores envolvidos na patologia da depressão (LÓPEZ-MUNOZ & ÁLAMO, 2009). Durante esse período foi visto que a administração de iproniazida, inicialmente sintetizada para tratamento de tuberculose, e de imipramina, que inicialmente especulava-se pudesse possuir propriedades antipsicóticas, induziam melhora no quadro clínico de pacientes diagnosticados com depressão maior. A iproniazida age por inibir a enzima monoamina oxidase (MAO), enzima responsável por degradar aminas biogênicas, incluindo a serotonina e a noradrenalina. Já a imipramina atua principalmente por inibir a recaptação de noradrenalina e serotonina e, dessa forma, aumentar a disponibilidade desses neurotransmissores na fenda sináptica. Aliando-se a esses dados as observações de que a reserpina, um antipsicótico e anti-hipertensivo que age por depletar as vesículas catecolaminérgicas de neurônios pós-ganglionares, possui ação pró-depressiva foi cunhada a teoria monoaminérgica da depressão (LÓPEZ-MUNOZ & ÁLAMO, 2009).

A teoria monoaminérgica estipula que a depressão é causada por um desequilíbrio nos sistemas serotoninérgicos e noradrenérgicos, de tal forma que exista uma diminuição na disponibilidade de serotonina e noradrenalina no espaço sináptico. A insuficiência destes

transmissores, e conseqüentemente da ativação de receptores pós-sinápticos, seria responsável pelos sintomas observados da depressão. Assim, a diminuição da transmissão noradrenérgica para o córtex pré-frontal seria responsável pelas alterações na concentração e na dificuldade de pensamentos, uma vez que a atividade noradrenérgica nessa área é responsável por modular a atenção; a diminuição da transmissão noradrenérgica para áreas límbicas, como o hipocampo e a amígdala, seria responsável pelos sintomas emocionais e pelas alterações como fadiga e perda de energia. Da mesma forma, a diminuição na atividade das projeções serotoninérgicas resultaria em: a diminuição no córtex frontal seria responsável pelas alterações no humor enquanto que a diminuição em áreas límbicas seria responsável pelos sintomas de ansiedade, inutilidade e culpa; além disso, neurônios serotoninérgicos no tronco encefálico também modulam os centros do sono, o que explica os sintomas de insônia ou hipersonia presentes na depressão. Durante muito tempo a teoria monoaminérgica se mostrou como a melhor explicação possível para as bases neuroquímicas da depressão: os neurônios dos sistemas serotoninérgicos e noradrenérgicos se originam em núcleos do tronco encefálico (lócus cerúleos e núcleos da rafe, respectivamente) e projetam para áreas encefálicas que se apresentam alteradas em pacientes com depressão, mais precisamente o córtex pré-frontal, a amígdala e o hipocampo (KRISHNAN E NESTLER, 2008). No entanto, com o passar dos anos, foram sendo observadas situações que não podem ser adequadamente explicadas levando-se em conta apenas a hipótese monoaminérgica. Um exemplo disso é o fato de que, apesar de a ação fisiológica dos antidepressivos ocorrer dentro de horas após a primeira administração, são necessárias de três a quatro semanas para o início do efeito terapêutico, com a presença de melhora no quadro sintomático da doença. Como resultado, recentemente vêm surgindo teorias que se focam em outros possíveis substratos neuroquímicos que estariam subjacentes à depressão e, dentre estas, a teoria glutamatérgica tem recebido a maior atenção nas últimas décadas. Estudos recentes demonstram o possível envolvimento do glutamato com a depressão. Mitani e colaboradores (2006), ao analisar os níveis de diversos aminoácidos presentes no plasma de 23 pacientes com depressão maior, relataram que os níveis de glutamato se encontravam aumentados em comparação ao plasma de 31 controles saudáveis. De forma ainda mais interessante, foi vista uma correlação positiva entre os níveis aumentados de glutamato e a severidade dos sintomas da doença. O mesmo padrão envolvendo níveis de glutamato e severidade de sintomas foi visto em um estudo recente analisando o líquido cefalorraquidiano de 18 pacientes com depressão maior (GARAKANI *et al.*, 2012). Outros estudos têm fornecido evidências de que o tratamento com agentes



antidepressivos pode diminuir os níveis plasmáticos de glutamina em indivíduos com depressão (KÜÇÜKIBRAHIMOĞLU *et al.*, 2009; MAES *et al.*, 1998).

O glutamato é o principal neurotransmissor excitatório no encéfalo, envolvido nos processos de migração neuronal, diferenciação, formação de axônios, neuroplasticidade, sobrevivência e morte celular (SANACORA *et al.*, 2012). No sistema nervoso central a síntese de glutamina a partir de glutamato e amônia ocorre exclusivamente nas células da glia. A glutamina possui importante papel como precursor dos aminoácidos glutamato e ácido gama amino butírico (GABA) em neurônios excitatórios e inibitórios, respectivamente. Em neurônios excitatórios, a enzima glutaminase transforma glutamina em glutamato. O glutamato é então liberado pré-sinápticamente e pode ligar-se a receptores ionotrópicos pós-sinápticos como cainato, ácido  $\alpha$ -amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazole propiônico (AMPA) e N-metil-D-aspartato (NMDA). O glutamato também pode interagir com receptores metabotrópicos (mGLURs) pré e pós-sinápticos, que são importantes na modulação de vias de sinalização glutamatérgicas. Os mGLURs são subdivididos em três grupos funcionais distintos baseados em suas homologias e cascatas de transdução de sinal: mGLURs do tipo 1 tem sua ação através da ativação da fosfolipase C e da produção de diacilglicerol; mGLURs do tipo 2 e do tipo 3 estão ligados à proteínas G inibitórias, e atuam por inibir a ação da adenilato ciclase e diminuir a concentração de monofosfato de adenosina cíclico (AMPc). A ativação de mGLURs pós-sinápticos é responsável por modular a atividade de canais iônicos, podendo ter tanto ação facilitatória quanto inibitória. A ativação de mGLURs pré-sinápticos é capaz de diminuir a neurotransmissão glutamatérgica excitatória bem como a neurotransmissão inibitória mediada por GABA (NICIU *et al.*, 2012).

O glutamato liberado é então recaptado pelas células da glia, através de transportadores presentes nas membranas dos astrócitos. O excesso de glutamato pode levar à diminuição de neurogênese hipocampal, diminuição de espinhos dendríticos e morte neuronal por excitotoxicidade, o que leva à diminuição das conexões principalmente no hipocampo, amígdala e córtex pré-frontal, as mesmas áreas comprometidas pela ação do estresse e envolvidas com a depressão. Em realidade, já é sabido que a estimulação excessiva de receptores glicocorticóides e mineralocorticóides causada pela hipercortisolemia acarreta em aumento na liberação de glutamato em diversas áreas, sendo que o córtex pré-frontal parece ser a área em que os efeitos do estresse induzem ao maior aumento da liberação de glutamato (MUSAZZI *et al.*, 2010).

Considerando que a neurotransmissão glutamatérgica é estreitamente regulada no encéfalo, apresentando distribuição ampla e generalizada, quaisquer mudanças nos níveis de

glutamato podem levar a alterações não só em áreas envolvidas com estresse e depressão como também em conexões envolvendo outros neurotransmissores. Neurônios glutamatérgicos que se projetam para lócus cerúleos e núcleos da rafe têm conexões com neurônios serotoninérgicos e noradrenérgicos, o que explicaria como a teoria glutamatérgica se relaciona com a teoria monoaminérgica (DRAGO *et al.*, 2010).

Estudos recentes demonstram que a utilização de antagonistas de receptores glutamatérgicos do tipo NMDA, como a cetamina, possui ação antidepressiva em pacientes com depressão maior (BERMAN *et al.*, 2000), bem como efeito tipo-antidepressivo em estudos pré-clínicos (MAENG *et al.*, 2008; YILMAZ *et al.*, 2002). A ação antidepressiva da cetamina em doses sub-anestésicas se dá rapidamente, cerca de 2 a 3 horas após a administração, sendo que uma única dose foi capaz de manter por cerca de uma semana a melhora no quadro clínico dos pacientes analisados (BERMAN *et al.*, 2000; MACHADO-VIEIRA *et al.*, 2009; ZARATE *et al.*, 2006). Além disso, foi demonstrado que os efeitos antidepressivos produzidos pela cetamina ocorrem até mesmo em pacientes refratários às terapias convencionais utilizadas na clínica (OSTROFF *et al.*, 2005; ZARATE *et al.*, 2006). Em modelos pré-clínicos foi visto que a ação antidepressiva de antagonistas de receptores NMDA é também mediada por receptores do tipo AMPA, sendo que a utilização concomitante de antagonistas desses receptores é capaz de inibir a ação da cetamina e dizolcipina (MAENG *et al.*, 2008). Outro estudo também demonstrou que a administração de agonistas de receptores AMPA é capaz de exercer efeito tipo-antidepressivo nos testes de nado forçado e suspensão pela cauda (LI *et al.*, 2001). Baseada nestas e em outras evidências, a teoria glutamatérgica propõem que a depressão seria resultado primariamente de um desequilíbrio no sistema glutamatérgico em que, por um lado, existiria uma hiperestimulação de receptores do tipo NMDA e, por outro, uma hipofunção em receptores do tipo AMPA.

Apesar dos achados com cetamina, um dos problemas da utilização de antagonistas de receptores NMDA como possíveis medicamentos antidepressivos é a sua já conhecida ação psicotomimética. Em altas doses, antagonistas de receptores NMDA, como a cetamina, dizolcipina e fenciclidina, são capazes de induzir sintomas psicóticos já bem documentados. A sua utilização em doses sub-anestésicas apresenta riscos para os pacientes, uma vez que nem todos podem se beneficiar imediatamente de uma única administração e possíveis correções de doses podem vir a ser necessárias. Torna-se necessária, portanto, a busca de novas drogas que possam modular o sistema glutamatérgico com ações terapêuticas na depressão com melhor perfil de tolerabilidade e toxicidade.

## **Fármacos antidepressivos**

A farmacoterapia atualmente utilizada no tratamento de estados depressivos envolve a utilização de fármacos heterogêneos que podem ser agrupados de acordo com seus mecanismos de ação, tal como se segue (STAHL, 2002):

Inibidores da monoamina oxidase: primeiros antidepressivos a serem descobertos, atuam por inibir a ação da MAO. Antidepressivos mais antigos dessa classe, como iproniazida, tranilcipromina e isocarboxazida, atuam de forma não seletiva – inibindo ambos os subtipos A e B da enzima – e irreversível, inativando a enzima de forma permanente. Novos medicamentos dessa classe possuem ações mais seletivas e reversíveis como, por exemplo, a maclobemida, que possui ação sobre a MAO A.

Antidepressivos tricíclicos: assim denominados devido à presença de três anéis em sua estrutura química; atuam por inibir as bombas de recaptação de serotonina, noradrenalina e, em menor extensão, dopamina de forma não seletiva. Alguns tricíclicos, como a clomipramina, possuem maior potência para bloquear a recaptação de serotonina, enquanto outros, como a desipramina e a nortriptilina, apresentam ação mais seletiva para noradrenalina. Imipramina, maprotilina e protriptilina são outros exemplos de membros dessa classe.

Inibidores seletivos da recaptação de serotonina: possuem propriedades inibidoras mais potentes e seletivas de recaptação de serotonina em comparação aos antidepressivos tricíclicos, o que os tornou mais utilizados na prática clínica. Fluoxetina, sertralina, paroxetina, fluvoxamina, citalopram e escitalopram são membros dessa classe.

Inibidores seletivos da recaptação de noradrenalina: atuam por inibir de forma mais potente e seletiva as bombas de recaptação de noradrenalina. A reboxetina é o principal membro dessa classe.

Inibidores da recaptação de serotonina e noradrenalina: possuem dupla ação, inibindo a recaptação de serotonina e noradrenalina de forma mais seletiva do que os antidepressivos tricíclicos. Venlafaxina e desvenlafaxina são antidepressivos pertencentes a essa classe.

Inibidores da recaptação de noradrenalina e dopamina: inibem mais seletivamente a recaptação de noradrenalina e dopamina. A bupropiona é o antidepressivo mais conhecido pertencente a essa classe.

Antidepressivos atípicos: constituem um grupo heterogêneo de fármacos que não possuem um mecanismo de ação comum ou conhecido. Como exemplos de membros dessa classe temos a mirtazapina (que possui atividade através de antagonismo em receptores alfa 2 noradrenérgicos e também bloqueio de receptores serotoninérgicos) e a nefazodona (que

possui antagonismo em receptores serotoninérgicos e também inibe a recaptação de serotonina).

Reações adversas causadas pelo uso de medicamentos antidepressivos são comumente observadas (E SILVA, 2005). Antidepressivos tricíclicos apresentam ações anticolinérgicas e anti-histamínicas, que são responsáveis pelos seus efeitos adversos no sistema nervoso autônomo, tais como ressecamento da boca, desconforto epigástrico, sonolência, ganho de peso e tonturas. Inibidores da recaptação de serotonina apresentam menor prevalência de efeitos adversos, mas não total ausência dos mesmos, sendo que a disfunção sexual associada a estes medicamentos é um dos principais motivos para o abandono da terapia pelos pacientes (MONTEJO-GONZÁLEZ *et al.*, 1997).

Como descrito acima, pode-se ver que a grande maioria dos medicamentos antidepressivos utilizados na clínica possui mecanismos de ação baseados na hipótese monoaminérgica apresentando, contudo, eficácia terapêutica de valor discutível. Apesar da introdução de cerca de 20 fármacos antidepressivos no mercado desde a introdução da imipramina na década de 50, estima-se que entre 30 a 50% dos pacientes não respondem bem ao tratamento com antidepressivos (KEITNER *et al.*, 2006). O maior estudo aberto que examinou a efetividade do tratamento farmacológico de depressão maior até hoje (STAR\*D) concluiu que menos de 1/3 dos pacientes obteve remissão dos sintomas com uma tentativa de antidepressivo padrão em 14 semanas de tratamento. Apenas depois de duas tentativas com dois antidepressivos e quase 24 semanas de tratamento é que metade dos pacientes com depressão maior teve remissão dos sintomas, neste estudo (SANACORA *et al.*, 2008). Considerando-se os dados epidemiológicos descritos acima, a expectativa do aumento da prevalência da depressão, e os custos pessoais e sociais implicados, o desenvolvimento de antidepressivos com maior efetividade é de suma importância.

### **N-acetilcisteína**

A n-acetilcisteína (NAC) é um conhecido agente mucolítico (cuja efetividade como tal foi questionada por estudos recentes (DECRAMER *et al.*, 2005) utilizado também em casos de intoxicação por paracetamol (acetaminofeno). Ultimamente NAC tem recebido considerável atenção no mundo acadêmico devido as recém-observadas atividades psicofarmacológicas. Estudos recentes têm demonstrado a utilidade de NAC em diversos tipos de transtornos psiquiátricos (DEAN *et al.*, 2011). Por exemplo, o uso de NAC resultou na melhora de sintomas em pacientes em abstinência para o uso de cocaína (LAROWE *et al.*,

2006), bem como da melhora de sintomas em paciente com esquizofrenia (BERK *et al.*, 2008), transtorno obsessivo compulsivo (LAFLEUR *et al.*, 2006) e tricotilomania (GRANT *et al.*, 2009). Relevante para este estudo NAC apresenta efeitos antidepressivos em pacientes com depressão bipolar, com melhora dos sintomas durante a fase depressiva da doença (BERK *et al.*, 2011, 2012; MAGALHÃES *et al.*, 2012). Apesar de ainda não haver estudos clínicos com NAC envolvendo pacientes com depressão maior, dados pré-clínicos (ARENT *et al.*, 2012; FERREIRA *et al.*, 2008; LINCK *et al.*, 2012; SMAGA *et al.*, 2012;) sugerem que a atividade antidepressiva de NAC possa também ser verificada no tratamento da depressão maior.

O mecanismo de ação mais conhecido de NAC é a sua contribuição para as rotas antioxidantes. NAC é um dímero de cistina que, no meio fisiológico, aumenta a disponibilidade de cisteína que é por sua vez um precursor da glutathiona (GSH), uma das principais enzimas antioxidantes do organismo. Reconhece-se hoje a relevância do estresse oxidativo em várias doenças do SNC, incluindo a depressão. Tem sido relatado que estados de estresse oxidativo e inflamação acompanham estados de depressão (KRISHNADAS & CAVANAGH, 2012), e o caráter antioxidante de NAC certamente seria relevante para sua ação enquanto antidepressivo. Em realidade ARENT e colaboradores (2012) e SMAGA e colaboradores (2012) reportaram que a atividades tipo-antidepressiva de NAC em um modelo de estresse crônico e nado forçado, respectivamente, foram acompanhados pela diminuição de parâmetros oxidativos. No entanto, NAC também possui outros mecanismos de ação que podem estar relacionados com seus inesperados efeitos psicofarmacológicos. Além de suas ações antioxidantes, já foi relatada ação anti-inflamatória de NAC – com diminuição nos níveis de interleucinas de pacientes em hemodiálise (NASCIMENTO *et al.*, 2010) –, bem como sua atuação na modulação da liberação de glutamato (BAKER *et al.*, 2003), mecanismo particularmente relevante no contexto desta dissertação.

Um dos mecanismos de ação de NAC que determina sua modulação do sistema glutamatérgico é sua atuação no trocador cistina/glutamato. Presente na membrana dos astrócitos, o trocador cistina/glutamato é uma proteína que, através de transporte ativo, tem como função liberar glutamato do meio intracelular para o meio extracelular enquanto capta cistina do meio extracelular. NAC aumenta a quantidade de cistina disponível, o que modula a atividade do trocador levando conseqüentemente a um aumento na liberação de glutamato para o espaço extracelular (BAKER *et al.*, 2003). Acredita-se que a grande maioria desses trocadores (antiporter) estaria presente principalmente em astrócitos, e que o aumento de glutamato nessas áreas levaria a um aumento na atividade de receptores glutamatérgicos metabotrópicos, mais precisamente os receptores mGlu2/3. O receptores mGlu2/3 são auto

receptores responsáveis principalmente por modular um sistema de retroalimentação negativa quanto a liberação de glutamato, e portanto um aumento da ativação desses receptores (pelo aumento de glutamato resultante da atividade aumentada do antiporter) leva a uma diminuição da liberação de glutamato no espaço sináptico. Essa modulação glutamatérgica seria benéfica em todos os tipos de psicopatologia em que se encontre um componente de hiperatividade glutamatérgica, especialmente de ativação de receptores NMDA (BAKER *et al.*, 2003).

De acordo com a teoria glutamatérgica da depressão, essa diminuição da liberação de glutamato seria uma das possíveis causas do efeito antidepressivo de NAC. LINCK e colaboradores (2012) demonstraram que a utilização de NAC no modelo pré-clínico de suspensão pela cauda foi capaz de reduzir o tempo de imobilidade dos animais, da mesma forma com o que já havia sido visto na literatura em um modelo de nado forçado (FERREIRA *et al.*, 2008). De forma ainda mais interessante, o pré-tratamento dos animais com NBQX, um antagonista de receptores AMPA, foi capaz de abolir por completo a ação antidepressiva de NAC, enquanto que o pré-tratamento com NMDA foi capaz de reverter o efeito antidepressivo de NAC apenas parcialmente. Tal resultado indica que a ação antidepressiva de NAC também envolva a ativação de receptores glutamatérgicos do tipo AMPA. De acordo com a literatura, moduladores positivos de receptores AMPA não são responsáveis por ativar esses receptores, mas são capazes de diminuir a dessensibilização destes na presença de um agonista (HASHIMOTO, 2010). Além disso, como dito anteriormente, receptores AMPA também participam nas ações antidepressivas de cetamina em modelos pré-clínicos.

Considerando o conjunto de dados clínicos e pré-clínicos envolvendo NAC em condições psiquiátricas, bem como o corpo de evidências que reforça a teoria glutamatérgica da depressão e a necessidade de se desenvolver novos fármacos antidepressivos, o objetivo deste estudo é a analisar se NAC possui ação antidepressiva no modelo de estresse crônico moderado imprevisível (UCMS). Este objetivo está relacionado com a hipótese de que a modulação do sistema glutamatérgico pela N-acetilcistina tem implicações clinicamente relevantes para o manejo da depressão maior. Especificamente será verificado se NAC é capaz de reverter as alterações induzidas pelo modelo, tais como degradação do estado do pelo, alterações em níveis de corticosterona, glicemia e na imunorreatividade da proteína GFAP, que são correlatos animais de alterações vistas na depressão em humanos.

## **2. OBJETIVOS**

### **Objetivo Geral**

Contribuir para a avaliação de N-acetilcisteína (NAC) como fármaco antidepressivo, avaliando a ação deste no modelo de estresse crônico moderado imprevisível (UCMS) em camundongos.

### **Objetivos Específicos**

- a) Avaliar os efeitos de NAC (10 e 25 mg/kg) na degradação do estado do pelo em camundongos BALB/c submetidos ao UCMS;
- b) Avaliar os efeitos de NAC em níveis plasmáticos de glicose e corticosterona em camundongos BALB/c submetidos ao UCMS;
- c) Avaliar os efeitos de NAC na expressão de GFAP em hipocampo de camundongos BALB/c submetidos ao UCMS.

### 3. ARTIGO CIENTÍFICO

Garcia, CRL; Noetzold, N; Dalmaz, C; Achaval, M; Xavier, LL; Elisabetsky, E. **Effects of n-acetylcysteine in the mouse unpredictable chronic mild stress** (a ser submetido para a revista Pharmacology, Biochemistry and Behavior).

Instruções para autores em: <http://www.elsevier.com/journals/pharmacology-biochemistry-and-behavior/0091-3057/guide-for-authors#25000>

Observação: sabemos que as instruções para submissão do artigo especificam que este não deve estar justificado, formato adotado aqui; da mesma forma, as legendas acompanham as figuras para facilitar a leitura.



EFFECTS OF N-ACETYLCYSTEINE IN THE MOUSE UNPREDICTABLE CHRONIC  
MILD STRESS

Cícero R. L. Garcia<sup>a,b</sup>, Guilherme Noetzold<sup>a</sup>, Carla Dalmaz<sup>b,c</sup>, Matilde Achaval<sup>b,d</sup>, Léder L. Xavier<sup>e</sup> and Elaine Elisabetsky<sup>a,b</sup>

<sup>a</sup>Depto. de Farmacologia, <sup>b</sup>Programa de Pós-Graduação em Neurociências, <sup>c</sup>Depto de Bioquímica, <sup>d</sup>Laboratório de Histofisiologia Comparada do Depto de Morfologia, Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brazil

<sup>e</sup>Laboratório de Biologia Celular e Tecidual, Faculdade de Biociências, Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brazil

**Corresponding author:**

Cícero Leão Garcia  
Av. Sarmiento Leite 500/202, Porto Alegre, RS, Brazil  
nerookami@gmail.com

## Abstract

**Background:** Major depression (MD) is a highly prevalent and disabling psychiatric disorder. Recent reports on the usefulness of N-acetylcysteine (NAC) as an add on drug in the treatment of depression phases in bipolar disorder, as well as preclinical data pointing to antidepressant-like properties of NAC, raised the possibility that NAC could also be useful to treat MD. Nevertheless, evaluations of the effects of NAC in experimental models that better correlate with major depressive disorder are scarce. The aim of this study is to evaluate the effects of NAC in the unpredictable chronic mild stress (UCMS) model in mice, a model with recognized face, predictive and construct validities. *Materials and methods:* BALB/c mice were subjected to a 6 week UCMS protocol. The effects of NAC (10 and 25 mg/kg) and imipramine (20 mg/kg) on coat state, corticosterone and glucose levels, and hippocampal glial fibrillary acidic protein (GFAP) immunoreactivity were evaluated. ANOVA-RM/ SNK or one way ANOVA/ SNK were used as appropriate. *Results:* The UCMS protocol induced progressive and significant degradation of the coat state over the 6 weeks; NAC and imipramine partially prevented the UCMS-induced coat state degradation. Significantly higher corticosterone and decreased glycaemia levels were found in stressed mice, without significant differences regardless of treatments. The UCMS protocol did not induce significant changes in hippocampal GFAP. *Conclusions:* This study indicates that NAC presents antidepressant-like effects in the mice UCMS model, in regard to preventing the stress-induced coat degradation. Though UCMS-induced coat degradation is considered as one of the most consistent and significant consequences of the UCMS, the lack of clear effects of NAC in other UCMS parameters usually considered in a comprehensive analysis of potential antidepressant properties of new drugs do not allow for a conclusive evaluation of NAC in this model. This study nevertheless points to the validity of further studies to subsidize clinical trials of NAC for MD treatment.

## Keywords

Antidepressants; N-acetylcysteine; mice unpredictable chronic mild stress; major depression

## 1. Introduction

Major depression (MD) is the most commonly diagnosed psychiatric disorder in adults, with a global prevalence of 4.7% (Ferrari et al., 2012). The World Health Organization estimates that MD will be the leading worldwide cause of disability by 2030. According to the Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders in its fourth revised edition, (DSM-IV-TR), MD is characterized by a series of symptoms such as depressed mood, anhedonia, gain or loss in weight, sleep disturbances, fatigue, difficulties in focusing and suicide ideation (with or without suicide attempts) (American Psychiatric Association, 2000).

For over 50 years the monoaminergic hypothesis of depression has been the most accepted explanation regarding the neurobiology subjacent to MD (López-Muñoz and Alamo, 2009). The monoaminergic hypothesis stipulates that an unbalanced monoaminergic neurotransmission system, more precisely diminished synaptic levels of noradrenaline and serotonin, are responsible for the clinical symptoms of MD. Accordingly, the aim of the psychopharmacology therapy in clinical use follows this reasoning, with the utilization of drugs that target the monoaminergic system, such as tricyclic, monoamine oxidase inhibitors and selective serotonin reuptake inhibitors antidepressants, with the final goal of restoring adequate synaptic levels of the relevant neurotransmitters. Unfortunately, one of the principal flaws of this approach is the fact that although the neurochemical effects of antidepressants – by increasing the availability of neurotransmitters to postsynaptic receptors in the brain – occurs almost immediately, three to four weeks are nevertheless necessary to attain a clinically relevant improvement in symptoms. Even more disappointing is the estimates showing that 30-50% of the patients fail to adhere to the first choice of treatment (Keitner et al., 2006), and that even after two treatment attempts and twenty four weeks 50% still failed to achieve remission, as shown by the STAR\*D, the largest open label study on antidepressant efficacy (Sanacora et al., 2008). More recently, accumulating evidence points to the key involvement of the glutamatergic system in the physiopathology of MD (Hashimoto, 2009; 2011). Reports of depressed patients presenting higher blood and liquor glutamate levels in comparison to healthy controls, changes in the glutamine and glutamate ratio, positive correlations between high levels of glutamate and severity of MD symptoms, as well as alterations in N-metil-D-aspartate (NMDA) and  $\alpha$ -amino acid-3-hydroxi-5-methyl-4-isoxazol propionic acid (AMPA) glutamate receptors, provided enough substrate towards a glutamate hypothesis of depression (McCarthy et al., 2012; Sanacora et al., 2012). The observations that ketamine, a dissociative anesthetic that acts as NMDA receptor antagonist, ameliorated the symptoms of MD one hour after a single sub-anesthetic dosage with effects

sustained for over one week (Machado-Vieira et al., 2009; Zarate et al., 2006) spurred the concept of modulating the glutamate system as a potentially useful approach for treating MD. Unfortunately however, there are several concerns associated with drugs that antagonize NMDA receptors, in particular the well-known induction of psychotomimetic symptoms. Hence the importance of searching compounds that modulate the glutamatergic system with an acceptable range of undesirable effects.

N-acetylcysteine (NAC) has been in the market as a mucolytic drug, also used to counteract acetaminophen intoxication. It is a precursor of cysteine with well-established antioxidant properties, including at the central nervous system (Dodd et al., 2008). NAC also modulates the glutamatergic system by acting through the astrocytic antiporter cystine/glutamate (Baker et al., 2003; 2008), ultimately leading to a reduction in glutamate release and consequently diminished NMDA receptor activation. NAC potential usefulness in the treatment of diverse psychiatric disorders (Dean et al., 2011) such as cocaine withdrawal, schizophrenia, and compulsive obsessive disorder has drawn considerable attention. More recently, it has been reported that NAC ameliorated the depressive symptoms of bipolar patients during the depressive phase of the syndrome (Berk et al., 2012; Magalhães et al., 2012). Preclinical evidence showed antidepressant-like properties of NAC in rat forced swimming test (FST) (Ferreira et al., 2008) and olfactory bulbectomy (Smaga et al., 2012) models. In a recent study, Linck et al (2012) showed that NAC also presents antidepressant-like effects in the mice tail suspension (TST) model, in which the effects of NAC were partially prevented by NMDA receptors agonist (NMDA) while totally abolished by AMPA receptor antagonist (NBQX). The study points to the central involvement of glutamatergic pathways in the antidepressant-like actions of NAC.

Despite these relevant evidences, preclinical studies with NAC in animal models that relate better to the pathophysiology of MD are still scarce. To fill this gap, the purpose of this study is to evaluate the antidepressant-like properties of NAC in the mice unpredictable chronic mild stress (UCMS) model. Though, as usual with animal models, the UCMS presents limitations and even inconsistencies (for review see Hill et al, 20120) it is the rodent model with better accepted face, construct and predictive validities (Mineur et al., 2006; Willner, 2005)

## **2. Materials and Methods**

*2.1 Animals:* Experiments were performed with two months old male BALB/c mice, obtained from Fundação Estadual de Produção e Pesquisa em Saúde (FEPPS). Animals were housed as

4-5 mice/home cage, and maintained under inverted 12 h-light/dark cycle (lights on at 20:00 h and off at 08:00 h), under controlled environmental conditions ( $22\pm 1$  °C, with free access to food [Nuvilab CR1] and water) for 2 weeks before experiments; this is referred to as the non-stress period. All procedures were carried out in accordance with institutional policies on the handling of experimental animals (ethics committee approval # 19981), which in general follow the NIH guidelines (NIH Guide for Care and Use of Laboratory Animals, NIH publication no. 85–23, 1985).

*2.2 Drugs:* Imipramine HCl and N-acetylcysteine were acquired from Sigma-Aldrich Chemical Co. (St. Louis, MO, USA), and dissolved in saline (0.9% NaCl).

*2.3 Unpredictable chronic mild stress (UCMS):* The UCMS protocol was based on Piato et al. (2008). At the end of the non-stress period, mice were assigned to different experimental groups in a semi-randomized fashion so that mean body weights and coat state were comparable in all groups. From this point on mice assigned to experimental groups were maintained in individual cages; a non-stress control group remained in a different room, housed as 4-5 mice/cage, and was not submitted to stressors. For the next 6 weeks animals were subjected several times a day to one of the following stressors: damp sawdust (90-180 min), 3 sawdust changes (30-60 min), sawdust-free cage (90-180 min), sawdust-free cage with 200 ml water (90-180 min), social stress (each mouse is placed in a cage used by another mouse for 15 min), transference to a clean cage, 45° cage tilting (90-180min), reversal of the light-dark cycle for 48h, and/or several 30 min periods of light during the dark phase and of dark during the light phase. To prevent habituation and maintain the aspect of unpredictability, the timing of all stressors and stressor sequences were changed weekly.

*2.4 Experimental design and drug administration:* After two weeks of drug-free exposure to UCMS mice were assigned to different treatment groups in a semi-randomized manner, so that the coat state and body weights were also equivalent in all stressed groups at the beginning of the treatments. Treatments were performed daily, intraperitoneally (i.p.), between 13:30 and 14:30 h, in a volume of 0.1 ml/10 g body weight. Treatment groups were: saline, imipramine 20 mg/kg, and N-acetylcysteine 10 and 25 mg/kg.

*2.5 Body weight:* Before and during the UCMS, mice body weights were recorded every Monday starting at 10:00 h.

*2.6 Coat State:* Before and during the UCMS, the coat state was recorded every Monday starting at 10:00 h. Coat state assessment was carried out by 3 observers unaware of treatments, by scoring the coat state in the head, neck, dorsal, ventral and genital regions, as well as forepaws, hind paws and tail insertion. The score scale was as follows: 0 for good conditions (no color or flaws), 1 for intermediate condition (changes in color and presence of flaws), and 2 for bad conditions (marked color and flaws), assigned for each of these 7 areas. The final score for the mice coat state was obtained from the sum of the score of all body parts (maximum of 14), and used as the means of the three independent scores. Photos under standard conditions were taken for documentation, and eventually used for reassessment if and when needed.

*2.7 Serum corticosterone:* Forty eight hours after the end of UCMS, mice were moved to a silent room, habituated for at least 2h, and sacrificed by decapitation. Trunk blood samples were collected centrifuged at 4 °C and the serum stored at –20 °C. Serum corticosterone was extracted with 300 µL (3x100 µL) of ethyl acetate, diluted at a concentration of 1:400 and measured with Enzo Life Sciences Corticosterone Enzyme Immunoassay (EIA) kit (Enzo Life Sciences Int'l Inc, Plymouth Meeting, PA, USA) according to the manufacturer's instructions.

*2.8 Glycaemia:* Glucose measurements were taken 48 h after the end of the UCMS, using a commercial glucometer tape (Accu-Chek Actives® Roche), with a blood drop drawn during the trunk blood collection (as above). Measurements were taken between 14:00 and 15:00 h, after 5 hours of fasting (food and water).

### *2.9 GFAP:*

*Preparation of brain sections:* Methodology based on Xavier et al. (2005). Forty eight hours after the end of UCMS 6 mice from each treatment group were transcardially perfused (under deep anesthesia with ketamine/xylazine 100/10 mg/ml i.p.) with saline (circa 15 min until recovery of clear perfusion solution) followed by 4% paraformaldehyde (in 0.1M phosphate buffer, pH 7.4). After complete perfusion the brains were removed and post-fixed for 4 h at room temperature in plastic containers filled with the same fixative solution; for cryoprotection the fixed brains were immersed in 15% sucrose (in phosphate buffer at room temperature) for 24 h, followed by 30% sucrose for another 24 h, and stored at –70 °C until further use. Coronal sections (20 µm, five/animal) containing the hippocampus were obtained

by cryostat (Leitz, Germany), collected in phosphate-buffered saline (PBS) in 24-well plates (3 ml/plate). The hippocampus (CA1) was identified according to the atlas of Franklin and Paxinos (1996), with the following coordinates: interaural 2.34–1.10mm, and bregma –1.46 to –2.70mm.

*Immunohistochemistry:* Brain sections were treated with 3% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> for 30 min, followed by preincubation with 2% bovine serum albumin (BSA) in PBS plus 0.3% Triton X-100 for 30 min, and incubation with rabbit polyclonal anti-GFAP (1:1000 in PBS–Triton X-100) for 48 h at 4 °C. After several PBS washes, sections were incubated with a rabbit PAP-conjugated anti-rabbit IgG (1:100 in PBS) for 2 h at room temperature. The immunohistochemical reaction was revealed by incubating the sections for 10 min in 0.06% 3,3-diaminobenzidine (DAB) dissolved in PBS and in the same solution containing 1µl of 10% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> per ml of DAB medium for additional 10 min. Sections were then rinsed with PBS, dehydrated with ethanol, cleared with xylene, and covered with balsam and coverslips. Control sections were prepared by omitting the primary antibody and replacing it with PBS. The brain sections were fixed and post-fixed for the exact same periods in identical solutions, were processed in a rigorously identical manner at all steps, and incubated in identical media for the same period of time. These measures were taken to avoid overreaction, differences in chromogen reaction, saturation of optical density, and changes in background levels (Xavier et al., 2005).

The intensity of GFAP immunoreactivity in the stratum radiatum of the CA1 was measured using semi-quantitative densitometry analysis (Xavier et al., 2005). Images were captured using a Nikon Eclipse E-600 (20×; Tokyo, Japan) microscope coupled to a digital camera, and analyzed with the Image Pro Plus (Image Pro-Plus 6.1, Media Cybernetics, Silver Spring, EUA) software. All lighting conditions and magnifications were kept constant during the process of capturing the images. Two digitized images from selected areas (area of interest, AOI) were obtained from each section (five sections/ animal). The one square (3185 µm<sup>2</sup>) AOI images were converted to an 8-bit gray scale (256 gray levels); AOI positioning were kept constant for all images. Background images were generated by electing in each image a 20 µm<sup>2</sup> square in places that were clearly devoid of staining; background correction was performed according to the formula  $CI_{x,y} = [(I_{x,y} - BL) / (BL_{x,y} - BL)] \times (M - BL) + BL$  as detailed by Xavier et al. (2005).

*2.10 Statistics:* Data from coat state analysis were analyzed by repeated measures analysis of variance (ANOVA-RM) followed by Student-Newman-Keuls (SNK), using time as repeated measure and treatment as between-subjects factor. Corticosterone, glycaemia and GFAP results were analyzed by One way ANOVA followed by SNK. SPSS 16 for Windows was used. Results are expressed as mean  $\pm$  S.E.M.

### **3. Results**

No differences were found in body weight gain ( $F_{4,84} = 0.06$  ;  $p > 0.05$ ) among the different treatment groups during the UCMS period (data not shown).

Coat state Scores during the 6 weeks of UCMS are shown at Figure 1A, while Fig. 1B details the data at the end of experiment. ANOVA-RM showed that the UCMS significantly ( $F_{4,84} = 17.52$  ;  $p < 0.05$ ) altered the coat state, an effect noticeable after one week of UCMS. SNK showed a progressive degradation of the coat state as compared to the non-stress group ( $p < 0.05$ ). In comparison to control, after four weeks of treatment, imipramine (20 mg/kg) and N-acetylcysteine (10 and 25 mg/kg) were able to partially protect the UCMS-induced coat deterioration ( $p < 0.05$ ).

Corticosterone and glucose blood levels are shown in Figure 2. According to ANOVA, there were significant differences ( $F_{4,52} = 6.42$  ;  $p < 0.01$ ) in corticosterone serum levels among groups. SNK shows a significantly higher corticosterone levels in all animals groups subjected to UCMS in comparison to non-stressed mice; none of the treatments was able to reduce the UCMS-induced increase in corticosterone (Fig. 2A).

ANOVA shows significant differences ( $F_{4,54} = 13.84$  ;  $p < 0.05$ ) in glucose levels among groups. SNK shows that glucose levels were significantly lower in mice submitted to the UCMS as compared with the non-stressed group ( $p < 0.05$ ); none of the treatments changed the UCMS-induced changes in glycaemia (Fig. 2B).

No differences ( $F_{4,23} = 1.73$  ;  $p > 0.05$ ) were found in regional densitometry of GFAP immunoreactivity in hippocampal slices among the different groups (Fig. 3).

### **4. Discussion**

Data show that the UCMS protocol here used induced expected alterations such as deteriorated fur (Detanico et al., 2009; Ducottet and Belzung, 2006; Piato et al., 2008, 2010; Yalcin et al., 2008) and higher corticosterone plasmatic levels (Mao et al., 2009) in stressed mice. Four weeks treatment with imipramine and NAC minimized (but not completely



prevented) the UCMS-induced fur deterioration. Corticosterone levels, as expected were higher in stressed animals; none of the treatments prevented the UCMS-induced raise in corticosterone. Regarding glycaemia, contrary to the expected (Piato et al, 2010), stressed animals (all groups comparable, regardless of treatment) showed lower glycemic levels in comparison to the non- stressed group. No significant differences in GFAP expression were found among all groups, though there is a tendency of lower expression in the stressed (untreated) controls.

The degradation of fur state induced by the UCMS is one of the most significant changes of this model, thought to be related to a decrease in grooming and other self-care behaviors. It is not entirely clear how repeated stress leads to decreased grooming, but it is believed that there is a shift towards election of coping behavior which favors resource conservation to face the stressful situation (Ducottet and Belzung, 2004). Furthermore, studies have reported that diminished grooming following chronic stress is associated with increased immobility in the forced swim test (Griebel 2002a, 2002b; Willner 2005). Therefore, it is arguable that the analysis of rodent coat state is a reliable indicator of the consequences of repeated stress and one well correlated with outcomes from rodent models that have predictive value for antidepressants. A key finding of this study is that NAC can prevent the degradation of the coat state in BALB/c mice, suggesting of antidepressant-like properties in this model.

Stress-induced alterations in the HPA axis are well documented, with higher corticosterone secretion induced by stress. Relevant to the UCMS model and this study, HPA hyperactivity in MD patients constitutes one of the most consistent findings in psychiatry (Jurueña et al 2004). Several studies show that antidepressants are capable of attenuate and/or reverse the stress-induced corticosterone increase (Sapolsky, 2001), possibly as a result of intracellular and genomic alterations triggered by the downstream signaling pathways that take place after weeks of antidepressant intake (Barden, 2004; Duman and Voleti, 2012). Corroborating data from Song et al. (2006), we previously reported that imipramine (in the same doses used in this study) was capable of preventing UCMS induced increase in corticosterone (Detanico et al., 2009; Piato et al., 2008, 2010). It is not clear why this study fail to replicate the results regarding corticosterone and imipramine, though a potential explanation is that the increase in corticosterone in stressed groups reached such a high a level that was not susceptible to treatments. Unfortunately, the hypothesis cannot be tested because the assessment of corticosterone levels in the two previous UCMS studies from our group were accomplished by radioimmunoassay while in the current study Elisa was used. The

levels of corticosterone found for the non-stressed and stressed controls are compatible with those found in the literature when measured by Elisa (Li et al., 2007; Liu Y et al., 2011; Mao et al., 2009). Even if the hypothesis holds true, it would remain unclear why the same protocol used in the same mouse strain produced incomparable result.

Chronic stress is known to induce metabolic alterations, including increased glucose levels resulting from increased noradrenergic activity, such as glycogenolysis (McEwen, 2007). It is also known that cortisol enhances gluconeogenesis and reduce cellular glucose uptake (Surwit and Schneider, 1993); therefore increased levels of corticosterone are expected to parallel with higher glucose levels, hence the suggestions that stress is intimately related to metabolic syndrome (Tamashiro et al., 2011). In agreement, our group observed UCMS-induced increases in corticosterone and glucose (Piato et al, 2008; 2010). In this study, nonetheless, all groups of stressed animals, regardless of treatment, presented lower glycaemia in comparison to the non-stressed group. A possible explanation for the current data is that the stressed animals in this study are in a pre-diabetes (rather than full blown diabetes) state which is characterized by hypoglycemia (rather than hyperglycemia) within 4-6 hours of fasting, compatible with the fasting period of the mice in this study (Bergman, 2012). Nevertheless, it remains unclear why the non-stress/stressed patterns found in this study differ from that reported by Piato et al (2010).

It is now well documented that depression, and other mood disorders, can lead to morphological changes in limbic brain regions, including prefrontal cortex, hippocampus and amygdala (Mayberg, 2009; Savit and Drevertes, 2009). Chronic stress in rodents and nonhuman primates induces structural changes in these same brain areas (Banar et al 2008; Duman and Monteggia, 2006; Pittenger and Duman, 2008). Though the majority of data refers to neurogenesis and neuronal plasticity, a few studies report changes in glial density and morphology, in areas such as the prefrontal cortex and the hippocampus (Banar et al., 2010); it is suggested that the stress-induced altered GFAP expressions can be consequent to stress-induced dysfunctional glucocorticoid receptors at glial cells (Popoli et al., 2012). It is also known that glucocorticoids can reduce GFAP mRNA and/or GFAP expression in the hippocampus (Laping et al, 1994). Czeh et al. (2006) showed a reduction in the number and volume of GFAP immunostained cells of male tree shrews submitted to an 8 week chronic psychosocial stress paradigm. Liu Q. et al. (2011) also reported reduced hippocampus GFAP expression in rats submitted to a 5 week chronic stress, which was accompanied by progressive degradation of the coat state. Nevertheless, Lambert et al. (2000) reported an almost 30 percent increase in hippocampal GFAP expression after a six day stress protocol,

associated to concurrent inflammation; in the same line, other studies suggest that chronic maintenance of high levels of corticosterone may lead to increased GFAP (Bridges et al., 2008; Ramos-Remos et al., 2002).

It is relevant to note that glial alterations caused by chronic stress are sensitive to antidepressant treatment: for example, the above mentioned study by Czeh et al (2006) reported that fluoxetine prevented the stress-induced hippocampal decrease in GFAP expressing astrocytes. Stress-induced glial alterations in other brain areas were similarly reported to be efficiently prevented by antidepressants when chronically administered (Banasr et al., 2010, 2011; Banasr and Duman, 2008). In this study, no significant differences in hippocampal density of GFAP immunostained cells were observed among the various groups, though there is a tendency of diminished GFAP in the untreated stressed group as well as of preventive effects by both imipramine and NAC.

Acute NAC has consistently shown antidepressant-like properties in rodent models such as the tail suspension test (TST) and forced swim test (FST); the fact that these models are sensitive to acute administrations of antidepressants (Cryan et al 2005) was considered a weakness in terms of face validity of these models. However, this analysis is not applicable to what is now referred as the newest class of fast acting NMDA receptor antagonists antidepressants (Duman and Voleti, 2012). The only published study with repeated NAC administration (7 days) reports that NAC was able to reverse the diminished consumption of palatable food induced by 40 days of a chronic mild stress regime in rats (Arent et al., 2012). Since chronic stress induced decrease of sweet food consumption is an animal correlate of anhedonia, one of the core symptoms of depression, this data corroborates the idea that NAC could be useful to treat MD. Adding to this body of data, we here report evidence of antidepressant-like property of NAC (4 weeks treatment) in the classic and better characterized UCMS 6 weeks model. A major limitation of this study is the lack of assessment of an accepted behavior correlated to human anhedonia. Another potential limitation that should be considered is the yet uncharacterized response of this model to the NMDA receptor antagonists antidepressants; as much as the usually considered downsides of the models sensitive to acute antidepressants may not be applicable to these newer fast acting agents, as mentioned above, it is yet to be investigated if the UCMS paradigm is indeed appropriate to test them.

## **5. Conclusion**

This study suggests that NAC presents antidepressant-like effects in one of the most consistent and significant consequences of the UCMS, a parameter shown to be sensitive to various antidepressants. Inconsistencies in other usually parameters considered as valid UCMS outcomes, as well as the lack of direct measures of animal correlates of anhedonia prevent a more conclusive evaluation of NAC in this model. Results emphasize that additional pre-clinical data, including the UCMS and other stress related experimental models, are warranted to set the basis for the clinical assessment ultimately needed for a decisive conclusion on the benefits of NAC to treat major depression.

### **Acknowledgements**

The authors would like to thank Silvia Barbosa for technical support with immunostaining. Authors are grateful for fellowships from CAPES (C.R.L.G) and CNPq (G.N., M.A., C.D., and E.E). This study was supported by Rede Instituto Brasileiro de Neurociência IBN.Net # 01.06.0842-00 and PRONEX 10/0031-1.

### **References**

American Psychiatric Association. Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders, 4th edn, text revision. APA: Washington, DC. 2000

Arent CO, Réus GZ, Abelaira HM, Ribeiro KF, Steckert AV, Mina F, Dal-Pizzol F, Quevedo J. Synergist effects of n-acetylcysteine and deferoxamine treatment on behavioral and oxidative parameters induced by chronic mild stress in rats. *Neurochem Int.* 2012;61:1072-80.

Baker DA, McFarland K, Lake RW, Shen H, Toda S, Kalivas PW. N-acetyl cysteine-induced blockade of cocaine-induced reinstatement. *Ann N Y Acad Sci.* 2003;1003:349-51.

Baker DA, Madayag A, Kristiansen LV, Meador-Woodruff JH, Haroutunian V, Raju I. Contribution of cystine-glutamate antiporters to the psychotomimetic effects of phencyclidine. *Neuropsychopharmacology.* 2008; 33:1760-72.

Banasr M, Chowdhury GM, Terwilliger R, Newton SS, Duman RS, Behar KL, Sanacora G. Glial pathology in an animal model of depression: reversal of stress-induced cellular, metabolic and behavioral deficits by the glutamate-modulating drug riluzole. *Mol Psychiatry.* 2010;15:501-11.

Banasr M, Duman RS. Glial loss in the prefrontal cortex is sufficient to induce depressive-like behaviors. *Biol Psychiatry.* 2008; 64:863-70.

Banasr M, Dwyer JM, Duman RS. Cell atrophy and loss in depression: reversal by antidepressant treatment. *Curr Opin Cell Biol.* 2011; 23:730-7.

- Barden N. Implication of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis in the physiopathology of depression. *J Psychiatry Neurosci*. 2004; 29:185-93.
- Bergman M. Pathophysiology of prediabetes and treatment implications for the prevention of type 2 diabetes mellitus. *Endocrine*. Epub 2012 Nov 7.
- Berk M, Dean OM, Cotton SM, Gama CS, Kapczinski F, Fernandes B, Kohlmann K, Jeavons S, Hewitt K, Moss K, Allwang C, Schapkaitz I, Cobb H, Bush AI, Dodd S, Malhi GS. Maintenance N-acetyl cysteine treatment for bipolar disorder: A double-blind randomised placebo controlled trial. *BMC Med*. 2012;10:91.
- Bridges N, Slais K, Syková E. The effects of chronic corticosterone on hippocampal astrocyte numbers: a comparison of male and female Wistar rats. *Acta Neurobiol Exp (Wars)*. 2008;68:131-8.
- Cryan JF, Holmes A. The ascent of mouse: advances in modelling human depression and anxiety. *Nat Rev Drug Discov* 2005;4:775–90.
- Czéh B, Simon M, Schmelting B, Hiemke C, Fuchs E. Astroglial plasticity in the hippocampus is affected by chronic psychosocial stress and concomitant fluoxetine treatment. *Neuropsychopharmacology*. 2006;31:1616-26.
- Dean O, Giorlando F, Berk M. N-acetylcysteine in psychiatry: current therapeutic evidence and potential mechanisms of action. *J Psychiatry Neurosci*. 2011;36:78-86.
- Detanico BC, Piato AL, Freitas JJ, Lhullier FL, Hidalgo MP, Caumo W, Elisabetsky E. Antidepressant-like effects of melatonin in the mouse chronic mild stress model. *Eur J Pharmacol*. 2009; 607:121-5.
- Dodd S, Dean O, Copolov DL, et al. N-acetylcysteine for antioxidant therapy: pharmacology and clinical utility. *Expert Opin Biol Ther* 2008;8:1955-62.
- Ducottet C, Belzung C. Behaviour in the elevated plus-maze predicts coping after subchronic mild stress in mice. *Physiol Behav*. 2004; 81:417-26.
- Duman RS, Monteggia LM. A neurotrophic model for stress-related mood disorders. *Biol Psychiatry*. 2006;59:1116-27.
- Duman RS, Voleti B. Signaling pathways underlying the pathophysiology and treatment of depression: novel mechanisms for rapid-acting agents. *Trends Neurosci*. 2012;35:47-56.
- Ferrari AJ, Somerville AJ, Baxter AJ, Norman R, Patten SB, Vos T, Whiteford HA. Global variation in the prevalence and incidence of major depressive disorder: a systematic review of the epidemiological literature. *Psychol Med*. 2012;25:1-11.
- Ferreira FR, Biojone C, Joca SR, Guimarães FS. Antidepressant-like effects of N-acetyl-L-cysteine in rats. *Behav Pharmacol*. 2008;19:747-50.
- Franklin, K.B.J., Paxinos, G.T. *The Mouse Brain in Stereotaxic Coordinates*. Academic Press, San Diego. 1996

Griebel G, Simiand J, Serradeil-Le Gal C, Wagnon J, Pascal M, Scatton B, Maffrand JP, Soubrie P. Anxiolytic- and antidepressant-like effects of the non-peptide vasopressin V1b receptor antagonist, SSR149415, suggest an innovative approach for the treatment of stress-related disorders. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2002a ;99:6370-5.

Griebel G, Simiand J, Steinberg R, Jung M, Gully D, Roger P, Geslin M, Scatton B, Maffrand JP, Soubrie P. 4-(2-Chloro-4-methoxy-5-methylphenyl)-N-[(1S)-2-cyclopropyl-1-(3-fluoro-4-methylphenyl)ethyl]5-methyl-N-(2-propynyl)-1, 3-thiazol-2-amine hydrochloride (SSR125543A), a potent and selective corticotrophin-releasing factor(1) receptor antagonist. II. Characterization in rodent models of stress-related disorders. *J Pharmacol Exp Ther*. 2002b; 301: 333-45.

Hashimoto K. Emerging role of glutamate in the pathophysiology of major depressive disorder. *Brain Res Rev*. 2009;61:105-23.

Hashimoto K. The role of glutamate on the action of antidepressants. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*. 2011;35:1558-68.

Hill MN, Hellems KG, Verma P, Gorzalka BB, Weinberg J. Neurobiology of chronic mild stress: parallels to major depression. *Neurosci Biobehav Rev*. 2012; 36:2085-117.

Juruena Mario F, Cleare Anthony J, Pariante Carmine M. The Hypothalamic Pituitary Adrenal axis, Glucocorticoid receptor function and relevance to depression. *Rev. Bras. Psiquiatr*. 2004; 26: 189-201.

Keitner GI, Ryan CE, Solomon DA. Realistic expectations and a disease management model for depressed patients with persistent symptoms. *J Clin Psychiatry*. 2006;67:1412-21.

Lambert KG, Gerecke KM, Quadros PS, Doudera E, Jasnow AM, Kinsley CH. Activity-stress increases density of GFAP-immunoreactive astrocytes in the rat hippocampus. *Stress*. 2000;3:275-84.

Laping NJ, Teter B, Nichols NR, Rozovsky I, Finch CE. Glial fibrillary acidic protein: regulation by hormones, cytokines, and growth factors. *Brain Pathol*. 1994;4:259-75.

Linck VM, Costa-Campos L, Pilz LK, Garcia CR, Elisabetsky E. AMPA glutamate receptors mediate the antidepressant-like effects of N-acetylcysteine in the mouse tail suspension test. *Behav Pharmacol*. 2012;23:171-7.

Li S, Wang C, Wang M, Li W, Matsumoto K, Tang Y. Antidepressant like effects of piperine in chronic mild stress treated mice and its possible mechanisms. *Life Sci*. 2007;80:1373-81.

Liu Q, Li B, Zhu HY, Wang YQ, Yu J, Wu GC. Glia atrophy in the hippocampus of chronic unpredictable stress-induced depression model rats is reversed by electroacupuncture treatment. *J Affect Disord*. 2011;128:309-13.

Liu Y, Yang N, Hao W, Zhao Q, Ying T, Liu S, Li Q, Liang Y, Wang T, Dong Y, Ji C, Zuo P. Dynamic proteomic analysis of protein expression profiles in whole brain of BALB/c mice

subjected to unpredictable chronic mild stress: implications for depressive disorders and future therapies. *Neurochem Int.* 2011;58:904-13.

López-Muñoz F, Alamo C. Monoaminergic neurotransmission: the history of the discovery of antidepressants from 1950s until today. *Curr Pharm Des.* 2009;15:1563-86.

Machado-Vieira R, Salvadore G, Diazgranados N, Zarate CA Jr. Ketamine and the next generation of antidepressants with a rapid onset of action. *Pharmacol Ther.* 2009;123:143-50.

Magalhães PV, Dean OM, Bush AI, Copolov DL, Malhi GS, Kohlmann K, Jeavons S, Schapkaitz I, Anderson-Hunt M, Berk M. N-acetylcysteine for major depressive episodes in bipolar disorder. *Rev Bras Psiquiatr.* 2011;33:374-8.

Mao QQ, Ip SP, Ko KM, Tsai SH, Che CT. Peony glycosides produce antidepressant-like action in mice exposed to chronic unpredictable mild stress: effects on hypothalamic-pituitary-adrenal function and brain-derived neurotrophic factor. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry.* 2009; 33:1211-6.

Mayberg HS. Targeted electrode-based modulation of neural circuits for depression. *J Clin Invest.* 2009;119:717-25.

McCarthy DJ, Alexander R, Smith MA, Pathak S, Kaner S, Lee CM, Sanacora G. Glutamate-based depression GBD. *Med Hypotheses.* 2012;78:675-81.

McEwen BS. Physiology and neurobiology of stress and adaptation: central role of the brain. *Physiol Rev.* 2007;87:873-904.

Mineur YS, Belzung C, Crusio WE. Effects of unpredictable chronic mild stress on anxiety and depression-like behavior in mice. *Behav Brain Res.* 2006; 175:43-50.

Piato A.L., Detanico B.C., Jesus J.F., Lhullier F.L., Nunes D.S., Elisabetsky E. Effects of Marapuama in the chronic mild stress model: further indication of antidepressant properties. *J Ethnopharmacol.* 2008; 118:300-4.

Piato AL, Detanico BC, Linck VM, Herrmann AP, Nunes DS, Elisabetsky E. Anti-stress effects of the "tonic" *Ptychopetalum olacoides* (Marapuama) in mice. *Phytomedicine.* 2010; 17:248-53.

Pittenger C, Duman RS. Stress, depression, and neuroplasticity: a convergence of mechanisms. *Neuropsychopharmacology.* 2008;33:88-109.

Popoli M, Yan Z, McEwen BS, Sanacora G. The stressed synapse: the impact of stress and glucocorticoids on glutamate transmission. *Nat Rev Neurosci.* 2012; 13:22-37.

Ramos-Remus C, González-Castañeda RE, González-Perez O, Luquin S, García-Estrada J. Prednisone induces cognitive dysfunction, neuronal degeneration, and reactive gliosis in rats. *J Investig Med.* 2002;50:458-64.

Sanacora, G., Zarate, C., Krystal, J., Manji, H. Targeting the glutamatergic system to develop novel, improved therapeutics for mood disorders. *Nat Rev Drug Discov.* 2008; 7: 426-437.

Sanacora G, Treccani G, Popoli M. Towards a glutamate hypothesis of depression: an emerging frontier of neuropsychopharmacology for mood disorders. *Neuropharmacology*. 2012; 62:63-77.

Sapolsky RM. Depression, antidepressants, and the shrinking hippocampus. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2001;98:12320-2.

Savitz J, Drevets WC. Bipolar and major depressive disorder: neuroimaging the developmental-degenerative divide. *Neurosci Biobehav Rev*. 2009;33:699-771.

Smaga I, Pomierny B, Krzyżanowska W, Pomierny-Chamioło L, Miszkiel J, Niedzielska E, Ogórka A, Filip M. N-acetylcysteine possesses antidepressant-like activity through reduction of oxidative stress: behavioral and biochemical analyses in rats. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*. 2012; 39:280-7.

Song L, Che W, Min-Wei W, Murakami Y, Matsumoto K. Impairment of the spatial learning and memory induced by learned helplessness and chronic mild stress. *Pharmacol Biochem Behav*. 2006;83:186-93.

Surwit RS, Schneider MS. Role of stress in the etiology and treatment of diabetes mellitus. *Psychosom Med*. 1993;55:380-93.

Tamashiro KL, Sakai RR, Shively CA, Karatsoreos IN, Reagan LP. Chronic stress, metabolism, and metabolic syndrome. *Stress*. 2011; 14:468-74.

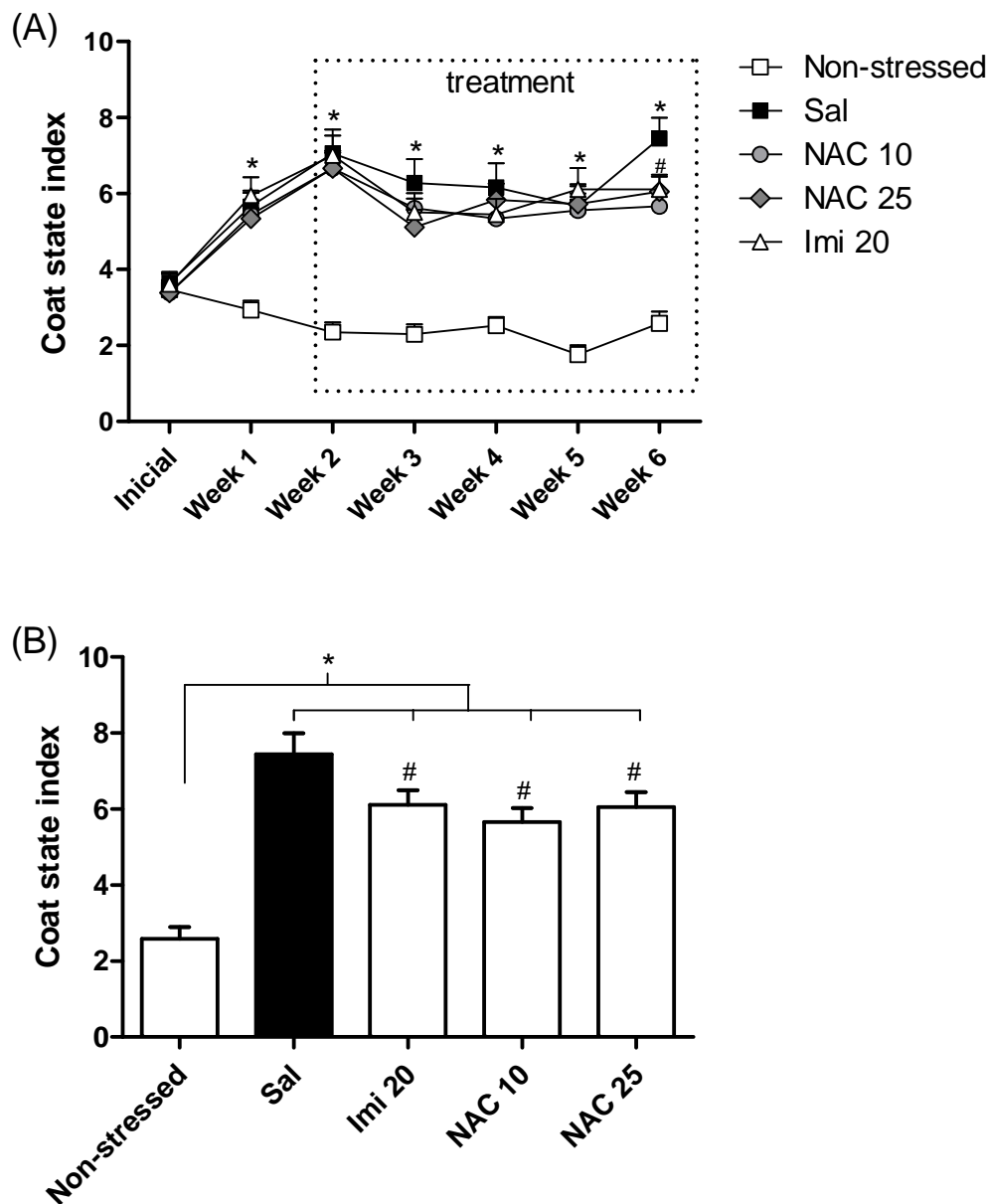
Willner P. Chronic mild stress (CMS) revisited: consistency and behavioural-neurobiological concordance in the effects of CMS. *Neuropsychobiology*. 2005;52:90-110.

Xavier, L.L., Viola, G.G., Ferraz, A.C., Da Cunha, C., Deonizio, J.M., Netto, C.A., Achaval, M. A simple and fast densitometric method for the analysis of tyrosine hydroxylase immunoreactivity in the substantia nigra pars compacta and in the ventral tegmental area. *Brain Res. Brain Res. Protoc*. 2005; 16, 58–64

Yalcin I, Belzung C, Surget A. Mouse strain differences in the unpredictable chronic mild stress: a four-antidepressant survey. *Behav Brain Res*. 2008; 193:140-3.

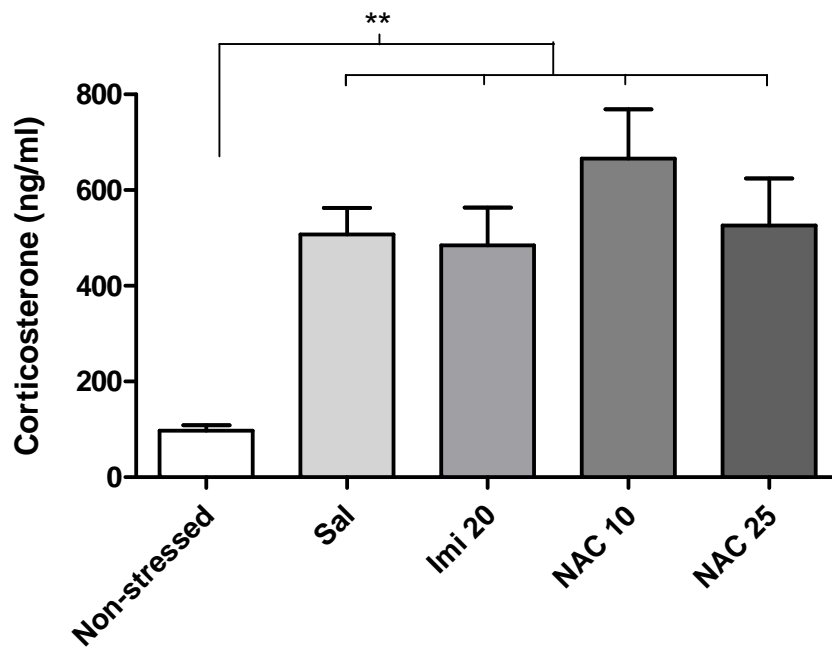
Zarate CA Jr, Singh JB, Carlson PJ, Brutsche NE, Ameli R, Luckenbaugh DA, Charney DS, Manji HK. A randomized trial of an N-methyl-D-aspartate antagonist in treatment-resistant major depression. *Arch Gen Psychiatry*. 2006;63:856-64.



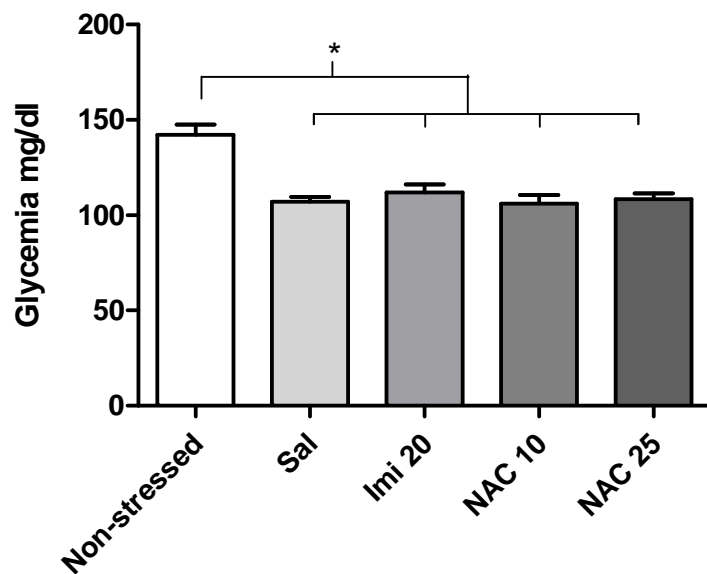


**Figure 1.** Effects of N-acetylcysteine and imipramine on mice coat state during (A) and at the end (B) of 6 weeks of UCMS. Coat scores expressed as mean  $\pm$  S.E.M.  $n=17-18$ . Saline (Sal), N-acetylcysteine (NAC, 10 and 25mg/kg) and imipramine (Imi, 20 mg/kg). \* $p<0.05$  x non-stressed; # $p<0.05$  x sal, ANOVA-RM/SNK.

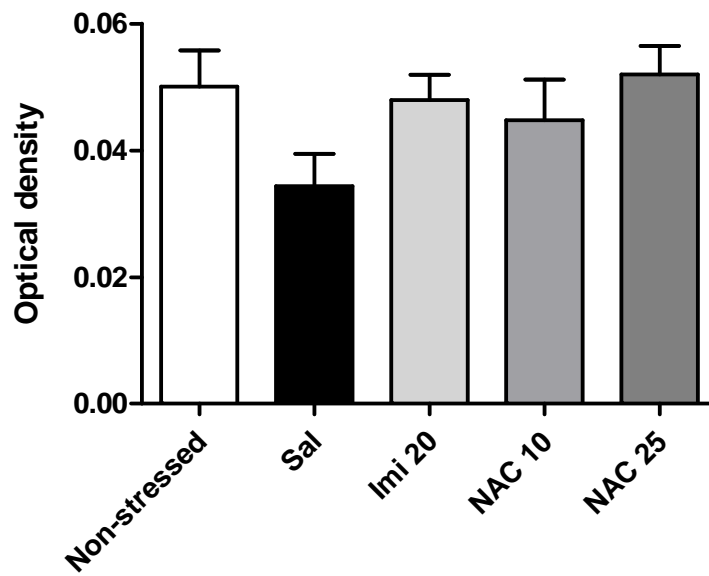
A



B



**Figure 2.** Effects of N-acetylcysteine and imipramine on corticosterone serum levels (2A) and blood glycaemia (2B) after 6 weeks of UCMS. Data expressed as mean  $\pm$  S.E.M. n=10-12. Saline (Sal), N-acetylcysteine (NAC, 10 and 25mg/kg) and imipramine (Imi, 20 mg/kg). \* $p < 0.05$  x non-stressed, ANOVA/SNK. \*\* $p < 0.01$  x non-stressed, ANOVA/SNK.



**Figure 3** . Effects of N-acetylcysteine and imipramine on GFAP immunoreactivity after 6 weeks of UCMS. Data expressed as mean  $\pm$  S.E.M. n=6-5. Saline (Sal), N-acetylcysteine (NAC, 10 and 25mg/kg) and imipramine (Imi, 20 mg/kg), ANOVA/SNK.

#### 4. DISCUSSÃO

Como contribuição específica para avaliação de NAC como potencial fármaco antidepressivo em casos de depressão maior, investigamos os efeitos do NAC no modelo de estresse crônico moderado imprevisível (UCMS), um modelo pré-clínico com estabelecida predictabilidade e validades de face e de construto (MINEUR et al., 2006; WILLNER, 2005).

Os resultados mostram que a administração de NAC e imipramina foi capaz de prevenir parcialmente a degradação no estado do pelo dos camundongos submetidos ao UCMS. Considerando que o UCMS é apenas sensível à ação de drogas antidepressivas administradas de forma crônica, a prevenção por NAC das alterações no estado do pelo induzidas pelo UCMS corroboram a ideia de que os efeitos tipo-antidepressivo de NAC também possam ser vistos quando este é administrado de forma crônica. Ao menos neste parâmetro, o efeito significativo do NAC (assim como da imipramina) não foi observado antes do final da quarta semana de tratamento.

Outra conclusão possível é que o efeito tipo antidepressivo de NAC não esteja relacionado com o eixo HPA, visto que não houve nenhuma alteração nos níveis de corticosterona em comparação a animais estressados tratados e não tratados. Esse resultado se encaixa perfeitamente no proposto mecanismo de ação antidepressiva de NAC via sistema cistina/glutamato. Embora não esteja bem elucidada a relação entre hipercortisolemia e hiperestimulação glutamatérgica, uma das teorias mais aceitas é que as alterações no sistema glutamatérgico sejam secundárias às alterações causadas pelo excesso de glicocorticoides (BARDEN, 2004; POPOLI et al., 2012). No entanto, no que cabe aos resultados obtidos nesse estudo, temos que ter certo cuidado com as conclusões uma vez que também não foi vista alteração nos níveis de corticosterona do grupo tratado com imipramina, o que já foi observado tanto na literatura quanto em trabalhos anteriores do nosso grupo. A imipramina é um antidepressivo tricíclico que embora não atue diretamente sobre o sistema HPA, tem ações indiretas sobre esse sistema documentadas na literatura: a imipramina parece aumentar os níveis de mRNA de receptores glicocorticoides por um mecanismo de ação ainda não conhecido mas aparentemente não relacionado com os níveis de monoaminas (BARDEN, 2004).

Ao fim do experimento, a glicemia do grupo não estressado foi mais alta que a dos grupos estressados; nenhum dos tratamentos, imipramina ou NAC, teve efeito significativo sobre o decréscimo na glicemia induzido pelo UCMS sobre os animais estressados. No modelo de UCMS, a manutenção de altos níveis de corticosterona podem ser acompanhados

de aumento de glicemia, via estímulo noradrenérgico (MCEWEN, 2007). Drogas capazes de prevenir o aumento de corticosterona induzido pelo estresse previnem também o aumento da glicemia (por exemplo, imipramina em PIATO et al, 2010). No caso deste estudo a falta de ação de NAC sobre os níveis de glicemia corroboram para essa linha de pensamento. No entanto, da mesma forma com o que foi visto com a corticosterona, a falta de ação de imipramina demanda certo cuidado ao analisarmos as conclusões.

Em nosso estudo, não houve efeito significativo do UCMS na densidade ótica regional de GFAP no hipocampo. Sabe-se que altas concentrações de corticosterona podem levar a alterações em células gliais. Há estudos mostrando que estresse crônico leva a redução na densidade e número de GFAP em áreas relevantes para esta discussão, tais como córtex pré-frontal e hipocampo (BANASR et al., 2008, 2010; CZECH et al., 2006). No entanto, alguns estudos sugerem que, ao contrário, a administração crônica de corticosterona é capaz de aumentar a imunoreatividade de GFAP na região do hipocampo de ratos de forma dose dependente (BRIDGES et al., 2008; RAMOS-REMOS et al., 2002). Na mesma direção, LAMBERT e colaboradores (2000) encontraram um aumento de cerca de 30% na imunoreatividade de GFAP de astrócitos hipocámpais após um estresse de seis dias. Esses resultados mostrando tanto aumento como diminuição de GFAP após estresse demonstram a complexidade dos efeitos do estresse sobre a regulação de GFAP (JAUREGUI-HUERTA et al., 2010).

O modelo de estresse crônico moderado imprevisível é um dos modelos pré-clínicos que mais se adequa ao estudo da depressão, por ser o único a apresentar boas validades de construto, face e predição. As primeiras observações realizadas por Katz e Willner em meados da década de 80 demonstraram que roedores submetidos a uma escala de diversos estressores aplicados de forma randomizada, mostraram alterações comportamentais que podiam ser correlacionadas a sintomas encontrados no quadro clínico visto em pacientes com depressão (KATZ *et al.*, 1981; WILLNER *et al.*, 1987). Os animais submetidos ao estresse prolongado apresentavam comportamentos relacionados com ansiedade e diminuição na ingestão de soluções de sacarose. Este último foi especialmente relevante já que pode ser entendido como um correlato comportamental de anedonia em roedores, uma vez que soluções adocicadas apresentam alto valor hedônico para ratos e camundongos. Katz e Willner também relataram que drogas antidepressivas eram capazes de prevenir o quadro induzido pelo estresse crônico; esse efeito dos antidepressivos só ocorre, tal como na clínica, quando as drogas são administradas de forma crônica. Este aspecto diferencia este modelo de outros tais como nado forçado e suspensão pela cauda, por não ser sensível a drogas administradas de forma aguda.

Ao longo dos anos diversos estudos foram feitos com o intuito de elucidar os mecanismos pelos quais o estresse crônico altera o comportamento de roedores, bem como as vias pelas quais se dão os efeitos dos diferentes antidepressivos neste modelo. Além das alterações iniciais descritas acima, foi visto que o estresse crônico causa deterioração gradativa no estado do pelo dos animais (DUCCOTTET E BELZUNG, 2004; MINEUR *et al.*, 2006). De maneira mais interessante, foi visto que animais submetidos ao estresse crônico apresentam alterações no eixo HPA, com o aumento de corticosterona (em roedores o glicocorticoide análogo ao cortisol em humanos), hiperestimulação da glândula supra renal e diminuição de volume encefálico (WILLNER, 2005). Além disso, foi observado que o estresse crônico induz perda neuronal e glial em áreas relacionadas com a depressão, tais como córtex pré-frontal, hipocampo e amígdala (BANASR *et al.*, 2007; DE VASCONCELLOS-BITTENCOURT *et al.*, 2011). Apesar da validade diferenciada do modelo de estresse crônico imprevisível, este apresenta inconsistências e limitações que precisam ser consideradas (ver especialmente a revisão de HILL *et al.*, 2012). Comportamentos “anômalos”, tais como o aumento na atividade locomotora bem como da preferência por solução palatável, apesar de contrários à grande maioria de resultados obtidos com o modelo, apresentam alguma consistência e parecem indicar outro possível efeito do estresse crônico, por mecanismos ainda a serem esclarecidos (WILNER, 2005). Por exemplo, MURISON & HANSEN (2001) reportaram um aumento no consumo e na preferência de sacarose, acompanhado por uma diminuição nas concentrações plasmática de corticosterona, em ratos submetidos ao modelo de estresse crônico. Esses resultados foram interpretados como comportamento pró-hedônico, o contrário do padrão de indução de “anedonia” que é normalmente reportado e esperado para estudos com modelos de estresse crônico. Além disso, a indução pelo estresse crônico de comportamentos entendidos como anedônicos pode ser correlacionada em suas bases neurobiológicas com a diminuição na resposta comportamental a drogas psicoestimulantes com ação sobre o sistema dopaminérgico, como a cocaína e a anfetamina (D’AQUILA *et al.*, 2000; PAPP *et al.*, 1993a,1993b). Consistentemente com a interpretação destes dados e seus substratos neurais, os estudos com resultados anômalos em relação à preferência por solução palatável também reportam aumento na resposta comportamental as drogas citadas, sugerindo a presença de atividade aumentada de receptores dopaminérgicos (HAILE *et al.*, 2001; LIN *et al.*, 2002). Em realidade Olsen *et al.* (2001) encontraram aumento de binding e expressão de RNA de receptors D2 dopaminérgicos na via mesolímbica. Em síntese, O UCMS parece poder tanto diminuir como aumentar (ocasionalmente) a responsividade ao reforço positivo, o que estaria correlacionado com

alterações opostas em áreas cerebrais relevantes, particularmente a área mesolímbica dopaminérgica (WILNER, 2005).

O nosso estudo foi planejado de forma a que o consumo de solução palatável fosse medido de forma indireta através do que se convencionou chamar de “splash test”. Neste teste, uma solução de sacarose (10%) é borrifada no dorso dos animais que passam a ser observados por 5 minutos quanto ao tempo ou frequência de grooming; nestas circunstâncias o grooming dos animais é mais caracterizado por levar as patas ao local onde a solução foi borrifada e dali para a boca. A literatura mostra que o UCMS diminui o grooming no splash test (o que é interpretado como diminuição de ingestão de solução de sacarose) efeito prevenido por antidepressivos (DUCCOTTET E BELZUNG, 2004; YALCIN et al., 2005, 2008). Estudos do nosso grupo replicaram este efeito do UCMS, com diminuição do comportamento de grooming no splash test; mostraram ainda que tanto a imipramina quanto a melatonina e um extrato padronizado de *Ptychopetalum olacoides* administrados ao longo de quatro semanas atenuaram a alteração do splash test induzida pelo UCMS. Neste estudo com NAC não houve diferença no splash test nem entre o grupo não estressado e os estressados, e nem entre os estressados quer tenham sido tratados com salina, imipramina ou NAC. Assim como no caso da preferência por sacarose, este resultado pode ser reflexo de uma das inconsistências do modelo abordadas anteriormente.

Em paralelo com a insatisfatória resposta clínica dos antidepressivos conhecidos e desenvolvidos nos últimos 60 anos, a descoberta das ações antidepressivas da cetamina consolidou um novo foco nos estudos da depressão e antidepressivos, centrados no sistema glutamatérgico. Um dos resultados é a crescente elucidação da possível participação do sistema glutamatérgico no mecanismo de ação de drogas antidepressivas. Por exemplo, verificou-se que a administração de fluoxetina durante quatro semanas foi capaz de aumentar a expressão de subunidades de receptores glutamatérgicos no córtex de ratos, sendo esse aumento acompanhado por um aumento na densidade de espinhos dendríticos (AMPUERO et al., 2010; HASHIMOTO, 2010). Além disso, drogas que de alguma forma possam modular a ação do sistema glutamatérgico passam a ter relevância no contexto de desenvolvimento de novos fármacos antidepressivos. É neste contexto que NAC aparece como potencial antidepressivo, entre outras propriedades psicofarmacológicas de utilidade clínica (DEAN et al., 2011).

Até o momento apenas dois estudos pré-clínicos testaram as atividades tipo antidepressivas de NAC com a utilização de administrações crônicas. SMAGA e colaboradores (2012) reportaram efeito tipo antidepressivo de NAC no teste de nado forçado

em ratos bulbectomizados: NAC (nas doses de 50 e 100 mg/kg) diminuiu o tempo de imobilidade dos animais no FST com dez dias de administração mas não quando administrado agudamente. ARENT e colaboradores (2012), utilizando um modelo de estresse crônico moderado por 40 dias, demonstraram que a administração de NAC (na dose de 20mg/kg) por sete dias após o fim do estresse foi capaz de reverter a diminuição da ingestão de solução de sacarose induzida pelo estresse. Em nosso estudo NAC foi administrado por quatro semanas, um período significativamente maior que os dois estudos citados.

Relevante para a discussão que se segue, cabe lembrar que NAC mostra ação tipo-antidepressiva consistente em modelos com administração única (FERREIRA *et al.*, 2008; LINCK *et al.*, 2012). FERREIRA e colaboradores (2008), em um dos primeiros estudos a testar a atividade tipo antidepressiva de NAC, encontraram ação de NAC no FST em ratos nas doses de 15, 50 e 100 mg/kg, com a utilização de três administrações 24, 19 e 1h antes do teste. As doses de 10 e 25 mg/kg utilizadas neste estudo são as mesmas doses que foram utilizadas em nosso laboratório no teste de suspensão pela cauda em camundongos CF1, onde se verificou atividade tipo antidepressiva nestas doses bem como na dose de 50mg/kg (LINCK *et al.*, 2012). Cabe ainda notar que o UCMS é realizado em BALB/c.

Há evidências de que a atividade de NAC, modulando o sistema glutamatérgico através do trocador cistina/glutamato, seja mais relevante em situações onde desequilíbrio glutamatérgico seja de tal forma pronunciado que os mecanismos de controle dos níveis sinápticos de glutamato (fundamentalmente transportadores do tipo EAAT1 em astrócitos) sejam insuficientes para equilibrar o sistema. É nestas condições que o efeito de diminuição da liberação de glutamato desencadeado por receptores do tipo mGlu2/3 extrasinápticos ativados pelo efeito do trocador, embora sutil em condições normais, se torne farmacologicamente relevante. Um bom exemplo é a ação de NAC em pacientes com dependência em cocaína: a administração aguda de NAC foi capaz de reduzir as concentrações de glutamato em pacientes dependentes, mas não nos controles não adictos (SCHMAAL *et al.*, 2012). Esta é uma linha de raciocínio que deve ser levada em consideração, principalmente se levarmos em conta a diferença que existe entre os efeitos do estresse agudo e do estresse crônico sobre o sistema glutamatérgico. É sabido que o estresse agudo é capaz de aumentar a atividade glutamatérgica em áreas como córtex pré-frontal e hipocampo, enquanto que os efeitos do estresse crônico ainda não são tão bem elucidados nesse aspecto, podendo haver tanto aumento quanto diminuição da atividade glutamatérgica (POPOLI *et al.*, 2012). Além disso, estudos envolvendo os efeitos do estresse crônico



moderado sobre a liberação vesicular de glutamato ainda são relativamente escassos (HILL et al., 2012).

## **5. CONCLUSÃO E PERSPECTIVAS**

Este estudo mostra indícios de atividade tipo-antidepressiva do NAC num modelo mais abrangentemente relacionado com a depressão. Agregando aos estudos clínicos em depressão de doença bipolar, aos dados positivos de estudos pré-clínicos de modelos com valor preditivo, e aos cada vez mais frequentes relatos de casos, a contribuição deste trabalho foi expandir os conhecimentos anteriores sobre o valor da N-acetilcisteína no tratamento da depressão maior. O estudo aponta para pontos que devem ser mais bem entendidos, tais como doses e tempo de administração, que possam subsidiar o desenho de provas clínicas adequadas de maneira a otimizar a avaliação do valor desta droga para o manejo, hoje insatisfatório, da depressão maior.

## 6. REFERÊNCIAS

- AMERICAN PSYCHIATRIC ASSOCIATION. Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders, 4th Ed. Text Revision. Washington, DC, **American Psychiatric Press**, 2000.
- AMPUERO, E.; RUBIO, F. J.; FALCON, R.; SANDOVAL, M.; DIAZ-VELIZ, G.; GONZALEZ, R. E.; EARLE, N.; DAGNINO-SUBIABRE, A.; ABOITIZ, F.; ORREGO, F.; WYNEKEN, U. Chronic fluoxetine treatment induces structural plasticity and selective changes in glutamate receptor subunits in the rat cerebral cortex. **Neuroscience**, v. 169, n. 1, p. 98–108, 2010.
- ARENT, C. O.; RÉUS, G. Z.; ABELAIRA, H. M.; STECKERT, A.V.; MINA, F.; DALPIZZOL, F.; QUEVEDO, J. Synergist effects of n-acetylcysteine and deferoxamine treatment on behavioral and oxidative parameters induced by chronic mild stress in rats. **Neurochemistry international**, v. 61, n. 7, p. 1072–80, 2012.
- BAKER, D. A.; MCFARLAND, K.; LAKE, R. W.; SHEN, H.; TODA, S.; KALIVAS, P. W. N-acetyl cysteine-induced blockade of cocaine-induced reinstatement. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 1003, p. 349–51, 2003.
- BANASR, M.; VALENTINE, G. W.; LI, X. Y.; GOURLEY, S. L.; TAYLOR, J. R.; DUMAN, R. S. Chronic unpredictable stress decreases cell proliferation in the cerebral cortex of the adult rat. **Biological psychiatry**, v. 62, n. 5, p. 496–504, 2007.
- BAO, A-M.; MEYNEN, G.; SWAAB, D. F. The stress system in depression and neurodegeneration: focus on the human hypothalamus. **Brain research reviews**, v. 57, n. 2, p. 531–53, 2008.
- BARDEN, N. Implication of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis in the physiopathology of depression. **Journal of psychiatry & neuroscience**: JPN, v. 29, n. 3, p. 185–93, 2004.
- BERGMAN, M. Pathophysiology of prediabetes and treatment implications for the prevention of type 2 diabetes mellitus. **Endocrine**, 2012.
- BERK, M.; COPOLOV, D.; DEAN, O.; LU, K.; JEAVONS, S.; SCHAPKAITZ, I.; ANDERSON-HUNT, M.; JUDD, F.; KATZ, F.; KATZ, P.; ORDING-JESPERSEN, S.; LITTLE, J.; CONUS, P.; CUENOD, M.; DO, K. Q.; BUSH, A. I. N-acetyl cysteine as a glutathione precursor for schizophrenia--a double-blind, randomized, placebo-controlled trial. **Biological psychiatry**, v. 64, n. 5, p. 361–8, 2008.
- BERK, M.; DEAN, O.; COTTON, S. M.; GAMA, C. S.; KAPCZINSKI, F.; FERNANDES, B. S.; KOHLMANN, K.; JEAVONS, S.; HEWITT, K.; ALLWANG, C.; COBB, H.; BUSH, A. I.; SCHAPKAITZ, I.; DODD, S.; MALHI, G. S. The efficacy of N-acetylcysteine as an adjunctive treatment in bipolar depression: an open label trial. **Journal of affective disorders**, v. 135, n. 1-3, p. 389–94, 2011.
- BERK, M.; DEAN, OLIVIA M; COTTON, S. M; GAMA, C. S.; KAPCZINSKI, F.; FERNANDES, B.; KOHLMANN, K.; JEAVONS, S.; HEWITT, K.; MOSS, K.; ALLWANG, C.; SCHAPKAITZ, I.; COBB, H.; BUSH, A. I.; DODD, S.; MALHI, G. S. Maintenance N-

acetyl cysteine treatment for bipolar disorder: A double-blind randomized placebo controlled trial. **BMC medicine**, v. 10, p. 91, 2012.

BERMAN, R. M.; CAPPIELLO, A.; ANAND, A.; OREN, D. A.; HENINGER, G. R.; CHARNEY, D. S.; KRYSTAL, J. H. Antidepressant effects of ketamine in depressed patients. **Biological psychiatry**, v. 47, n. 4, p. 351–4, 2000.

BRIDGES, N.; SLAIS, K.; SYKOVÁ, E. The effects of chronic corticosterone on hippocampal astrocyte numbers: a comparison of male and female Wistar rats. **Acta neurobiologiae experimentalis**, v. 68, n. 2, p. 131–8, 2008.

CAMPBELL, S.; MARRIOTT, M.; NAHMIAS, C.; MACQUEEN, G. M. Lower hippocampal volume in patients suffering from depression: a meta-analysis. **The American journal of psychiatry**, v. 161, n. 4, p. 598–607, 2004.

CARROLL, B. J.; CASSIDY, F.; NAFTOLOWITZ, D.; TATHAM, N. E.; WILSON, W. H.; IRANMANESH, A.; LIU, P. Y.; VELDHUIS, J. D.; Pathophysiology of hypercortisolism in depression. **Acta psychiatrica Scandinavica. Supplementum**, , n. 433, p. 90–103, 2007.

CZÉH, B.; SIMON, M.; SCHMELTING, B.; HIEMKE, C.; FUCHS, E. Astroglial plasticity in the hippocampus is affected by chronic psychosocial stress and concomitant fluoxetine treatment. **Neuropsychopharmacology** □: official publication of the American College of Neuropsychopharmacology, v. 31, n. 8, p. 1616–26, 2006.

D'AQUILA, P. S.; PEANA, A. T.; CARBONI, V.; SERRA, G. Different effect of desipramine on locomotor activity in quinpirole-treated rats after repeated restraint and chronic mild stress. **Journal of Psychopharmacology**, v. 14, n. 4, p. 347–352, 2000.

DEAN, O.; GIORLANDO, F.; BERK, M. N-acetylcysteine in psychiatry: current therapeutic evidence and potential mechanisms of action. **Journal of psychiatry & neuroscience** □: JPN, v. 36, n. 2, p. 78–86, 2011.

DECRAMER, M.; RUTTEN-VAN MÖLKEN, M.; DEKHUIJZEN, P. N. R.; TROOSTERS, T.; VAN HERWAARDEN, C.; PELLEGRINO, R.; VAN SCHAYCK, C. P.; OLIVIERI, D.; DEL DONNO, M.; DE BACKER, W.; LANKHORST, I.; ARDIA, A. Effects of N-acetylcysteine on outcomes in chronic obstructive pulmonary disease (Bronchitis Randomized on NAC Cost-Utility Study, BRONCUS): a randomised placebo-controlled trial. **Lancet**, v. 365, n. 9470, p. 1552–60, 2005.

DE KLOET, E. R.; JOËLS, M.; HOLSBOER, F. Stress and the brain: from adaptation to disease. **Nature reviews. Neuroscience**, v. 6, n. 6, p. 463–75, 2005.

DE VASCONCELLOS-BITTENCOURT, A. P. S.; VENDITE, D. A.; NASSIF, M.; CREMA, L. M.; FROZZA, R.; THOMAZI, A. P.; NIETO, F. B.; WOFCHUK, S.; SALBEGO C, DA ROCHA ER, DALMAZ C.. Chronic stress and lithium treatments alter hippocampal glutamate uptake and release in the rat and potentiate necrotic cellular death after oxygen and glucose deprivation. **Neurochemical research**, v. 36, n. 5, p. 793–800, 2011.

DRAGO, A.; CRISAFULLI, C.; SIDOTI, A.; SERRETTI, A. The molecular interaction between the glutamatergic, noradrenergic, dopaminergic and serotonergic systems informs a

detailed genetic perspective on depressive phenotypes. **Progress in neurobiology**, v. 94, n. 4, p. 418–60, 2011.

DUCOTTET, C.; BELZUNG, C. Behaviour in the elevated plus-maze predicts coping after subchronic mild stress in mice. **Physiology & behavior**, v. 81, n. 3, p. 417–26, 2004.

EDWARDS, L.E.; MEZUK, B. Anxiety and risk of type 2 diabetes: evidence from the Baltimore Epidemiologic Catchment Area Study. **Journal of Psychosomatic Research**, v.73, n. 6, p.418-23, 2012.

E SILVA, J. A. Overview of the field. **Metabolism: clinical and experimental**, v. 54, n. 5 Suppl 1, p. 5–9, 2005.

FERREIRA, F. R.; BIOJONE, C.; JOCA, S. R. L.; GUIMARÃES, F. S. Antidepressant-like effects of N-acetyl-L-cysteine in rats. **Behavioural pharmacology**, v. 19, n. 7, p. 747–50, 2008.

FLORIO, P.; ZATELLI, M. C.; REIS, F. M.; DEGLI UBERTI, E. C.; PETRAGLIA, F. Corticotropin releasing hormone: a diagnostic marker for behavioral and reproductive disorders? **Frontiers in bioscience: a journal and virtual library**, v. 12, n. 2, p. 551–60, 2007.

GARAKANI, A.; MARTINEZ, J. M.; YEHUDA, R.; GORMAN, J. M. Cerebrospinal fluid levels of glutamate and corticotropin releasing hormone in major depression before and after treatment. **Journal of affective disorders**, , n. 2007, p. 1–4, 2012.

GRANT, J. E.; ODLAUG, B. L.; KIM, S. W. N-acetylcysteine, a glutamate modulator, in the treatment of trichotillomania: a double-blind, placebo-controlled study. **Archives of general psychiatry**, v. 66, n. 7, p. 756–63, 2009.

HAILE, C. N.; GRANDPRE, T.; KOSTEN, T. A. Chronic unpredictable stress, but not chronic predictable stress, enhances the sensitivity to the behavioral effects of cocaine in rats. **Psychopharmacology**, v. 154, n. 2, p. 213–220, 2001.

HASHIMOTO, K. The role of glutamate on the action of antidepressants. **Progress in neuro-psychopharmacology & biological psychiatry**, 2010.

HILL, M. N.; HELLEMANS, K. G. C.; VERMA, P.; GORZALKA, B. B.; WEINBERG, J. Neurobiology of chronic mild stress: Parallels to major depression. **Neuroscience and biobehavioral reviews**, v. 36, n. 9, p. 2085–117, 2012.

JAUREGUI-HUERTA, F.; RUVALCABA-DELGADILLO, Y.; GONZALEZ-CASTAÑEDA, R.; GARCIA-ESTRADA, J.; GONZALEZ-PEREZ, O.; LUQUIN, S. Responses of glial cells to stress and glucocorticoids. **Current immunology reviews**, v. 6, n. 3, p. 195–204, 2010.

KATZ, R. J.; ROTH, K. A; CARROLL, B. J. Acute and chronic stress effects on open field activity in the rat: implications for a model of depression. **Neuroscience and biobehavioral reviews**, v. 5, n. 2, p. 247–51, 1981.

- KEITNER, G. I.; RYAN, C. E.; SOLOMON, D. A. Realistic expectations and a disease management model for depressed patients with persistent symptoms. **The Journal of clinical psychiatry**, v. 67, n. 9, p. 1412–21, 2006.
- KESSING, L. V.; WILLER, I. S.; KNORR, U. Volume of the adrenal and pituitary glands in depression. **Psychoneuroendocrinology**, v. 36, n. 1, p. 19–27, 2011.
- KRISHNADAS, R.; CAVANAGH, J. Depression: an inflammatory illness? **Journal of neurology, neurosurgery, and psychiatry**, v. 83, n. 5, p. 495–502, 2012.
- KRISHNAN, V.; NESTLER, E. J. The molecular neurobiology of depression. **Nature**, v. 455, n. 7215, p. 894–902, 2008
- KYROU, I.; TSIGOS, C. Stress hormones: physiological stress and regulation of metabolism. **Current opinion in pharmacology**, v. 9, n. 6, p. 787–93, 2009.
- KÜÇÜKIBRAHIMOĞLU, E.; SAYGIN, M. Z.; CALIŞKAN, M.; KAPLAN, O. K.; UNSAL, C.; GÖREN, M. Z.; The change in plasma GABA, glutamine and glutamate levels in fluoxetine- or S-citalopram-treated female patients with major depression. **European journal of clinical pharmacology**, v. 65, n. 6, p. 571–7, 2009.
- LAFLEUR, D. L.; PITTENGER, C.; KELMENDI, B.; GARDNER, T.; WASYLINK, S.; MALISON, R. T.; SANACORA, G.; KRYSTAL, J. H.; CORIC, V. N-acetylcysteine augmentation in serotonin reuptake inhibitor refractory obsessive-compulsive disorder. **Psychopharmacology**, v. 184, n. 2, p. 254–6, 2006.
- LAMBERT, K. G.; GERECKE, K. M.; QUADROS, P. S.; DOUDERA, E.; JASNOW, A. M.; KINSLEY, C. H. Activity-stress increases density of GFAP-immunoreactive astrocytes in the rat hippocampus. **Stress (Amsterdam, Netherlands)**, v. 3, n. 4, p. 275–84, 2000.
- LAROWE, S. D.; MARDIKIAN, P.; MALCOLM, R.; MYRICK, H.; KALIVAS, P.; MCFARLAND, K.; SALADIN, M.; MCRAE, A.; BRADY, K. Safety and tolerability of N-acetylcysteine in cocaine-dependent individuals. **The American journal on addictions / American Academy of Psychiatrists in Alcoholism and Addictions**, v. 15, n. 1, p. 105–10, 2006.
- LEE, A. L.; OGLE, W. O.; SAPOLSKY, ROBERT M. Stress and depression: possible links to neuron death in the hippocampus. **Bipolar disorders**, v. 4, n. 2, p. 117–28, 2002.
- LI, X.; TIZZANO, J. P.; GRIFFEY, K.; CLAY, M.; LINDSTROM, T.; SKOLNICK, P. Antidepressant-like actions of an AMPA receptor potentiator (LY392098). **Neuropharmacology**, v. 40, n. 8, p. 1028–33, 2001.
- LIN, D.; BRUIJNZEEL, A W.; SCHMIDT, P.; MARKOU, A. Exposure to chronic mild stress alters thresholds for lateral hypothalamic stimulation reward and subsequent responsiveness to amphetamine. **Neuroscience**, v. 114, n. 4, p. 925–33, 2002.
- LINCK, V. M.; COSTA-CAMPOS, L.; PILZ, L. K.; GARCIA, C. R. L.; ELISABETSKY, E. AMPA glutamate receptors mediate the antidepressant-like effects of N-acetylcysteine in the mouse tail suspension test. **Behavioural pharmacology**, v. 23, n. 2, p. 171–7, 2012.

LÓPEZ-MUÑOZ, F.; ALAMO, C. Monoaminergic neurotransmission: the history of the discovery of antidepressants from 1950s until today. **Current pharmaceutical design**, v. 15, n. 14, p. 1563–86, 2009.

MACHADO-VIEIRA, R.; SALVADORE, G.; DIAZGRANADOS, N.; ZARATE, C. A. Ketamine and the next generation of antidepressants with a rapid onset of action. **Pharmacology & therapeutics**, v. 123, n. 2, p. 143–50, 2009.

MAENG, S.; ZARATE, C. A.; DU, J.; SCHLOESSER, R. J.; MCCAMMON, J.; CHEN, G.; MANJI, H. K. Cellular mechanisms underlying the antidepressant effects of ketamine: role of alpha-amino-3-hydroxy-5-methylisoxazole-4-propionic acid receptors. **Biological psychiatry**, v. 63, n. 4, p. 349–52, 2008.

MAES, M.; VERKERK, R.; VANDOOOLAEGHE, E.; LIN, A.; SCHARPÉ, S. Serum levels of excitatory amino acids, serine, glycine, histidine, threonine, taurine, alanine and arginine in treatment-resistant depression: modulation by treatment with antidepressants and prediction of clinical responsivity. **Acta psychiatrica Scandinavica**, v. 97, n. 4, p. 302–8, 1998.

MAGALHÃES, P. V.; DEAN, OLÍVIA M.; BUSH, A. I.; COPOLOV, D. L.; MALHI, G. S.; KOHLMANN, K.; JEAVONS, S.; SCHAPKAITZ, I.; ANDERSON-HUNT, M.; BERK, M. N-acetylcysteine for major depressive episodes in bipolar disorder. **Revista brasileira de psiquiatria (São Paulo, Brazil)**: 1999, v. 33, n. 4, p. 374–8, 2011.

MCEWEN, B. S. Physiology and neurobiology of stress and adaptation: central role of the brain. **Physiological reviews**, v. 87, n. 3, p. 873–904, 2007.

MEYER, C. Depressive disorders were the fourth leading cause of global disease burden in the year 2000. **Evidence-based mental health**, v. 7, n. 4, p. 123, 2004.

MINEUR, Y. S.; BELZUNG, CATHERINE; CRUSIO, W. E. Effects of unpredictable chronic mild stress on anxiety and depression-like behavior in mice. **Behavioural brain research**, v. 175, n. 1, p. 43–50, 2006.

MITANI, H.; SHIRAYAMA, Y.; YAMADA, T.; MAEDA, K.; ASHBY, C. R.; KAWAHARA, R. Correlation between plasma levels of glutamate, alanine and serine with severity of depression. **Progress in neuro-psychopharmacology & biological psychiatry**, v. 30, n. 6, p. 1155–8, 2006.

MONROE, S. M.; HARKNESS, K. L. Life stress, the “kindling” hypothesis, and the recurrence of depression: considerations from a life stress perspective. **Psychological review**, v. 112, n. 2, p. 417–45, 2005.

MONTEJO-GONZÁLEZ, A. L.; LLORCA, G.; IZQUIERDO, J. A.; LEDESMA, A.; BOUSOÑO, M.; CALCEDO, A.; CARRASCO, J. L.; CIUDAD, J.; DANIEL, E.; DE LA GANDARA, J.; DERECHO, J.; FRANCO, M.; GOMEZ, M. J.; MACIAS, J. A.; MARTIN, T.; PEREZ, V.; SANCHEZ, J. M.; SANCHEZ, S.; VICENS, E. SSRI-induced sexual dysfunction: fluoxetine, paroxetine, sertraline, and fluvoxamine in a prospective, multicenter, and descriptive clinical study of 344 patients. **Journal of sex & marital therapy**, v. 23, n. 3, p. 176–94, 1997.

MORRIS, M. C.; RAO, U.; GARBER, J. Cortisol responses to psychosocial stress predict depression trajectories: Social-evaluative threat and prior depressive episodes as moderators. **Journal of affective disorders**, v. 143, n. 1-3, p. 223–230, 2012.

MURISON, R.; HANSEN, A. L. Reliability of the Chronic Mild Stress paradigm: Implications for research and animal welfare. **Integrative Physiological & Behavioral Science**, v. 36, n. 4, p. 266–274, 2001.

MUSAZZI, L.; MILANESE, M.; FARISELLO, P.; ZAPPETTINI, S.; TARDITO, D.; BARBIERO, V. S.; BONIFACINO, T.; MALLEI, A.; BALDELLI, P.; RACAGNI, G.; RAITERI, M.; BENFENATI, F.; BONANNO, G.; POPOLI, M. Acute stress increases depolarization-evoked glutamate release in the rat prefrontal/frontal cortex: the dampening action of antidepressants. **PloS one**, v. 5, n. 1, p. e8566, 2010.

NASCIMENTO, M. M.; SULIMAN, M. E.; SILVA, M.; CHINAGLIA, T.; MARCHIORO, J.; HAYASHI, S. Y.; RIELLA, M. C.; LINDHOLM, B.; ANDERSTAM, B. Effect of oral N-acetylcysteine treatment on plasma inflammatory and oxidative stress markers in peritoneal dialysis patients: a placebo-controlled study. **Peritoneal dialysis international: journal of the International Society for Peritoneal Dialysis**, v. 30, n. 3, p. 336–42, 2010.

NEMEROFF, C. B.; WIDERLÖV, E.; BISSETTE, G.; WALLÉUS, H.; KARLSSON, I.; EKLUND, K.; KILTS, C. D.; LOOSEN, P. T.; VALE, W. Elevated concentrations of CSF corticotropin-releasing factor-like immunoreactivity in depressed patients. **Science**, v. 226, n. 4680, p. 1342–4, 1984.

NICIU, M. J.; KELMENDI, B.; SANACORA, G. Overview of glutamatergic neurotransmission in the nervous system. **Pharmacology, biochemistry, and behavior**, v. 100, n. 4, p. 656–64, 2012.

OLSEN, C. K.; CARSTENSEN, P. M.; Chronic mild stress-induced increase in responsiveness to reward is accompanied by increases in dopamine D2 receptor binding and expression of mRNA within the mesolimbic and nigrostriatal system. Program No 415.6. Abstract Viewer/Itinerary Planner, Washington, DC, **Soc Neurosci**, 2001.

OSTROFF, R.; GONZALES, M.; SANACORA, G. Antidepressant effect of ketamine during ECT. **The American journal of psychiatry**, v. 162, n. 7, p. 1385–6, 2005.

PALAZIDOU, E. The neurobiology of depression. **British medical bulletin**, v. 101, p. 127–45, 2012.

PAPP, M.; MUSCAT, R.; WILLNER, P. Subsensitivity to rewarding and locomotor stimulant effects of a dopamine agonist following chronic mild stress. **Psychopharmacology**, v. 110, n. 1-2, p. 152–8, 1993a.

PAPP, M.; WILLNER, P.; MUSCAT, R. Behavioural sensitization to a dopamine agonist is associated with reversal of stress-induced anhedonia. **Psychopharmacology**, v. 110, n. 1-2, p. 159–64, 1993b.



PIATO, A L.; DETANICO, B. C.; LINCK, V. M. et al. Anti-stress effects of the “tonic” *Ptychopetalum olacoides* (Marapuama) in mice. **Phytomedicine** □: **international journal of phytotherapy and phytopharmacology**, v. 17, n. 3-4, p. 248–53, 2010.

PITTENGER, C.; DUMAN, R. S. Stress, depression, and neuroplasticity: a convergence of mechanisms. **Neuropsychopharmacology** □: **official publication of the American College of Neuropsychopharmacology**, v. 33, n. 1, p. 88–109, 2008.

POPOLI, M.; YAN, Z.; MCEWEN, B. S.; SANACORA, G. The stressed synapse: the impact of stress and glucocorticoids on glutamate transmission. **Nature reviews. Neuroscience**, v. 13, n. 1, p. 22–37, 2012. Nature Publishing Group.

RAADSHEER, F. C.; HOOGENDIJK, W. J.; STAM, F. C.; TILDERS, F. J.; SWAAB, D. F. Increased numbers of corticotropin-releasing hormone expressing neurons in the hypothalamic paraventricular nucleus of depressed patients. **Neuroendocrinology**, v. 60, n. 4, p. 436–44, 1994.

RAMOS-REMUS, C.; GONZÁLEZ-CASTAÑEDA, R. E.; GONZÁLEZ-PEREZ, O.; LUQUIN, SONIA; GARCÍA-ESTRADA, J. Prednisone induces cognitive dysfunction, neuronal degeneration, and reactive gliosis in rats. **Journal of investigative medicine** □: **the official publication of the American Federation for Clinical Research**, v. 50, n. 6, p. 458–64, 2002.

RICHARDS, D. Prevalence and clinical course of depression: a review. **Clinical psychology review**, v. 31, n. 7, p. 1117–25, 2011

SANACORA, G.; TRECCANI, G.; POPOLI, M. Towards a glutamate hypothesis of depression: an emerging frontier of neuropsychopharmacology for mood disorders. **Neuropharmacology**, v. 62, n. 1, p. 63–77, 2012.

SANACORA, G.; ZARATE, C. A.; KRYSTAL, JOHN H.; MANJI, H. K. Targeting the glutamatergic system to develop novel, improved therapeutics for mood disorders. **Nature reviews. Drug discovery**, v. 7, n. 5, p. 426–37, 2008.

SAPOLSKY, R M. Glucocorticoids and hippocampal atrophy in neuropsychiatric disorders. **Archives of general psychiatry**, v. 57, n. 10, p. 925–35, 2000.

SCHMAAL, L.; VELTMAN, D. J.; NEDERVEEN, A.; BRINK, W. VAN DEN; GOUDRIAAN, A. E. N-acetylcysteine normalizes glutamate levels in cocaine-dependent patients: a randomized crossover magnetic resonance spectroscopy study. **Neuropsychopharmacology** □: **official publication of the American College of Neuropsychopharmacology**, v. 37, n. 9, p. 2143–52, 2012.

SJÖRS, A.; JANSSON, P.-A.; ERIKSSON, J. W.; JONSDOTTIR, I. H. Increased insulin secretion and decreased glucose concentrations, but not allostatic load, are associated with stress-related exhaustion in a clinical patient population. **Stress (Amsterdam, Netherlands)**, v. 16, n. 1, p. 24–33, 2013.

SMAGA, I.; POMIERNY, B.; KRZYŻANOWSKA, W.; POMIERNY-CHAMIOŁO, L.; MISZKIEL, J.; NIEDZIELSKA, E.; OGÓRKA, A.; FILIP, M. N-acetylcysteine possesses

antidepressant-like activity through reduction of oxidative stress: Behavioral and biochemical analyses in rats. **Progress in neuro-psychopharmacology & biological psychiatry**, v. 39, n. 2, p. 280–7, 2012.

SOLOMON, D. A.; KELLER, M. B.; LEON, A. C.; MUELLER, T. I.; LAVORI, P. W.; SHEA, M. T.; CORYELL, W.; WARSHAW, M.; TURVEY, C.; MASER, J. D.; ENDICOTT, J. Multiple recurrences of major depressive disorder. **The American journal of psychiatry**, v. 157, n. 2, p. 229–33, 2000.

STAHL, S. M. *Psicofarmacologia – Base Neurocientífica e Aplicações Práticas*, 2ª Ed. Rio de Janeiro. **MEDSI Editora Médica e Científica Ltda**, 2002

TAMASHIRO, K. L.; SAKAI, R. R.; SHIVELY, C. A.; KARATSOREOS, I. N.; REAGAN, L. P. Chronic stress, metabolism, and metabolic syndrome. **Stress (Amsterdam, Netherlands)**, v. 14, n. 5, p. 468–74, 2011.

WILLNER, P. Chronic mild stress (CMS) revisited: consistency and behavioural-neurobiological concordance in the effects of CMS. **Neuropsychobiology**, v. 52, n. 2, p. 90–110, 2005.

WILLNER, P.; TOWELL, A.; SAMPSON, D.; SOPHOKLEOUS, S.; MUSCAT, R. Reduction of sucrose preference by chronic unpredictable mild stress, and its restoration by a tricyclic antidepressant. **Psychopharmacology**, v. 93, n. 3, p. 358–64, 1987.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. *The global burden of disease: 2004 update*. Geneva, Switzerland. **WHO Press**.2008

YALCIN, I.; AKSU, F.; BELZUNG, CATHERINE. Effects of desipramine and tramadol in a chronic mild stress model in mice are altered by yohimbine but not by pindolol. **European journal of pharmacology**, v. 514, n. 2-3, p. 165–74, 2005.

YALCIN, I.; BELZUNG, CATHERINE; SURGET, A. Mouse strain differences in the unpredictable chronic mild stress: a four-antidepressant survey. **Behavioural brain research**, v. 193, n. 1, p. 140–3, 2008.

YILMAZ, A.; SCHULZ, D.; AKSOY, A.; CANBEYLI, R. Prolonged effect of an anesthetic dose of ketamine on behavioral despair. **Pharmacology, biochemistry, and behavior**, v. 71, n. 1-2, p. 341–4, 2002.

ZARATE, C. A.; SINGH, J. B.; CARLSON, P. J.; BRUTSCHE, N. E.; AMELI, R.; LUCKENBAUGH, D. A.; CHARNEY, D. S.; MANJI, H. K. A randomized trial of an N-methyl-D-aspartate antagonist in treatment-resistant major depression. **Archives of general psychiatry**, v. 63, n. 8, p. 856–64, 2006.