

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO
DEPARTAMENTO DE FARMACOLOGIA

Vinicius A. H. Sato

**Participação da serotonina no efeito tipo-
antidepressivo induzido pela inibição da nNOS no
hipocampo de ratos**

Ribeirão Preto - SP

2011

VINICIUS A. H. SATO

**Participação da serotonina no efeito tipo-
antidepressivo induzido pela inibição da nNOS no
hipocampo de ratos**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Farmacologia da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo, para a obtenção do título de Mestre em Ciências.

Área de Concentração: Farmacologia
Orientador: Profa. Dra. Sâmia Regiane Lourenço Joca

Ribeirão Preto - SP

2011

AUTORIZO A DIVULGAÇÃO TOTAL OU PARCIAL DESTE TRABALHO, POR QUALQUER MEIO CONVENCIONAL OU ELETRÔNICO, PARA FINS DE ESTUDO E PESQUISA, DESDE QUE CITADA A FONTE.

FICHA CATALOGRÁFICA

Sato, Vinicius Antonio Hiroaki

Participação da serotonina no efeito tipo-antidepressivo induzido pela inibição da nNOS no hipocampo de ratos. Ribeirão Preto, 2011.

73 p. : il. ; 30 cm

Dissertação de Mestrado, apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto/USP. Área de concentração: Farmacologia.

Orientadora: Lourenço Joca, Sâmia Regiane.

1. Depressão.
2. Óxido nítrico.
3. Serotonina.
4. Teste do nado forçado.
5. nNOS.

FOLHA DE APROVAÇÃO

Vinicius Antonio Hiroaki Sato

Participação da serotonina no efeito tipo-antidepressivo induzido pela inibição da nNOS no hipocampo de ratos

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Farmacologia da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo, como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Ciências.

Área de Concentração: Farmacologia

Aprovado em: 07/07/2011

Banca Examinadora:

Profa. Dra. Sâmia Regiane Lourenço Joca.

Instituição: FCFRP-USP.

Assinatura: _____

Profa. Dra. Rúbia Maria Monteiro Weffort de Oliveira.

Instituição: UEM – PR.

Assinatura: _____

Prof. Dr. Hélio Zangrossi Jr.

Instituição: FMRP-USP.

Assinatura: _____

Por que ainda há pessoas que querem e insistem em acreditar na humanidade.

Para Sirley, Antonio e Ana Luisa.

AGRADECIMENTOS

À Prof^a. Dr^a. Sâmia Regiane Lourenço Joca, por ter me acolhido como orientado e como amigo. Pelo exemplo de pessoa, amizade, ética, profissional e humana, e pela confiança em mim depositada;

À Ana Luisa, que com muito amor me ajudou tanto nesses últimos dois anos. Por sua paciência, companheirismo, compreensão e principalmente por todo o amor e confiança, muito obrigado;

À minha família, pelo apoio constante e incondicional, mesmo com a distância;

A todos os meus amigos, por tudo o que representam e significam para mim;

Às professoras Dr^a. Claudete Faiad Name e Dr^a. Sílvia Ponzoni pelas lições de vida, ciência e amizade;

Aos professores Dr. Francisco Guimarães, Dr. Hélio Zangrossi Jr e Dr. Leonardo Resstel Barbosa Moraes, pelas conversas construtivas e aos demais professores do Programa de Pós Graduação em Farmacologia por todos os exemplos passados a mim sobre pesquisa e docência;

Aos professores Dra Rúbia M. W. de Oliveria e Dr. Hélio Zangrossi Jr, por terem aceitado prontamente ao convite de compor a banca, mesmo com prazos apertados e pelos construtivos conselhos que com certeza ajudaram a melhorar este trabalho;

Aos amigos Laena e Vitor pelo companheirismo, apoio e inestimável amizade;

Às amigas Eva e Luana por terem me acolhido pra dentro de suas vidas e terem constituído minha família em Ribeirão Preto;

Aos amigos e companheiros de bancada (Amanda, Ariandra, Carol, Cassiano, Deidiane, Evelyn, Karina, Laura, Mateus, Michelle, Michelly, Murilo, Rafaela) pela amizade, parceria, risadas e acima de tudo pelo espírito de grupo.

A José Waldik Ramón por todo o auxílio e principalmente pela amizade e conversas jogadas fora;

A Zé Carlos, pela experiência transmitida, exemplo de profissional e amizade;

À Flávia Fiacadori Salata pela amizade e pelo indispensável apoio técnico;

Aos secretários Fátima Helena Petean, Marlene Rodrigues da Silva, e Sônia Maria Stefanelli pela inestimável ajuda e amizade construída;

Aos funcionários da Farmacologia da FCFRP, Miriam, Juliana, Mayara, Marcela e D. Nina, pela amizade e agradável convívio;

Aos amigos e companheiros da pós-graduação por cada momento de aprendizado e convívio juntos, mas principalmente pelos momentos de diversão;

Às agências de fomento, CAPES, CNPq e FAPESP, pelo auxílio financeiro;

Obrigado por tudo!

RESUMO

SATO, V.A.H. Participação da serotonina no efeito tipo-antidepressivo induzido pela inibição da nNOS no hipocampo de ratos. 2011. 73f. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2011.

Introdução: O óxido nítrico (NO) é considerado um importante neuromodulador que está envolvido com a neurobiologia da adaptação ao estresse e da depressão. A administração sistêmica ou intra-hipocampal de inibidores da NO sintase neuronal (nNOS) induz efeitos do tipo antidepressivo em modelos animais. Evidências recentes indicam que os efeitos sistêmicos dos inibidores da nNOS são dependentes dos níveis de serotonina no encéfalo. O sistema serotoninérgico do hipocampo dorsal, por ativação dos receptores serotoninérgicos do tipo 1A (5HT_{1A}), facilita a adaptação ao estresse e contribui para os efeitos comportamentais de drogas antidepressivas. Portanto, o objetivo do presente estudo foi testar a hipótese de que o efeito do tipo antidepressivo induzido pela administração hipocampal de inibidores da nNOS seria mediado pela facilitação da neurotransmissão serotoninérgica local e subsequente ativação de receptores 5HT_{1A}. **Métodos:** Após cirurgia estereotáxica, ratos Wistar com cânulas-guia direcionadas ao hipocampo dorsal foram submetidos a sessão de pré-teste (15 minutos de nado) e receberam administrações locais das drogas: n^o-propil-L-arginina (NPA, inibidor seletivo da nNOS: 0,00001 - 1 nmol/0,5 µL), fluoxetina (inibidor seletivo da recaptação de serotonina – ISRS; 1, 3 e 10 nmol/0,5 µL), WAY100635 (antagonista seletivo para receptores 5HT_{1A}; 1, 3 e 10 nmol/0,5 µL) ou veículo (0,5 µL). Vinte e quatro horas depois, o tempo de imobilidade foi registrado em uma sessão de 5 minutos de nado. Todos os protocolos foram aprovados por um comitê de ética local (Proc. No 08.1.1133.53.4). **Resultados:** A administração intra hipocampal de NPA ou fluoxetina reduziu significativamente o tempo de imobilidade em animais submetidos ao teste do nado forçado, um efeito tipo antidepressivo. A administração de WAY100635 não induziu efeito por si, mas foi capaz de bloquear os efeitos induzidos por fluoxetina ou NPA. **Conclusões:** A inibição da nNOS, pelo NPA, ou a inibição da recaptação de serotonina, pela fluoxetina, no DH induziu efeito do tipo antidepressivo de similar magnitude. O fato de que o pré-tratamento com WAY100635 foi capaz de bloquear os efeitos induzidos por NPA e fluoxetina sugere que ambos os efeitos são mediados por facilitação da neurotransmissão serotoninérgica local e subsequente ativação de receptores 5HT_{1A}. Assim, esses resultados sugerem que níveis aumentados de NO no DH poderiam levar a um déficit na neurotransmissão serotoninérgica local e, portanto, predispor ao desenvolvimento das conseqüências comportamentais do estresse.

ABSTRACT

SATO, V.A.H. Serotonin participation in the antidepressant-like effect induced by hippocampal nNOS inhibition. 2011. 73f. Thesis (Masters) – Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2011.

Introduction: Nitric oxide (NO) has been suggested to play an important role in the neurobiology of stress adaptation and depression. The systemic or hippocampal administration of neuronal NO synthase (nNOS) inhibitors induces antidepressant-like effects in animal models. Recent evidence indicates that the systemic effects of nNOS inhibitors are dependent on serotonin levels in the brain. The serotonergic system of the dorsal hippocampus, through the activation of serotonin 1A (5-HT_{1A}) receptors, is proposed to mediate stress adaptation and the behavioral effects of antidepressant drugs. Therefore, the aim of the present study was to test the hypothesis that the antidepressant-like effects induced by nNOS inhibition into the hippocampus would be mediated by a facilitation of the local serotonergic neurotransmission and subsequent 5-HT_{1A} receptors activation. **Methods:** Male Wistar rats with guide-cannulae aimed at the dorsal hippocampus were submitted to the pretest session (15 minutes of swimming) and received local administrations of the drugs: n-propyl-L-arginine (NPA, selective nNOS inhibitor; 0.00001 - 1 nmol/0.5 µL), fluoxetine (selective serotonin reuptake inhibitor; 1, 3 and 10 nmol/0.5 µL), WAY100635 (selective 5-HT_{1A} receptors antagonist; 1, 3 and 10 nmol/0.5 µL) or vehicle (0.5 µL). One day later, the immobility time was registered at a 5 minutes swimming test session. All protocols were approved by a local ethical committee (Proc. N. 08.1.1133.53.4.). **Results:** The intrahippocampal administration of NPA or fluoxetine reduced the immobility time in animals submitted to the forced swimming test, an antidepressant-like effect in this model. WAY100635 did not induce any effect per se, but it was able to block the effects induced by fluoxetine or NPA. **Conclusions:** Inhibition of nNOS, by NPA, or inhibition of serotonin reuptake, by fluoxetine, in the dorsal hippocampus induced antidepressant-like effects of similar magnitude. The fact that pretreatment with WAY100635 was able to block NPA- and fluoxetine-induced effects indicates that both effects are mediated by a facilitation of the local serotonergic neurotransmission and subsequent activation of 5-HT_{1A} receptors. Therefore, these results suggest that increased NO levels in the dorsal hippocampus could impair local serotonergic neurotransmission and, thus, predisposes to the development of stress-induced behavioral consequences, such as depressive-like behaviors.

LISTA DE FIGURAS

Figura 01 – Sítios representativos da administração de drogas no hipocampo dorsal de ratos	36
Figura 02 - Administração intra-hipocampal de NPA induz efeitos do tipo antidepressivo em ratos submetidos ao teste do nado forçado	37
Figura 03 - Administração intra-hipocampal de fluoxetina induz efeitos do tipo antidepressivo em ratos submetidos ao teste do nado forçado	38
Figura 04 - Administração intra-hipocampal de WAY100635 não altera o comportamento de ratos submetidos ao teste do nado forçado	39
Figura 05 - Pré-administração de WAY100635 bloqueia os efeitos induzidos pela fluoxetina em ratos submetidos ao teste do nado forçado	40
Figura 06 - Pré-administração de WAY100635 bloqueia os efeitos do NPA em ratos submetidos ao teste do nado forçado	41

LISTA DE ABREVIATURAS

5HT_{1A} – Receptor serotoninérgico do tipo 1A.

5HTT – Proteína recaptadora de serotonina ou Recaptador de serotonina.

8-OH-DPAT - 8-Hidroxi-*N,N*-dipropil-2-aminotetralina.

ACPC – Ácido 1-aminociclopropanocarboxílico.

AP-7 – Ácido 2-amino-7-fosfonoheptanóico.

BDNF – Fator neurotrófico derivado do cérebro (*brain derived neurotrophic factor*).

cAMP – Adenosina monofosfato cíclica (*cyclic adenosine monophosphate*)

CGP 37849 – Ácido (*E*,2*R*)-2-amino-4-metil-5-fosfonopent-3-enóico.

CGP 39551 – Ácido etil éster (*E*)-(±)-2-Amino-4-metil-5-fosfono-3-pentenóico.

CID-10 – Classificação internacional estatística das doenças e problemas de saúde relacionados 10^a versão.

CREB – Proteína ligante aos elementos responsivos ao cAMP (*cAMP response element binding protein*).

CUMS – Estresse crônico variado imprevisível (*Chronic Unpredictable Mild Stress*).

DRN – Núcleo Dorsal da Rafe.

Eixo HPA – Eixo hipotálamo – pituitária – adrenal.

eNOS – Isoforma endotelial da óxido nítrico sintase.

FSL – Linhagem sensível de Flanders (*Flanders Sensitive Line*).

iNOS – isoforma induzível da óxido nítrico sintase.

K_i – Constante de inibição.

MK-801 – Dizolcipina.

NMDA – N-metil-D-aspartato.

nNOS – Isoforma neuronal da óxido nítrico sintase.

NO – Óxido nítrico.

NOS – Óxido nítrico sintase.

NO_x – Óxidos de nitrogênio.

NPA – N^o-propil-L-arginina.

PCPA – p-clorofenilalanina.

PSA-NCAM – Molécula de adesão de células neurais polisialilada (*polysialylated-neural cell adhesion molecule*).

sGC – Guanilato ciclase solúvel (*soluble guanylate cyclase*)

SNC – Sistema Nervoso Central.

ISRS – Inibidor Seletivo da Recaptação de Serotonina (*Serotonin Selective Recaptation Inhibitor*).

TST – Teste da Suspensão pela cauda (*Tail Suspension Test*).

WAY100635 - *N*-[2-[4-(2-metoxifenil)-1-piperazinil]etil]-*N*-(2-piridil)ciclohexanecarboxamida.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	14
1.1. Depressão.....	14
1.2. Neurobiologia da Depressão	15
1.3. Hipocampo e Depressão	18
1.4. NO e Depressão	21
1.5. Hipótese	25
2. OBJETIVOS	27
2.1. Objetivo geral.....	27
2.2. Objetivos específicos	27
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	29
3.1. Animais	29
3.2. Drogas	29
3.3. Procedimentos.....	30
3.3.1. Cirurgia estereotáxica e administração intracerebral de drogas	30
3.3.2. Análise Histológica dos sítios de administração de drogas	31
3.3.3. Teste do nado forçado.....	31
3.3.4. Desenho Experimental.....	32
3.4. Análise Estatística.....	34
4. RESULTADOS.....	36
4.1. Efeitos da administração intra-hipocampo dorsal de NPA em ratos submetidos ao teste do nado forçado.....	37
4.2. Efeitos da administração intra-hipocampo dorsal de fluoxetina em ratos submetidos ao teste do nado forçado.....	38
4.3. Efeitos da administração intra-hipocampo dorsal de WAY100635 em ratos submetidos ao teste do nado forçado.....	39
4.4. Efeitos da pré-administração de WAY100635 nos efeitos comportamentais induzidos pela administração de fluoxetina.....	40
4.5. Efeitos da pré-administração de WAY100635 nos efeitos comportamentais induzidos pela administração de NPA.....	41
5. DISCUSSÃO	43
6. CONCLUSÕES	52
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	54

INTRODUÇÃO

1. INTRODUÇÃO

1.1. Depressão

Segundo a Classificação Internacional das Doenças, décima versão (CID-10), organizada pela Organização Mundial da Saúde, transtornos afetivos são os transtornos onde o distúrbio principal ou fundamental seria uma mudança no humor ou no estado afetivo para depressão (com ou sem associação a ansiedade) ou para elação. Esses transtornos passam a interferir significativamente no desempenho das atividades cotidianas do indivíduo e a maioria dos outros sintomas é secundária ao - ou podem ser entendidos no - contexto da alteração do humor e na atividade alterada. Dentre esses transtornos, se incluem os episódios maníacos, o transtorno afetivo bipolar e os transtornos depressivos, onde temos os episódios depressivos, o transtorno depressivo recorrente e outros transtornos ditos persistentes, como a ciclotimia e a distímia (Organização Mundial da Saúde, 2007).

Nos episódios típicos de depressão, o indivíduo sofre de humor deprimido, redução de energia e diminuição das atividades normais. A capacidade de se divertir, interesse e concentração estão reduzidos e cansaço acentuado após mínimos esforços é comum. Sono e apetite também estão desregulados para mais ou para menos. Auto-estima e autoconfiança são quase sempre reduzidas e, mesmo na forma mais leve, pensamentos de culpa e inutilidade são freqüentemente presentes. O humor deprimido varia pouco ao longo dos dias, sendo irresponsivo às circunstâncias normais de flutuação do humor e pode ser acompanhado por sintomas como falta de interesse e falta de sentimentos prazerosos, despertar muito mais cedo do que o usual, com depressão mais acentuada pela manhã, retardo psicomotor, agitação, e perda de libido. Dependendo do número e severidade de sintomas, um episódio depressivo pode ser classificado em leve, moderado ou severo. Episódios repetidos de depressão como os descritos caracteriza o que é chamado de desordem depressiva recorrente (Organização Mundial da Saúde, 2007).

A depressão é uma das patologias mais comuns nos dias de hoje, com uma prevalência relatada de até 15% na população mundial para o transtorno depressivo maior, embora em alguns países sua importância epidemiológica seja ainda dificilmente reconhecida (Kessler *et al.*, 2007). Aqueles que sofrem de depressão podem ter um prejuízo significativo nas suas atividades diárias e relações pessoais; possuem um risco aumentado de mortalidade direta (suicídio) e indireta (comorbidade com outras doenças). O *Global Burden of Disease Study* identifica os transtornos de depressão como entre os maiores casos de incapacidade produtiva e também como doenças que representarão um crescente problema de saúde pública e sócio-econômico mundial nos próximos anos (Murray e Lopez, 1997). Além disso, o *European Brain Council* estima um custo anual para as desordens de humor (depressão, transtorno bipolar, ciclotimia e distímia) de 106 bilhões de euros, com uma prevalência de 21 milhões de pessoas espalhadas pelos 28 países da Europa (Olesen *et al.*, 2006).

Apesar dos avanços dos últimos 50 anos nas pesquisas em relação aos transtornos afetivos e seu tratamento, grande obscuridade ainda paira sobre o entendimento de sua neurobiologia. Devido à grande importância sócio-econômica dos transtornos depressivos, e acima disso, ao sofrimento individual e também do círculo social próximo das pessoas que sofrem desses transtornos, há necessidade da realização de estudos a respeito da neurobiologia da depressão a fim de se compreender os mecanismos que levam ao desenvolvimento deste transtorno e, eventualmente, desenvolver métodos mais eficazes de tratamento.

1.2. Neurobiologia da Depressão

As causas e processos envolvidos na gênese da depressão ainda não são totalmente esclarecidos e muitos avanços ocorreram nos últimos anos na busca por essa elucidação. Sabe-se que a depressão possui um componente genético bastante importante (Sullivan *et al.*, 2000),

principalmente nas formas mais severas de depressão (Baldwin, 2002). Há evidências, por exemplo, de que um polimorfismo no gene que codifica o transportador da serotonina (5-HTT) seja capaz de aumentar a sensibilidade de indivíduos a eventos aversivos e, assim, predispor indivíduos ao desenvolvimento de transtornos afetivos (Caspi *et al.*, 2003). Contudo, esse polimorfismo não seria suficiente para causar a depressão, tendo apenas um caráter modulatório sobre o fator ambiental. Efeitos semelhantes já foram descritos para outros polimorfismos em genes relacionados à neurotransmissão monoaminérgica, porém nenhum gene foi até agora reconhecido como um fator determinante para a ocorrência da doença, tamanha a complexidade do mecanismo genético envolvido (Nestler *et al.*, 2002; Holmans *et al.*, 2007).

Diante disso, observa-se que o componente ambiental possui também grande importância no desenvolvimento da depressão e dos demais transtornos afetivos. Dentre esses fatores, o estresse tem recebido especial importância. Há evidências de que, em cerca de 60% dos casos, os episódios depressivos são precedidos pela ocorrência de fatores estressantes, principalmente os de origem psicossocial, sugerindo o envolvimento do estresse em sua etiologia (Post, 1992). De fato, a depressão é frequentemente descrita como uma desordem relacionada ao estresse, com vasta citação bibliográfica que coloca o estresse como o principal fator capaz de predispor ao desenvolvimento de transtornos depressivos (Post, 1992; Kendler *et al.*, 1995; Nestler *et al.*, 2002; McEwen, 2004; Southwick *et al.*, 2005; Pittenger e Duman, 2008).

Devido a essa estreita relação entre estresse e depressão, a maioria dos modelos animais para o estudo desse transtorno é baseada na exposição de animais a situações estressantes inescapáveis de diferentes naturezas. Essa exposição resulta em mudanças comportamentais que pretendem simular alguns aspectos dos transtornos depressivos e que sejam reversíveis pelo tratamento com drogas antidepressivas (Willner e Mitchell, 2002). A utilização desses modelos tem sido muito importante na busca de possíveis novas abordagens

terapêuticas, bem como na investigação de aspectos que ainda não são totalmente compreendidos sobre a neurobiologia da depressão.

A principal teoria sobre a neurobiologia da depressão é conhecida como a “Teoria monoaminérgica clássica da depressão”. Essa teoria foi baseada nas propostas de J. Schildkraut (1965) e de Lapin e Oxenkrug (1969) e, de acordo com esta, deficiências na neurotransmissão noradrenérgica e/ou serotoninérgica, em determinados sítios funcionalmente importantes no encéfalo, seriam a causa de desordens como a depressão (Schildkraut, 1965; Lapin e Oxenkrug, 1969; Castrén, 2005). Porém, alguns achados levam a questões que não podem ser resolvidas por essa correlação tão simples. Por exemplo, a depleção aguda de triptofano, o precursor da serotonina, causa diminuição dos níveis de serotonina no encéfalo, porém não tem efeitos ou causa apenas uma leve disforia em pacientes saudáveis (Delgado, 2004; Booij *et al.*, 2003). A hipótese também não explica por que são necessárias várias semanas de tratamento continuado com drogas antidepressivas para que seus resultados clínicos apareçam, uma vez que seus efeitos sobre a neurotransmissão monoaminérgica são vistos logo após a administração dessas drogas (Nestler, 1998). Além disso, cerca de 45% dos pacientes são resistentes ao tratamento farmacológico clássico (Keks *et al.*, 2007), o que mostra que a depressão não deve ser encarada como uma desordem simples e unitária, dependente apenas das concentrações de monoaminas (Katz *et al.*, 2010).

Avanços nas pesquisas deram origem a novas abordagens para a neurobiologia da depressão e uma das principais é a “Hipótese Neurotrófica” (Castrén, 2005). De acordo com essa hipótese, a depressão seria causada não simplesmente por uma depleção de monoaminas, mas por alterações plásticas envolvendo um prejuízo nas funções mediadas por neurotrofinas, como o fator neurotrófico derivado do cérebro (o BDNF – *Brain Derived Neurotrophic Factor*), o que levaria a disfunções nas redes neurais causando um prejuízo funcional que levaria também a um desequilíbrio monoaminérgico nas estruturas límbicas (Castrén, 2005). As neurotrofinas regulam o

crescimento neural e a diferenciação ao longo do desenvolvimento cerebral; regulam a plasticidade dos neurônios e das células gliais; e são importantes nas respostas aos danos neuronais, na manutenção das conexões funcionais entre as células e na neurogênese (Nestler, 2002).

Tal hipótese está fundamentada em estudos que indicam que o estresse é capaz de diminuir e o tratamento com drogas antidepressivas aumentar significativamente a expressão de BDNF nas regiões límbicas, em especial no hipocampo (Duman *et al.*, 2006). Além disso, o estresse promove diminuição da produção e da sobrevivência de novos neurônios no hipocampo (Gould *et al.*, 1997; Gould e Tanapat, 1999; Tanapat *et al.*, 2001; Malberg e Duman, 2003), bem como reduções no comprimento de espinhos dendríticos e também na arborização de neurônios piramidais hipocampais (McKittrick *et al.*, 2000), efeitos que são atenuados em animais tratados cronicamente com drogas antidepressivas (Duman *et al.*, 2006). Recentemente, foi demonstrado que o efeito comportamental de drogas antidepressivas depende dos níveis de BDNF no giro denteado do hipocampo (Adachi *et al.*, 2010), bem como da neurogênese (Santarelli *et al.*, 2003), uma vez que o bloqueio local dessa neurotransmissão, ou da neurogênese, impede o aparecimento do efeito tipo-antidepressivo em modelos animais

Porém, mesmo com o surgimento dessas novas hipóteses, o entendimento a respeito dos mecanismos moleculares e neurotransmissores envolvidos na neurobiologia da depressão ainda não estão completamente elucidados.

1.3. Hipocampo e Depressão

Inúmeros trabalhos apontam o hipocampo como uma das principais estruturas cerebrais envolvidas nos processos de adaptação ao estresse (Shumake *et al.*, 2002; Joca *et al.*, 2003b; Seidenbecher *et al.*, 2003) e na neurobiologia da depressão (Lee *et al.*, 2002; Sheline *et al.*, 2002; Campbell e MacQueen, 2004).

Primeiramente, sabe-se que o estresse promove ativação do eixo hipotálamo-pituitária-adrenal (eixo HPA), que leva a liberação de glicocorticóides pela supra-renal. Dependendo da duração e da intensidade do estresse, pode haver uma elevação sustentada dos níveis de corticóides, os quais podem promover vários efeitos deletérios ao organismo, incluindo morte celular (Lee *et al.*, 2002; Lucassen *et al.*, 2001a) e redução da expressão de neurotrofinas (Nestler, 2002), por exemplo. Essas alterações podem tornar o indivíduo mais susceptível ao desenvolvimento de distúrbios psiquiátricos, como a depressão (McEwen, 2007; Joels, 2008) e, de fato, o eixo HPA se encontra desregulado em grande parte dos indivíduos depressivos (McEwen, 2007; Joels, 2008). Portanto, a regulação da atividade do eixo HPA parece ter um papel importante no controle da resposta endócrina e emocional ao estresse.

Nesse sentido, o hipocampo é a região encefálica com a maior densidade de receptores para corticosteróides (receptores glicocorticóides e mineralocorticóides; McEwen *et al.*, 1968; Gerlach e McEwen, 1975; de Kloet, 2000), os quais quando ativos contribuem para a redução da atividade do eixo HPA (Bremmer, 1999). Por outro lado, como importante alvo para os efeitos dos glicocorticóides, o hipocampo também está sujeito aos seus efeitos prejudiciais, de modo que níveis sustentados de corticóides induzem danos estruturais no hipocampo decorrentes de diminuição da arborização dendrítica, indução de apoptose e diminuição da neurogênese local (Lucassen *et al.*, 2001; Lee *et al.*, 2002; Santarelli *et al.*, 2003; Czeh e Lucassen, 2007). Tais alterações estruturais, por sua vez, poderiam prejudicar as funções desempenhadas pelo hipocampo, favorecendo o desencadeamento de alterações comportamentais e afetivas.

Durante situações de estresse, o hipocampo estaria envolvido em um sistema de detecção e resolução de conflitos do tipo “*approach-avoidance*” ou aproximação x esquiva. Quando há um conflito deste tipo, o hipocampo faria parte do sistema que calcula se a recompensa em se aproximar do alvo (entrar num lugar desconhecido em busca de alimento, por exemplo) é maior

ou menor do que os riscos que o indivíduo será submetido, e emite um sinal que aumenta o valor afetivo negativo, diminuindo a tendência à aproximação e, assim, favorecendo a preservação do indivíduo (Gray e McNaughton, 2000). Nesse contexto, alterações funcionais no hipocampo poderiam, por exemplo, favorecer a formação de associações negativas contribuindo assim para o desenvolvimento das consequências comportamentais do estresse.

Deakin e Graeff (1991) postularam a hipótese que a depressão seria causada por um desequilíbrio de receptores serotoninérgicos no hipocampo, provavelmente por uma deficiência na neurotransmissão mediada por receptores 5HT_{1A}. Segundo essa teoria, os receptores 5HT_{1A} pós-sinápticos, presentes em alta concentração na formação hipocampal (Verge *et al.*, 1986; Lundberg *et al.*, 2007), seriam responsáveis por um mecanismo de desconexão de eventos aversivos de suas consequências emocionais frente a situações de estresse repetido, por inibirem a consolidação de memórias aversivas, levando o animal a se adaptar àquela situação estressante e desempenhar normalmente suas atividades habituais. Esse sistema funcionaria então como modulador das respostas do organismo frente a eventos aversivos persistentes, permitindo sua adaptação (Graeff *et al.*, 1996). Situações de estresse incontrolável e hipercortisolemia poderiam prejudicar o funcionamento desse mecanismo e, assim, predispor ao desenvolvimento das consequências comportamentais do estresse, como o desamparo em animais e a depressão em humanos (Graeff *et al.*, 1996; Joca *et al.*, 2003a).

De fato, há evidências de que os receptores 5HT_{1A} encontram-se diminuídos no hipocampo de indivíduos com transtornos depressivos (Lopez *et al.*, 1998; Drevets *et al.*, 2000; Bhagwagar *et al.*, 2004; Lopez-Figueroa *et al.*, 2004; Hirvonen *et al.*, 2008; Savitz *et al.*, 2009). Ainda, corroborando essa hipótese, vários trabalhos indicam que os receptores 5-HT_{1A} hipocampais, os quais se co-localizam com receptores para glicocorticóides, encontram-se diminuídos em animais expostos ao estresse crônico ou a tratamento crônico com glicocorticóides (Chalmers *et al.*, 1994; Lopez *et al.*, 1998; Karten *et al.*, 1999; van Riel *et al.*, 2003 e 2004;

Flugge, 1995 e Flugge *et al.*, 1998). Além disso, em ratos da linhagem sensível de Flanders (FSL – *Flanders sensitive line*), uma linhagem de animais considerada geneticamente “*depressive-like*”, foi encontrada redução na quantidade de receptores 5HT_{1A} no hipocampo (Eriksson *et al.*, 2011). Por outro lado, o tratamento crônico com antidepressivos atenua tais efeitos (Blier *et al.*, 1987; Chaput *et al.*, 1991; Invernizzi *et al.*, 1994; Stahl, 1994; Kreiss e Lucki 1995; Lerer *et al.*, 1999; Pineyro e Blier, 1999; Riad *et al.*, 2004; Giovacchini *et al.*, 2005; Rausch *et al.*, 2006) e também parece aumentar a sensibilidade dos receptores pós-sinápticos 5HT_{1A} em estruturas límbicas como o hipocampo (Hayakawa *et al.*, 1994; Ishihara *et al.*, 1999; Szabo e Blier, 2001). Segundo Blier (Pineyro e Blier, 1999; Szabo e Blier, 2001), a latência para o aparecimento do efeito antidepressivo estaria relacionada a esse aumento da resposta mediada por receptores 5HT_{1A} pós-sinápticos em estruturas prosencefálicas como o hipocampo. Dados do nosso grupo dão sustentação ao conjunto de dados escritos acima ao demonstrar que a facilitação da neurotransmissão serotoninérgica no hipocampo dorsal, após o estresse, previne o desenvolvimento de desamparo aprendido em ratos (Joca *et al.*, 2006), um feito tipo-antidepressivo, de maneira dependente da ativação de receptores 5HT_{1A} pós sinápticos presentes nesta área (Joca *et al.*, 2003a).

Mais recentemente, tem-se discutido que outros neurotransmissores, tais como glutamato e óxido nítrico (NO), presentes na formação hipocampal também participariam da regulação dos processos emocionais mediados no hipocampo (Joca *et al.*, 2007).

1.4. NO e Depressão

Desde a descoberta do NO como neurotransmissor no sistema nervoso central (SNC; Garthwaite *et al.*, 1988), seu envolvimento em vários processos neurais fisiológicos e relacionados a transtornos psiquiátricos tem sido amplamente investigado (Calabrese *et al.*,

2007), incluindo evidências do seu envolvimento na neurobiologia da depressão (McLeod *et al.*, 2001).

O estímulo primário para a síntese de NO no SNC é o influxo de cálcio que ocorre principalmente em resposta à ativação de receptores para glutamato do tipo N-metil-D-aspartato (NMDA - Garthwaite *et al.*, 1988). O cálcio leva à ativação da isoforma neuronal da sintase de NO (nNOS) que cataliza a formação de L-citrulina e NO, a partir de L-arginina (Knowles *et al.*, 1989). O NO difunde-se rapidamente pelas células nervosas e pode agir de diversas maneiras, sendo a mais comum delas a ativação da guanilato ciclase solúvel (sGC) seu principal alvo, ou devido à interação com resíduos de cisteína ou tirosina em outras moléculas proteicas (Prast e Philippu, 2001). Como resultado, o NO pode modular a excitabilidade neuronal e também diversos sistemas neurotransmissores (Prast e Philippu, 2001).

Tem sido demonstrado por grupos independentes que a administração de antagonistas dos receptores NMDA induz efeitos do tipo antidepressivo em animais submetidos ao teste do nado forçado. Esse efeito foi observado pioneiramente com a administração de MK801 (Trullas e Skolnick, 1990; Maj *et al.*, 1992a) e ACPC (Ácido 1-aminociclopropanocarboxílico - um antagonista funcional dos receptores do tipo NMDA; Trullas e Skolnick 1990). Efeitos semelhantes foram observados também com a administração de AP7 (ácido 2-amino-7-fosfonoheptanóico - antagonista competitivo dos receptores NMDA; Trullas e Skolnick, 1990), eliprodil (um antagonista NMDA que age no sítio poliamínico do receptor; Layer *et al.*, 1995), CGP37849 (antagonista competitivo dos receptores NMDA; Maj *et al.*, 1992b) e, mais recentemente, com ketamina (antagonista NMDA não competitivo; Li *et al.*, 2010 e 2011). Além disso, Przegalinski e cols. (1997) administraram CGP 37849 e ACPC diretamente no hipocampo de ratos e observaram efeitos do tipo antidepressivo similares aos encontrados com a administração sistêmica ou local de imipramina, um antidepressivo tricíclico, indicando um provável sítio de ação no SNC para essas drogas.

Efeitos do tipo antidepressivo induzidos por antagonistas NMDA também foram descritos em trabalhos que empregaram outros testes e modelos animais utilizados para o estudo de comportamentos relacionados à depressão, como o teste de suspensão pela cauda (TST- *Tail Suspension Test*; Panconi *et al.*, 1993), o modelo de desamparo aprendido (Meloni *et al.*, 1993) e o modelo do estresse crônico variado imprevisível (CUMS – *Chronic Unpredictable Mild Stress*; Papp e Moryl, 1993; Papp e Moryl, 1994).

Em adição a esses dados, há relatos de que o tratamento repetido com antagonistas NMDA induz *down-regulation* dos receptores β -adrenérgicos corticais em roedores (Paul *et al.*, 1992; Klimek e Papp, 1994), um efeito característico observado após o tratamento crônico com drogas antidepressivas (Nimgaonkar *et al.*, 1985; Paul *et al.*, 1992). Além disso, o tratamento crônico com drogas antidepressivas reduz a expressão de receptores NMDA em várias estruturas encefálicas, em particular no córtex pré-frontal e no hipocampo (Sanacora *et al.*, 2008). Assim, em conjunto, esses dados indicam que a redução da neurotransmissão mediada por receptores NMDA para glutamato em estruturas límbicas estaria envolvida com o aparecimento de efeitos do tipo antidepressivo. Em outras palavras, o aumento da neurotransmissão mediada por glutamato parece favorecer o desenvolvimento de conseqüências comportamentais do estresse em animais e, possivelmente, a depressão em humanos (Sanacora *et al.*, 2008).

Considerando que a principal via de formação do NO no SNC ocorre via ativação de receptores NMDA, os trabalhos supracitados levaram à formulação da hipótese de que o NO poderia estar envolvido no desenvolvimento das conseqüências comportamentais induzidas pelo estresse. Essa hipótese ganhou sustentação ao se demonstrar que a inibição da síntese de NO através da administração sistêmica de inibidores não seletivos da NOS também induz efeito tipo antidepressivo em roedores submetidos ao teste do nado forçado (Jefferys e Funder, 1996; Yildiz *et al.*, 2000; Heiberg *et al.*, 2002; Harvey *et al.*, 2010). Mais recentemente, outros modelos animais foram empregados, como o desamparo aprendido (Stanquini *et al.*, 2008), o estresse crônico variado imprevisível (Zhang *et al.*, 2008) e outros tipos de estresse (Khovryakov *et al.*,

2010), onde o tratamento com inibidores da NOS induziu efeitos do tipo antidepressivo, reforçando a idéia da participação do NO na neurobiologia da depressão.

Corroborando esses dados, foi relatado aumento da expressão da nNOS no hipocampo de humanos deprimidos (Oliveira *et al.*, 2008), além de níveis séricos de nitratos elevados (Suzuki *et al.*, 2001), o que pode ser um indicativo de aumento de produção de NO nesses pacientes. Além disso, a inibição da via NOS/sGC com azul de metileno promoveu significativa melhora do humor em pacientes deprimidos (Naylor *et al.*, 1987).

Embora ainda não sejam bem conhecidos os aspectos moleculares e neuroquímicos envolvidos no efeito antidepressivo induzido pelos inibidores da NOS, evidências recentes sugerem um provável envolvimento do sistema serotoninérgico. Nesse sentido, foi demonstrado que os efeitos comportamentais do tipo antidepressivo induzido pelos inibidores da NOS são dependentes de serotonina endógena, uma vez que a inibição da síntese de serotonina bloqueou os efeitos do tipo antidepressivo induzido pelo tratamento sistêmico com essas drogas (Harkin *et al.*, 2003). Em outro trabalho do mesmo grupo (Harkin *et al.*, 2004), foi demonstrado que a administração de doses subefetivas de inibidores da NOS potencializou o efeito antidepressivo de inibidores seletivos de recaptação de serotonina, mas não o efeito de drogas inibidoras seletivas de recaptação de noradrenalina. Mais recentemente, Gigliucci e cols. (2010) demonstraram que a administração concomitante de um antagonista serotoninérgico não seletivo atenuou o efeito do tipo antidepressivo induzido pela administração sistêmica de um inibidor da NOS em animais submetidos ao teste do nado forçado. Assim, o conjunto de dados sugere que os efeitos do tipo antidepressivo induzidos pelos inibidores da NOS administrados sistemicamente envolvam uma facilitação da neurotransmissão serotoninérgica no SNC.

Contudo, pouco se sabe a respeito das estruturas encefálicas envolvidas em tais efeitos. Dados da literatura apontam para um provável envolvimento da formação hipocampal, uma vez que a administração intra-hipocampo dorsal de antagonista NMDA (Padovan e Guimarães, 2004) ou de inibidor da NOS (Joca e Guimarães, 2006) induz efeito tipo-antidepressivo em animais submetidos ao teste do nado forçado.

Wegener e seu grupo de pesquisa demonstraram que NO endógeno diminui os níveis de serotonina no hipocampo (Wegener *et al.*, 2000), e também que a administração de antidepressivos serotoninérgicos diretamente no hipocampo de ratos diminui a atividade da enzima NOS (Wegener *et al.*, 2003), indicando assim possíveis interações entre as vias nitrérgica e serotoninérgica nessa estrutura cerebral.

Portanto, considerando que o efeito antidepressivo induzido pela administração sistêmica de inibidores da NOS depende de serotonina (Harkin *et al.*, 2003) e que a administração intra-hipocampal de drogas que facilitam a neurotransmissão mediada pela serotonina (Joca *et al.*, 2003) ou diminuem NO (Joca e Guimaraes, 2006) induz efeitos do tipo antidepressivo em animais submetidos ao teste do nado forçado, pode ser sugerido que esse último efeito dependeria dos níveis de serotonina no hipocampo. Ainda, considerando que o aumento de serotonina no hipocampo promove efeitos antidepressivos por meio da ativação de receptores 5-HT_{1A}, deveríamos esperar que o efeito antidepressivo obtido com a administração intra-hipocampal de inibidor da nNOS fosse atenuado pelo pré-tratamento com antagonista de receptores serotoninérgicos, especialmente do tipo 5-HT_{1A}.

1.5. Hipótese

Os dados levantados anteriormente nos levaram à hipótese de que o aumento de NO no hipocampo facilitaria o desenvolvimento das conseqüências comportamentais do estresse por prejudicar a neurotransmissão serotoninérgica local e, conseqüentemente, a ativação de receptores 5-HT_{1A}. Ou seja, o efeito do tipo antidepressivo induzido pela administração de inibidores de NOS no hipocampo dorsal em ratos envolveria o aumento local das concentrações de serotonina e, subseqüentemente, a ativação de receptores 5HT_{1A} nessa estrutura.

OBJETIVOS

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo geral

Testar a hipótese de que o efeito do tipo antidepressivo induzido pela administração de inibidores de NOS no hipocampo dorsal em ratos seriam dependentes do aumento de serotonina e da subsequente ativação dos receptores serotoninérgicos do tipo 5HT_{1A} nessa região encefálica.

2.2. Objetivos específicos

- i. Avaliar se a inibição da nNOS no hipocampo dorsal, através da administração local de inibidor seletivo de nNOS (NPA), induziria efeito tipo antidepressivo em ratos submetidos ao teste do nado forçado.
- ii. Avaliar se a inibição da recaptação de serotonina no hipocampo dorsal, através da administração local de fluoxetina induziria efeito tipo antidepressivo em ratos submetidos ao teste do nado forçado.
- iii. Avaliar se o pré-tratamento com antagonista seletivo de receptores 5-HT_{1A} (WAY100635) bloquearia os efeitos induzidos pela administração intra-hipocampal de fluoxetina.
- iv. Avaliar se o pré-tratamento com antagonista seletivo de receptores 5-HT_{1A} (WAY100635) bloquearia os efeitos induzidos pela administração intra-hipocampal de NPA.

MATERIAL E MÉTODOS

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Animais

Foram utilizados ratos Wistar (200 a 220 gramas no momento da cirurgia), provenientes do Biotério Central do Campus da USP-RP, os quais foram mantidos aos pares em gaiolas de acrílico (570 cm²) no biotério do Laboratório de Farmacologia da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto-USP, em condições controladas: temperatura (25 ± 1 °C), ciclo de luz (acesas das 6:00 às 18:00 horas), alimento e água *ad libitum*. Os experimentos realizados foram aprovados pelo comitê de ética local (protocolo No. 08.1.1133.53.4) e todos os esforços possíveis para minimizar o sofrimento dos animais foram realizados.

3.2. Drogas

Foram utilizadas as seguintes drogas:

- N^ω-propil-L-arginina, NPA (Tocris): inibidor seletivo de NOS neuronal (nNOS), solubilizado em salina isotônica estéril e administrado através de injeção intra-hipocampal bilateral nas doses de 10⁻⁵, 10⁻⁴ e 10⁻² nmol/0.5 µL/lado, de acordo com dados prévios do laboratório.

- WAY100635 – Antagonista 5HT_{1A} seletivo, solubilizado em salina isotônica estéril e administrado através de injeção intra-hipocampal bilateral nas doses de 1, 3, 10 nmol/0.5 µL/lado (Joca *et al.*, 2003a).

- Fluoxetina – Inibidor seletivo de recaptação de serotonina, solubilizado em salina isotônica estéril e administrado através de injeção intra-hipocampal bilateral nas doses de 1, 3 e 10 nmol/0,5µL, a fim de encontrar uma dose efetiva e uma dose sub-efetiva da droga.

Além disso, foram utilizados durante os procedimentos cirúrgicos: cetamina 10%/xilasina 2% (0,1 mL/100g); Banamine (Schering-Plough, 0,25%, 0,1 mL/100g), Lidocaína (PROBEM 3%, 0,2 ml); e pentabiótico veterinário, (Fort Dodge, 1.200.000 UI Benzilpenicilina benzatina 600.000 UI, Benzilpenicilina procaína 300.000 UI, Benzilpenicilina potássica 300.000 UI, Diidroestreptomicina base (sulfato) 250 mg e Estreptomicina base (sulfato) 250 mg), 0,1ml/100g).

3.3. Procedimentos

3.3.1. Cirurgia estereotáxica e administração intracerebral de drogas

Os ratos foram anestesiados com cetamina 10%/xilasina 2% (i.p., 1:1) na dose de 0,1ml/100g e fixados na armação estereotáxica (Stoelting). Cânulas-guia (0.7 mm OD) de aço inoxidável foram implantadas bilateralmente e direcionadas para o hipocampo dorsal (coordenadas: ântero-posterior: -4,0 mm de lambda, lateral: 2,8 mm, dorsoventral:- 2,1 mm), de acordo com o atlas de Paxinos e Watson (1997). A ponta da cânula permaneceu 1,5 mm acima do local da injeção e as cânulas prenderam-se ao osso do crânio por parafusos de aço e cimento acrílico. Um mandril foi colocado em cada cânula guia para evitar sua obstrução. Após os procedimentos cirúrgicos, os animais receberam administração de pentabiótico veterinário (i.m., 0,1mL/100g) e do antiinflamatório Banamine (s.c. 0,1mL/100g), com o objetivo de evitar quadros infecciosos e reduzir a dor pós-operatória.

Ao final da cirurgia, os animais foram acondicionados em uma gaiola com aquecimento, onde permaneceram sob observação por 30 minutos. Após esse período, os animais retornaram as suas gaiolas, onde permaneceram em repouso por 5-7 dias. Após esse período, foram realizados os experimentos comportamentais e as injeções intra-hipocampais,

as quais foram administradas com por meio de agulhas dentarias (0.3mm OD) introduzidas bilateralmente através da cânula guia (1.5mm abaixo do fim da cânula). Foi administrado um volume de 0.5 μ L/lado, durante 1 minuto, usando uma microseringa controlada por uma bomba de infusão (Insight, BR).

3.3.2. Análise Histológica dos sítios de administração de drogas

Ao término dos experimentos comportamentais, os ratos foram anestesiados com hidrato de cloral e perfundidos com salina isotônica seguida por solução de formalina 10%. Após a perfusão, uma agulha dentaria foi inserida na cânula guia para administração de 0.2 μ l do corante azul de Evans, bilateralmente. Os cérebros foram removidos e imersos em solução de formalina 10%, a fim de serem posteriormente (no mínimo 5 dias) seccionados em criostato (Cryocut 1800, -18°C) numa espessura de 40 μ m. Os sítios das injeções foram registrados em diagramas do Atlas de Paxinos e Watson (1997), sendo desconsiderados da análise estatística os dados dos animais cujo local da injeção se encontraram fora do hipocampo dorsal.

3.3.3. Teste do nado forçado

O teste do nado forçado é um teste que foi desenvolvido por Roger D. Porsolt e seu grupo (Porsolt *et al.*, 1977; Porsolt *et al.*, 1978) e que consiste em colocar individualmente os animais bem um cilindro de acrílico (30 cm de diâmetro, 40 cm de altura, contendo 25 cm de água a 24 \pm 1 °C, modificado por Joca e Guimarães, 2006) por 15 minutos (sessão de pré-teste). Vinte e quatro horas depois, os animais são submetidos a uma sessão de 5 minutos de nado forçado (sessão de teste). Durante essa sessão, é registrado o total do tempo em que o

animal permanece imóvel, bem como o tempo de latência do primeiro episódio de imobilidade. O animal é considerado imóvel quando permanece parado, realizando apenas movimentos suficientes para manter-se sob flutuação. A água é trocada após cada teste, para evitar a interferência do que Abel e Bilitzke (1990) chamaram de substâncias de alarme. Essas substâncias seriam liberadas pelos animais frente a situações aversivas (como o nado forçado) e seriam detectadas por outros animais que mais tarde fossem postos nessa mesma água, interferindo no comportamento do animal.

3.3.4. Desenho Experimental

Experimento 1: Efeitos da administração intra-hipocampal de NPA sobre o comportamento de animais submetidos ao teste do nado forçado.

Os ratos foram submetidos à cirurgia estereotáxica e, cinco a sete dias depois, foi realizado o pré-teste. Imediatamente após o pré-teste, os animais receberam uma administração bilateral intra-hipocampo dorsal de NPA (10^{-5} , 10^{-4} ou 10^{-2} nmol/0,5µL), ou de veículo (0.5 µL/lado), sendo submetidos ao teste vinte e quatro horas depois. Após o término do teste, os animais foram perfundidos e seus encéfalos removidos para posterior análise dos sítios de injeção.

Experimento 2: Efeitos da administração intra-hipocampal de fluoxetina sobre o comportamento de animais submetidos ao teste do nado forçado.

Os ratos foram submetidos à cirurgia estereotáxica e, cinco a sete dias depois, foi realizado o pré-teste. Imediatamente após o pré-teste, os animais receberam uma administração bilateral intra-hipocampo dorsal de fluoxetina (1, 3 e 10nmol/0.5 µL/lado) ou veículo (0.5 µL/lado), sendo submetidos ao teste vinte e quatro horas depois. Após o teste, os animais foram perfundidos e seus encéfalos removidos para posterior análise dos sítios de injeção.

Experimento 3: Efeitos da administração intra-hipocampal de WAY100635 sobre o comportamento de animais submetidos ao teste do nado forçado.

Este experimento foi realizado para avaliar se o WAY100635 por si só não induziria efeitos comportamentais em animais submetidos ao teste do nado forçado. Os ratos foram submetidos à cirurgia estereotáxica e, cinco a sete dias depois, foi realizado o pré-teste. Imediatamente após o pré-teste os animais receberam uma administração bilateral intra-hipocampo dorsal de WAY100635 (1, 3 e 10 nmol/0.5 µL/lado) ou veículo (0.5 µL/lado), sendo submetidos ao teste vinte e quatro horas depois. Após o teste, os animais foram perfundidos e seus encéfalos removidos para posterior análise dos sítios de injeção.

Experimento 4: Efeitos da pré-administração de WAY100635 sobre os efeitos induzidos pela administração intra-hipocampal de fluoxetina.

Com o intuito escolher uma dose de WAY100635 que fosse capaz de bloquear os efeitos mediados por receptores 5-HT_{1A}, fizemos uso de três doses para verificar qual delas bloquearia os efeitos comportamentais induzidos pela administração local de fluoxetina, para assim, determinar a dose que seria usada no experimento subsequente. Sendo assim, os ratos foram submetidos à cirurgia estereotáxica e, cinco a sete dias depois, foi realizado o pré-teste. Imediatamente após o pré-teste os animais receberam uma administração bilateral intra-hipocampo dorsal de veículo (0,5 µL/lado) ou WAY100635 (1, 3 ou 10 nmol/0,5µL/lado), seguida de uma administração de veículo (0,5 µL/lado) ou fluoxetina (na dose de 10 nmol/0,5µL/lado), cinco minutos depois. Vinte e quatro horas depois, os animais foram submetidos ao teste do nado forçado. Após o teste, os animais foram perfundidos e seus encéfalos removidos para posterior análise dos sítios de injeção.

Experimento 5: Efeitos da pré-administração de WAY100635 sobre os efeitos induzidos pela administração intra-hipocampal de NPA.

Os ratos foram submetidos à cirurgia estereotáxica e, cinco a sete dias depois, ao pré-teste. Imediatamente após o pré-teste os animais receberam uma administração bilateral intra-hipocampo dorsal de veículo (0,5 µL/lado) ou WAY100635 (10 nmol/0,5µL/lado), seguida de uma administração de veículo (0,5 µL/lado) ou de NPA (dose de 0,0001 nmol/0,5µL/lado). Vinte e quatro horas depois, os animais foram submetidos ao teste do nado forçado. Após o teste os animais foram perfundidos e seus encéfalos removidos para posterior análise dos sítios de injeção.

3.4. Análise Estatística

O efeito dos diferentes tratamentos sobre o tempo total de imobilidade foi comparado utilizando ANOVA de uma via seguida do pós-teste de Dunnett.

Diferenças com $p < 0.05$ foram consideradas significativas.

RESULTADOS

4. RESULTADOS

A Figura 1 mostra representativamente os locais de administração intra-hipocampo dorsal das drogas utilizadas neste trabalho.

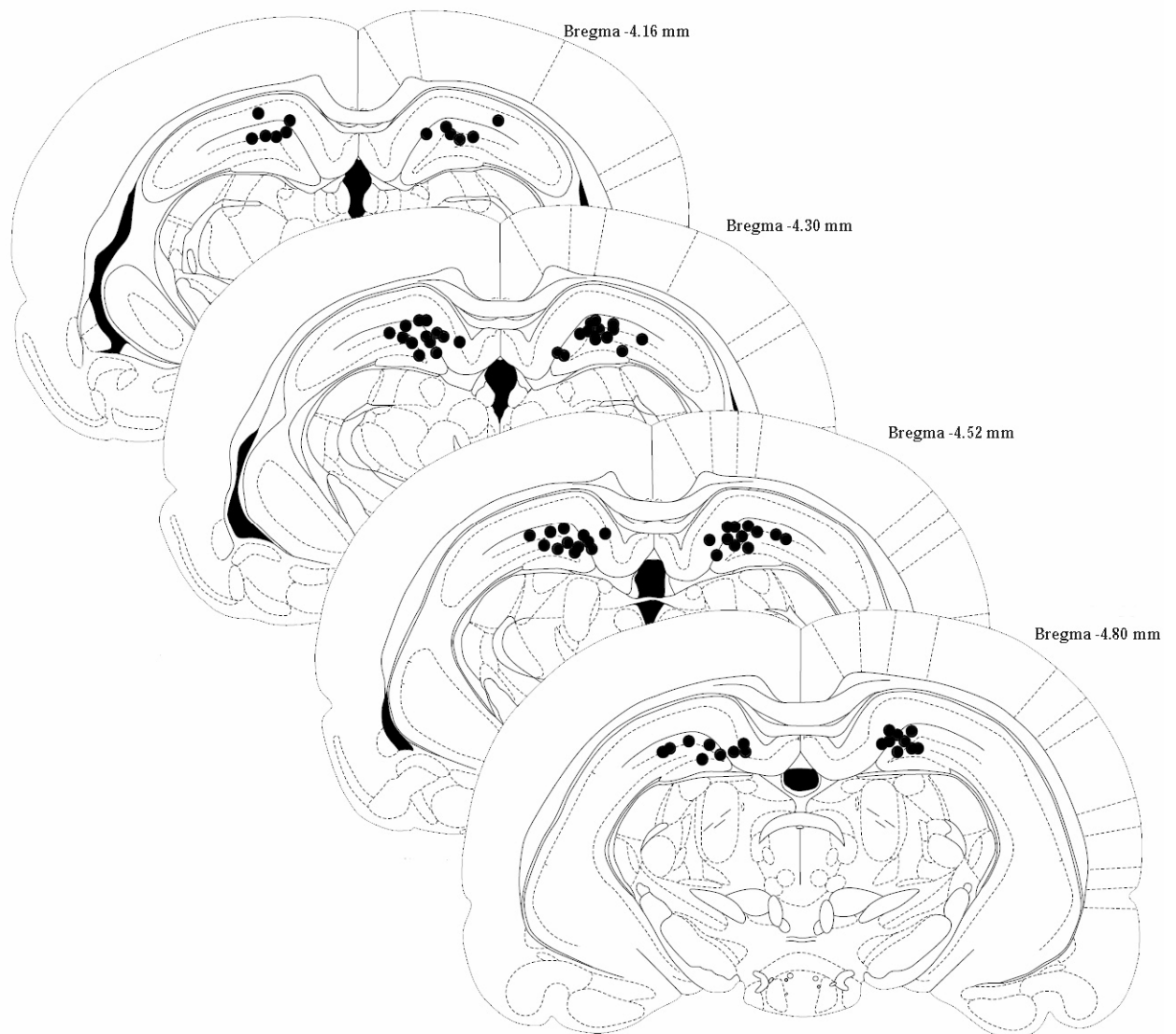


Fig. 01. Diagramas representativos de sítios de administração de drogas no hipocampo dorsal (Diagramas modificados de Paxinos e Watson, 1997).

4.1. Efeitos da administração intra-hipocampo dorsal de NPA em ratos submetidos ao teste do nado forçado

A administração bilateral de NPA no hipocampo dorsal induziu uma diminuição significativa do tempo de imobilidade de ratos submetidos ao teste do nado forçado nas doses de 10^{-5} , 10^{-4} e 10^{-2} nmol/0,5 μ L (ANOVA de uma via $F_{3,21}=5,063$; $p=0,0086$, pós teste de Dunnett; $p<0,05$, Fig. 02).

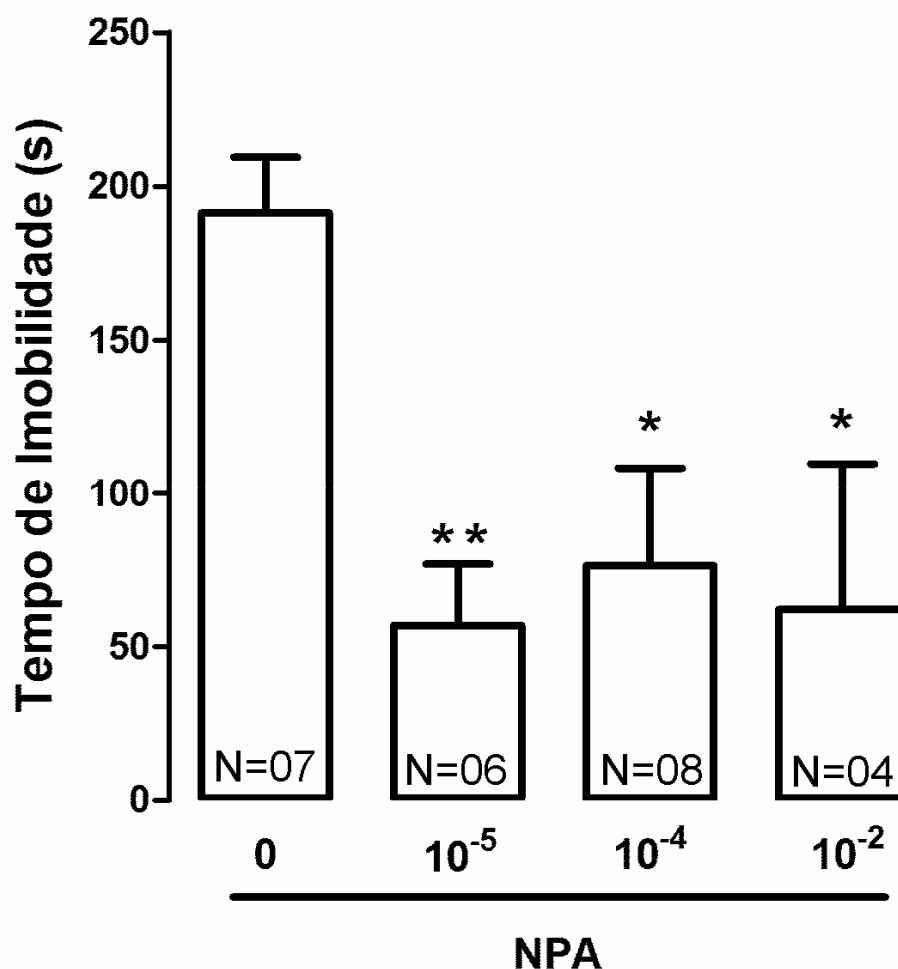


Fig. 02. Administração intra-hipocampal de NPA induz efeitos do tipo antidepressivo em ratos submetidos ao teste do nado forçado. Ratos foram submetidos ao pré-teste e receberam administrações intra-hipocampais de NPA (doses de 10^{-5} , 10^{-4} e 10^{-2} nmol/0,5 μ L) ou veículo (0,5 μ L). O tempo de imobilidade foi registrado 24h depois. Dados representam média+EPM, * indica $p<0,05$, e ** indica $p<0,01$, comparado ao grupo controle. NPA - N^o-Propil-L-arginina.

4.2. Efeitos da administração intra-hipocampo dorsal de fluoxetina em ratos submetidos ao teste do nado forçado

A administração bilateral de fluoxetina no hipocampo dorsal promoveu uma diminuição no tempo de imobilidade de ratos submetidos ao teste do nado forçado, a qual foi significativa na dose de 10 nmol/0,5 μ L (ANOVA de uma via $F_{3,29}=3,093$; $p=0,424$, pós teste de Dunnett, $p<0,05$), mas não nas doses de 1 e 3 nmol/0,5 μ L (pós teste de Dunnett, $p>0,05$, Fig. 03).

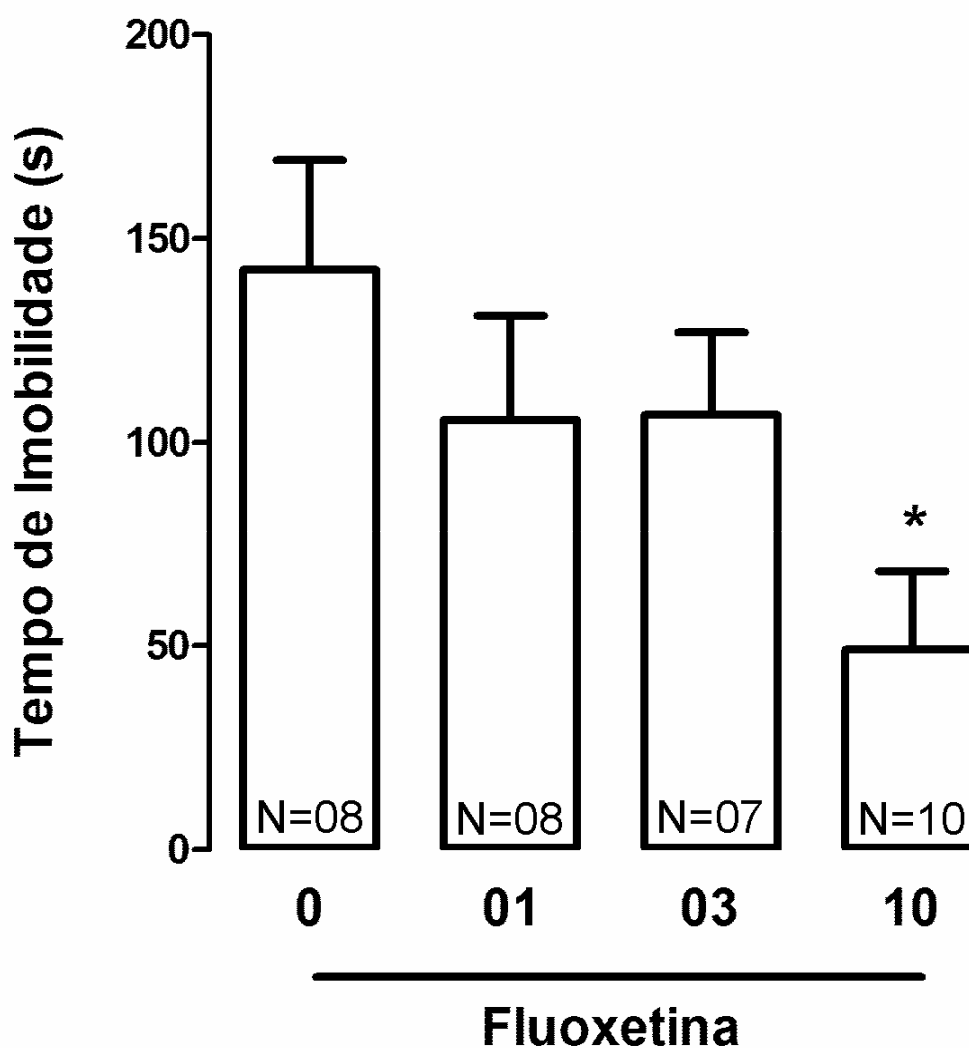


Fig. 03. Administração intra-hipocampal de fluoxetina induz efeitos do tipo antidepressivo em ratos submetidos ao teste do nado forçado. Ratos foram submetidos ao pré-teste e receberam administrações intra-hipocampais de fluoxetina (1, 3 e 10 nmol/0,5 μ L) ou veículo (0,5 μ L). Dados representam média+EPM, * indica $p<0,05$, comparado ao grupo controle.

4.3. Efeitos da administração intra-hipocampo dorsal de WAY100635 em ratos submetidos ao teste do nado forçado

A administração bilateral de WAY100635 não induziu a efeitos significativos por si só em relação ao grupo que recebeu administração de veículo (ANOVA de uma via $F_{3,26}:0,05979$; $p=0,484$; pós teste de Dunnett, $p>0,05$; Fig. 04).

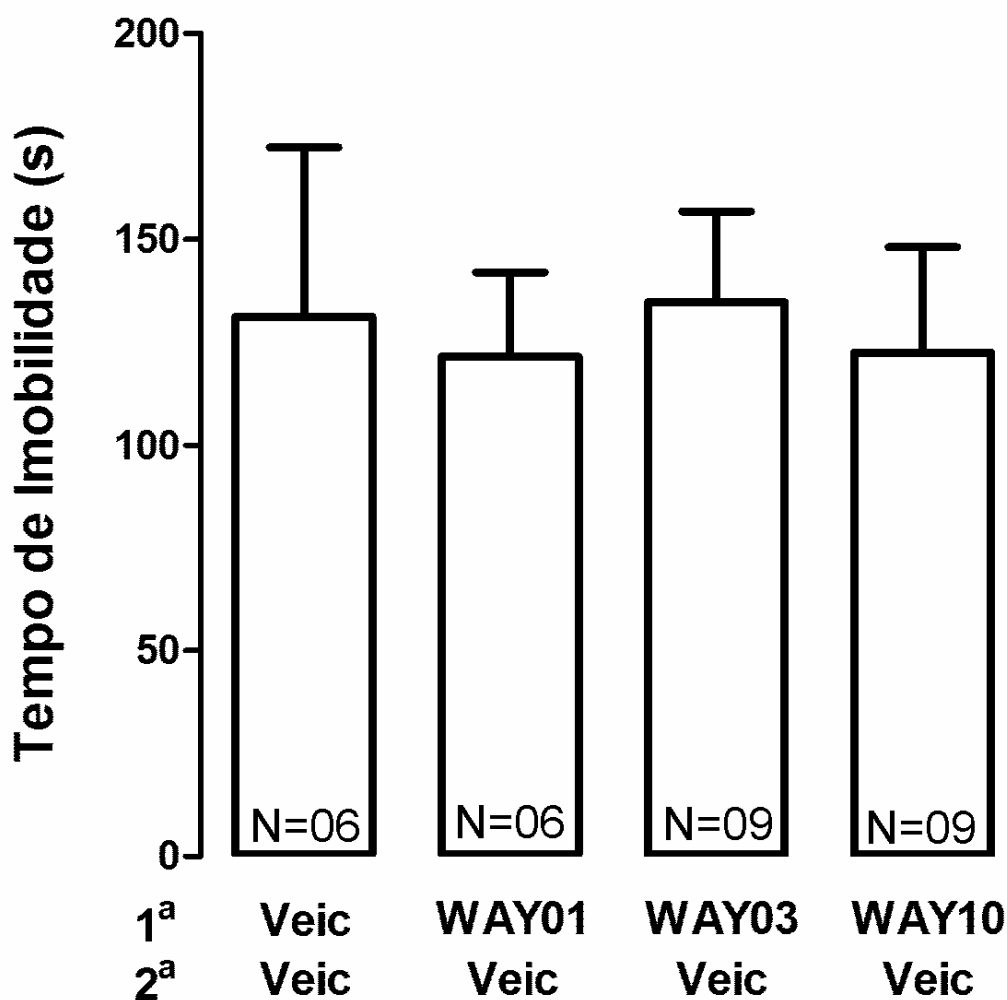


Fig. 04. Administração intra-hipocampal de WAY100635 não altera o comportamento de ratos submetidos ao teste do nado forçado. Ratos foram submetidos ao pré-teste e receberam administrações intra-hipocampais logo após o pré-teste de WAY100635 (1, 3 e 10 nmol/0,5µL) ou veículo (0,5µL). Dados representam média+EPM. (ANOVA de uma via, $p>0,05$).

4.4. Efeitos da pré-administração de WAY100635 nos efeitos comportamentais induzidos pela administração de fluoxetina

A pré-administração de WAY100635 foi capaz de bloquear os efeitos comportamentais induzidos pela administração de fluoxetina (10 nmol/0,5 μ L) no hipocampo dorsal de animais submetidos ao teste do nado forçado. Esse efeito foi observado utilizando-se a dose de 10 nmol/0,5 μ L (ANOVA de uma via $F_{4,34}=4,910$; $p=0,031$, pós teste de Dunnett, $p>0,05$), mas não nas doses de 1 e 3 nmol/0,5 μ L (pós teste de Dunnett, $p<0,05$, Fig. 05).

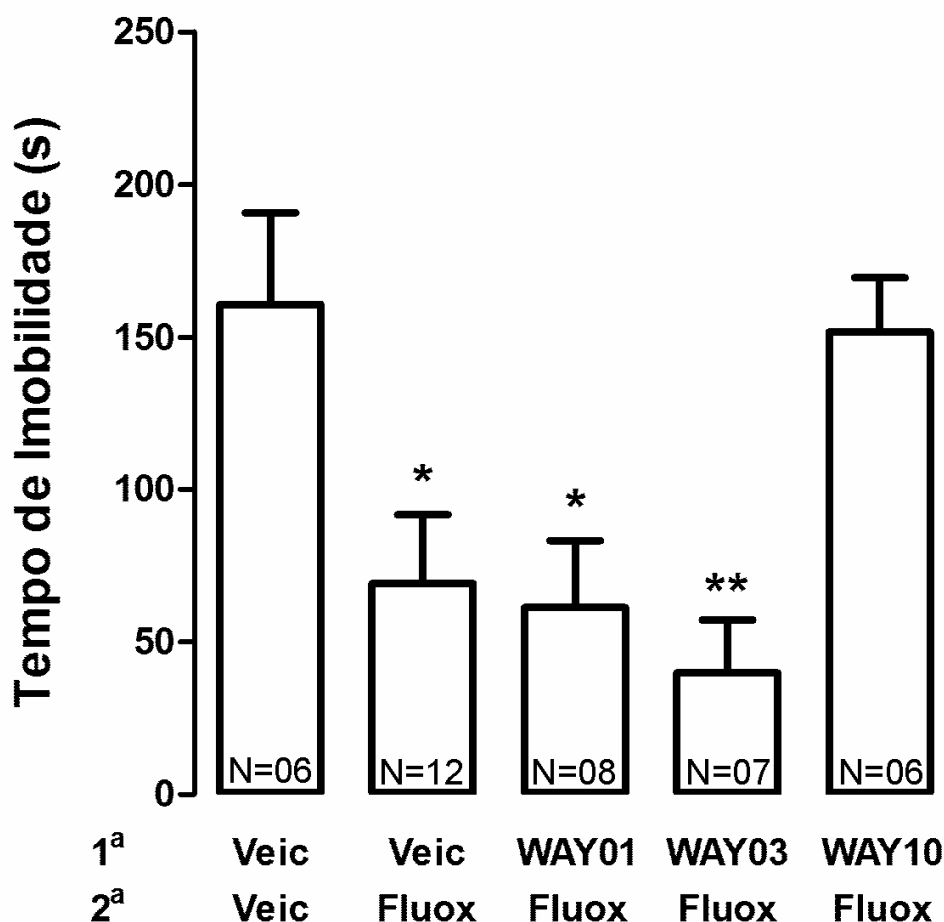


Fig. 05. Pré-administração de WAY100635 bloqueia os efeitos induzidos pela fluoxetina em ratos submetidos ao teste do nado forçado. Ratos foram submetidos ao pré-teste e receberam administrações intra-hipocâmpais de WAY100635 (1, 3 e 10 nmol/0.5 μ L) ou veículo (0.5 μ L), e cinco minutos depois receberam também administrações intra-hipocâmpais de fluoxetina (10 nmol/0.5 μ L) ou veículo (0.5 μ L). Os dados representam a média+EPM. * indica $p<0.05$ e ** indica $p<0.01$, em relação ao grupo controle.

4.5. Efeitos da pré-administração de WAY100635 nos efeitos comportamentais induzidos pela administração de NPA

A pré-administração de WAY100635 (10 nmol/0,5 μ L) bloqueou os efeitos comportamentais induzidos pela administração de NPA (dose 10^{-4} nmol/0,5 μ L) no hipocampo dorsal de animais submetidos ao teste do nado forçado (ANOVA de uma via $F_{2,25}=5,506$; $p=0,0104$; pós teste de Dunnett: $p<0,05$ para o grupo NPA e $p>0,05$ para o grupo NPA + WAY100635; Fig. 06).

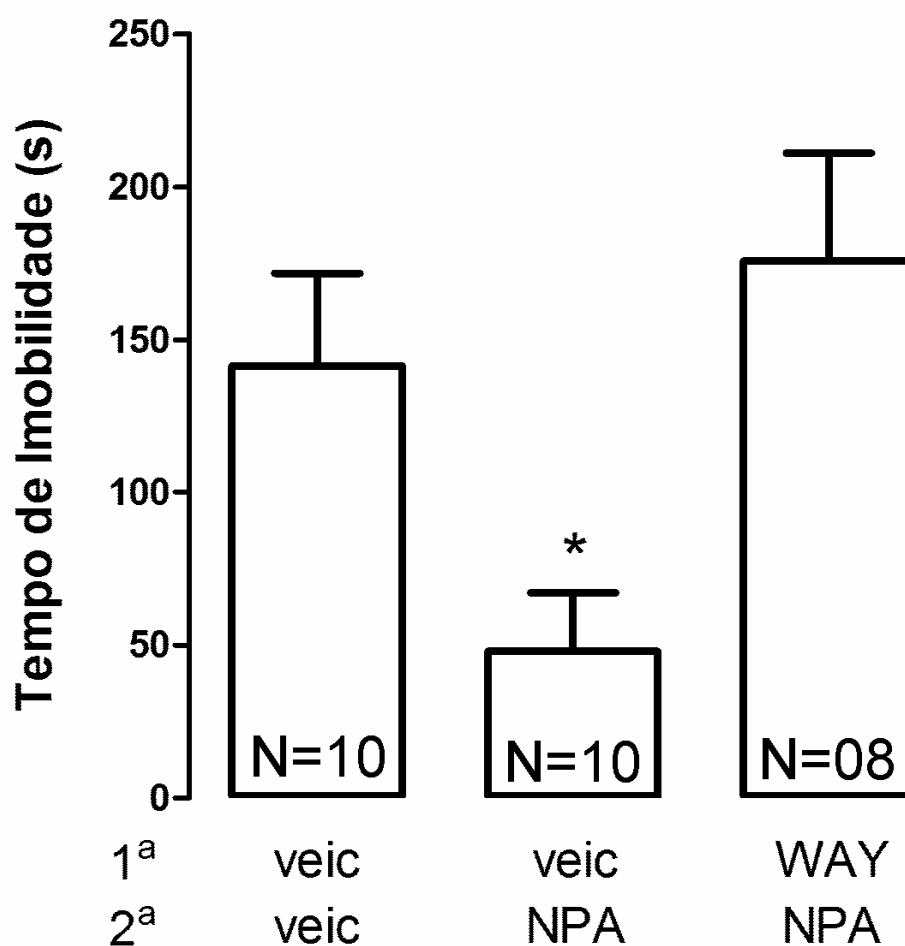


Fig. 06. Pré-administração de WAY100635 bloqueia os efeitos do NPA em ratos submetidos ao teste do nado forçado. Ratos foram submetidos ao pré-teste e receberam administrações intra-hipocampais logo após o pré-teste de WAY100635 (10 nmol/0.5 μ L) ou veículo (0.5 μ L), e cinco minutos depois recebem também administrações intra-hipocampais de NPA (10^{-4} nmol/0.5 μ L) ou veículo (0.5 μ L). Os dados representam a média+EPM. * indica $p<0,05$, em comparação ao grupo controle.

DISCUSSÃO

5. DISCUSSÃO

O presente estudo demonstrou que a administração intra-hipocampo dorsal de NPA, um inibidor seletivo da nNOS, induz efeito do tipo antidepressivo em animais submetidos ao teste do nado forçado e que o pré-tratamento com um inibidor seletivo de receptores 5HT_{1A}, WAY100635, bloqueou esse efeito, da mesma maneira que bloqueou o efeito antidepressivo induzido pela fluoxetina. Portanto, os resultados sugerem que o efeito do NPA envolve mudanças na neurotransmissão serotoninérgica local e subsequente ativação de receptores 5-HT_{1A}.

O teste do nado forçado é um teste com uma ampla utilização e alta preditividade de efeito antidepressivo (Willner, 1990). Este teste é baseado na observação de que roedores expostos a uma situação de nado forçado apresentam um comportamento orientado por alguns minutos e, em seguida, assumem uma postura de imobilidade (Porsolt *et al.*, 1977; Porsolt *et al.*, 1978; Cryan *et al.*, 2002). O tempo que o animal assume essa postura no segundo dia de teste, um dia após a primeira exposição, é diminuído pelo tratamento com uma grande variedade de fármacos (Willner, 1984; 1990). Apesar de ser possível distinguir nitidamente drogas antidepressivas de drogas antipsicóticas e ansiolíticas em animais submetidos ao teste do nado forçado (Porsolt *et al.*, 1977), psicoestimulantes podem induzir efeito falso positivo, diminuindo o tempo de imobilidade por estimular a atividade locomotora do animal. Uma vez que as administrações realizadas nos protocolos experimentais deste trabalho foram realizadas logo após o pré-teste, isto é, 24 horas antes do teste quando é feita a mensuração do tempo de imobilidade, efeitos psicoestimulantes induzidos pelos tratamentos realizados são muito pouco prováveis.

Nossos resultados demonstram que a administração de NPA no hipocampo dorsal de ratos induz a um efeito do tipo antidepressivo. Este resultado corrobora dados oriundos de estudos anteriores que demonstraram que a inibição da NOS pela administração sistêmica de 7-NI, um inibidor preferencial da nNOS, é capaz de reduzir o tempo de imobilidade em animais submetidos

ao teste do nado forçado (Joca e Guimarães, 2006). No entanto, além da nNOS, a iNOS também parece regular a produção de NO que ocorre após exposição a situações de estresse, principalmente de estresse crônico, uma vez que a administração intra-hipocampal de um inibidor preferencial da iNOS, a aminoguanidina, também induz um efeito do tipo antidepressivo em animais submetidos ao modelo do estresse crônico variado (Wang *et al.*, 2008).

Portanto, no presente trabalho utilizamos um inibidor mais seletivo para nNOS, o NPA (o K_i do NPLA para nNOS, iNOS e eNOS é 57, $1,8 \times 10^5$ e 8500 nM, respectivamente Zhang *et al.*, 1997), e possibilitar a investigação de que se os efeitos observados por Joca e Guimarães (2006) seriam realmente devidos à inibição da nNOS. Além disso, dados do nosso laboratório demonstraram que a administração de um inibidor seletivo para iNOS, o 1400W, em dose necessária para inibir a mesma proporção de iNOS que o NPA inibe nas doses utilizadas nesse estudo, não promoveu efeitos significativos em animais submetidos ao teste do nado forçado (Sales *et al.*, 2011). Portanto, em conjunto, esses dados sugerem que a inibição da nNOS imediatamente após o estresse seria a responsável pelo efeito tipo-antidepressivo observado em ratos com a administração de NPA.

O efeito do tipo antidepressivo induzido pela inibição da NOS também já foi demonstrado em outros modelos animais utilizados para estudo de comportamentos relacionados à depressão, como o desamparo aprendido (Joca *et al.*, 2008), o CUMS (Mutlu *et al.*, 2009) e o estresse de restrição agudo e crônico (Sevgi *et al.*, 2006). Portanto, nossos resultados suportam essa idéia de que o hipocampo, especialmente sua porção dorsal, seria uma área importante para os efeitos do tipo antidepressivo observados com a administração sistêmica dos inibidores da NOS.

Isso poderia ocorrer porque os inibidores da NOS impediriam o aumento de NO induzido pelo estresse que acontece no hipocampo durante esses eventos. De fato, diversos tipos de estresse podem levar ao aumento de expressão da nNOS no hipocampo, como o teste

do nado forçado (Keser et al., 2011), choques nas patas (Wegener *et al.*, 2010) e CUMS (Zhou *et al.*, 2007). Harvey e cols. demonstraram, em ratos, que a exposição repetida a situações de estresse inescapável leva a aumento da atividade da NOS no hipocampo de ratos (Harvey *et al.*, 2004) e a níveis aumentados de espécies reativas de nitrogênio (NO_x) nesta estrutura (Harvey *et al.*, 2005).

Os mecanismos envolvidos nos efeitos comportamentais induzidos pelo aumento de NO no hipocampo ainda não estão muito bem esclarecidos. Evidências apontam para um possível envolvimento da neurotransmissão serotoninérgica, uma vez o NO endógeno parece diminuir os níveis de serotonina no hipocampo (Wegener *et al.*, 2000), enquanto a administração de L-arginina, o precursor do NO, leva a uma atenuação dos efeitos do tipo antidepressivo induzidos pela sertralina, um ISRS, em camundongos submetidos ao teste do nado forçado (Inan *et al.*, 2004). Além disso, a inibição da síntese de serotonina pela administração de p-clorofenilalanina (PCPA, um inibidor da triptofano hidroxilase) é capaz de bloquear os efeitos do tipo antidepressivo induzidos pelos inibidores da NOS, indicando que estes efeitos sejam dependentes dos níveis serotonina endógena (Harkin *et al.*, 2003). Ainda nesse sentido, foi demonstrado que a administração de doses subefetivas de inibidores da NOS potencializa os efeitos do tipo antidepressivo em animais submetidos ao teste do nado forçado induzidos pela administração de drogas antidepressivas serotoninérgicas (Harkin *et al.*, 2004; Gigliucci *et al.*, 2010) e que a administração concomitante de metergolina, um antagonista não seletivo dos receptores serotoninérgicos, atenua os efeitos do tipo antidepressivo induzidos por inibidor da NOS em animais submetidos ao teste do nado forçado. Tais evidências, portanto, sugerem que a inibição da nNOS promoveria aumento dos níveis de serotonina, o que seria responsável pelo efeito tipo-antidepressivo induzido pelos inibidores da NOS.

Nossos resultados corroboram essa hipótese, pois foi observado que: (1) A facilitação da neurotransmissão serotoninérgica local através da administração de fluoxetina foi capaz de

causar efeitos do tipo antidepressivo em ratos submetidos ao teste do nado forçado (experimento 02); (2) que a inibição da síntese de NO induziu efeito semelhante à fluoxetina (experimento 01); (3) e que ambos os efeitos foram prevenidos pelo pré-tratamento com antagonista de receptor serotoninérgico do tipo 1A (experimentos 04 e 05). Assim, usando a mesma dose de WAY100635 que foi capaz de bloquear os efeitos da fluoxetina, nós mostramos que o efeito do tipo antidepressivo induzido pela administração de NPA também foi bloqueado, sugerindo, portanto, que os efeitos do tipo antidepressivo induzidos pela inibição da nNOS envolveriam desinibição da neurotransmissão serotoninérgica, com conseqüente aumento dos níveis locais de serotonina e ativação de receptores 5-HT_{1A}.

Diversas evidências apontam para a possibilidade de que o NO possa interferir na neurotransmissão serotoninérgica. Primeiro, estudos de imunohistoquímica indicam que há co-localização da NOS e de serotonina em projeções dos núcleos dorsal (DRN) e mediano (MRN) da rafe e outros núcleos encefálicos (Johnson e Ma, 1993; Dun *et al.*, 1994; Wotherspoon *et al.*, 1994; Maqbool *et al.*, 1995; Wang *et al.*, 1995; Leger *et al.*, 1998). Há neurônios positivos para imunomarcção para NOS e/ou para NADPH-d em muitas das estruturas que recebem fibras oriundas dos núcleos da rafe, e, portanto, recebem inervação serotoninérgica, como a amígdala (Ellison *et al.*, 1987; Mizukawa *et al.*, 1988; Leigh *et al.*, 1990; Sims e Williams, 1990; Pitkanen e Amaral, 1991; Brady *et al.*, 1992; Vincent e Kimura, 1992), a substância cinzenta periaquedutal (PAG – *periaqueductal grey matter*; Leigh *et al.*, 1990; Vincent e Kimura, 1992) e a formação hipocampal (Valtschanoff *et al.*, 1993; Vincent e Kimura, 1992). Uma vez que o NO é uma molécula que age muitas vezes como um mensageiro retrógrado, a presença de neurônios que produzem NO nas estruturas que recebem aferências dos núcleos serotoninérgicos da rafe pode indicar a possibilidade da interação entre os dois sistemas.

Também é relatado que o NO poderia agir diretamente na molécula da serotonina inativando-a por nitrosilação (Fossier *et al.*, 1999). De fato, vários estudos apontam para a

possibilidade do envolvimento da nitrosilação de monoaminas em transtornos psiquiátricos (Delabreche *et al.*, 1994; d'Ischia e Costantini, 1995; Blanchard *et al.*, 1997). A inativação da serotonina poderia levar a uma diminuição da neurotransmissão serotoninérgica local e assim contribuir para as conseqüências comportamentais do estresse, que aumenta os níveis de NO.

Há também a possibilidade de interações do NO com outros elementos da via serotoninérgica como, por exemplo, com a triptofano hidroxilase, onde essa interação promoveria inibição da enzima e diminuição dos níveis de serotonina (Kuhn e Arthur, 1996; Kuhn e Arthur, 1997). Isso poderia explicar estudos que apontam para a possibilidade de o NO causar a depleção ou a diminuição da liberação de serotonina em determinadas células (Linden e El-Fakahany, 2002; Iuras *et al.*, 2005) e que a facilitação da liberação de NO no hipocampo pode causar uma diminuição da liberação da serotonina ou uma diminuição nas concentrações locais de serotonina (Segieth, 2001; Smith e Whitton, 2000).

O envolvimento da neurotransmissão serotoninérgica do hipocampo dorsal, por meio da ativação de receptores 5-HT_{1A}, na modulação de comportamentos relacionados à neurobiologia da depressão já tem sido discutido há algum tempo (Blier *et al.*, 1987; Chalmers *et al.*, 1994; Flugge, 1995; Chaput *et al.*, 1991; Invernizzi *et al.*, 1994; Stahl, 1994; Kreiss e Lucki 1995; Hayakawa *et al.*, 1994). A hipótese de Deakin e Graeff (1991) aponta o hipocampo como sendo uma das estruturas principais na mediação da adaptação ao estresse frente a eventos aversivos/estressantes uma vez que estes se tornem persistentes; e esse mecanismo seria justamente mediado pela ativação dos receptores 5HT_{1A} que funcionariam inibindo a formação de memórias aversivas ou causando uma desconexão entre o evento aversivo e as conseqüências afetivas do estresse ao qual o indivíduo foi submetido. Isso favoreceria a sobrevivência do indivíduo aumentando sua capacidade de adaptação a situações estressantes (Graeff *et al.*, 1996; Joca *et al.*, 2003a).

Corroborando os dados acima, utilizando um modelo animal preditivo para efeitos do tipo antidepressivo, foi demonstrado que a administração de zimelidina, um SSRI, ou de agonista dos

receptores 5HT_{1A} no hipocampo dorsal após a exposição ao estresse foi capaz de prevenir o comportamento de desamparo em ratos, efeitos bloqueados pelo pré-tratamento com WAY100635, uma antagonista de receptores 5HT_{1A} (Joca *et al.*, 2003a; Joca *et al.*, 2006).

Klenenhagen *et al.* (2006) demonstraram que camundongos KO para os receptores 5HT_{1A} expostos a um modelo de condicionamento aversivo (modelo do medo condicionado ao contexto) expressam o comportamento de congelamento de maneira similar aos camundongos do tipo selvagem. Porém, quando expostos a um meio ambíguo, misturando pistas contextuais condicionadas com pistas novas, os camundongos *knock out* não apresentam diminuição no comportamento de congelamento como os animais selvagens apresentam, indicando uma generalização inapropriada para o comportamento de medo parecida com a que ocorre com pacientes que sofrem de transtorno de pânico ou transtorno de estresse pós-traumático (Klenenhagen *et al.*, 2006). Este comportamento pode resultar de um viés no processamento de estímulos aversivos, onde os animais KO para 5HT_{1A} fariam uma associação mais forte entre o contexto e o estímulo aversivo durante o treinamento. Considerando o que já foi dito a respeito do papel do hipocampo e da importância dos receptores 5HT_{1A} hipocámpais no sistema de adaptação a situações de estresse, os resultados ajudam a sustentar a teoria de Deakin e Graeff, mostrando que os receptores 5HT_{1A} seriam importantes para diminuir o impacto afetivo de situações estressantes no indivíduo e que sua ausência causaria um viés que favoreceria associações aversivas.

Uma das formas pelas quais os receptores 5HT_{1A} no hipocampo poderiam exercer esta função seria pela inibição da formação de memórias aversivas. Carli e cols. mostraram que a ativação de 5HT_{1A} no hipocampo leva a déficits no aprendizado e memória em ratos submetidos ao teste do labirinto aquático de Morris (Carli *et al.*, 1992; 1995). Corroborando isso, é sabido que a ativação de 5HT_{1A} inibe a formação de LTP (*long term potentiation*; Sakai e Tanaka, 1993;

Kojima *et al.*, 2003; Tachibana *et al.*, 2004) e a facilitação nitrérgica favorece a formação de LTP (Arancio *et al.*, 1996a; Arancio *et al.*, 1996b) no hipocampo de ratos.

Outra possibilidade seria da participação desses receptores na modulação dos mecanismos de plasticidade neuronal no hipocampo dorsal. Agonistas 5HT_{1A} aumentam (Santarelli *et al.*, 2003; Huang e Herbert, 2005) bem como antagonistas 5HT_{1A} diminuem a proliferação celular no giro denteado do hipocampo (Radley e Jacobs, 2002) e a expressão de BDNF (Ivy *et al.*, 2003). Além disso, a sobrevivência de células no hipocampo é aumentada por administração de agonistas 5HT_{1A}, um efeito bloqueado por administração de WAY100635 (Fricker *et al.*, 2005). Estes efeitos de proliferação celular no hipocampo são considerados importantes para o efeito das drogas antidepressivas (Radley e Jacobs, 2002; Santarelli *et al.*, 2003) e também no funcionamento normal do sistema de enfrentamento e adaptação frente a situações aversivas, denotando a importância da ativação desse sistema local, mediado pelos receptores 5HT_{1A}, em relação aos mecanismos neuroplásticos presentes no hipocampo.

Isso poderia explicar os efeitos plásticos similares induzidos pelo tratamento com inibidores da NOS. Há evidências, por exemplo, de que a inibição da NOS promove não somente aumento dos níveis de serotonina no giro denteado do hipocampo, como também aumento na expressão de PSA-NCAM (molécula de adesão de células neurais polisialilada) e CREB fosforilado (pCREB - a forma ativada do CREB, Park *et al.*, 2004), aumento na expressão de BDNF (Canossa *et al.*, 2002) e aumento na neurogênese (Kim *et al.*, 2006; Arora *et al.*, 2007; Luo *et al.*, 2007; Hu *et al.*, 2008). A proteína CREB é um fator de transcrição que pode regular a transcrição de vários genes envolvidos com efeitos tróficos incluindo a neurogênese e a plasticidade neuronal (para revisões com CREB e depressão ver Nair e Vaidya, 2006; Gass e Riva, 2007); e a PSA-NCAM é uma molécula de adesão celular neural, que parece ser importante em processos de migração celular, crescimento axonal e plasticidade sináptica (Seki e Arai, 1993), além de regular a sobrevivência, migração e

diferenciação de células progenitoras no SNC de animais adultos (Battista e Rutishauser, 2010; Gascon *et al.*, 2007; Burgess *et al.*, 2008). É possível que os efeitos comportamentais induzidos por inibidores da NOS poderiam envolver a ocorrência de processos neuroplásticos locais, os quais são importantes para a função hipocampal.

Finalmente, é importante relatar que a ativação de receptores 5HT_{1A} hipocampais regula negativamente a liberação de glutamato (Dijk *et al.* 1995; Matsuyama *et al.* 1996) de NO e cGMP (Strosznajder *et al.*, 1996), sugerindo mais uma vez a interação mútua entre os dois sistemas no hipocampo modulando o comportamento sob situações aversivas. Além disso, a administração de milnacipran, um inibidor da recaptação de serotonina e noradrenalina, induz à diminuição nos níveis de NO_x no córtex e no hipocampo e também ao aumento dos níveis de BDNF nessas estruturas (Ikenouchi-Sugita *et al.*, 2009), indicando que o aumento da disponibilidade de serotonina no local e conseqüente aumento da ativação dos receptores 5HT_{1A} levaria não só a uma diminuição do NO local, que em altas concentrações pode se tornar neurotóxico, como desencadearia alterações plásticas locais, podendo favorecer a neuroproteção local. Dessa forma, parece que a via não ocorre apenas no sentido de inibição do sistema serotoninérgico pelo NO, mas também no sentido de inibição do sistema nitrérgico pela serotonina e ativação dos receptores 5HT_{1A}. O quanto um ou outro sentido dessa via de regulação na formação hipocampal é mais ou menos ativo durante a adaptação a situações aversivas, e particularmente, durante o processo de adaptação frente a situações de estresse crônico, não é possível saber com os dados que dispomos.

Assim, os resultados aqui apresentados indicam que a administração intra hipocampo dorsal de ambos, NPA e fluoxetina, induz a efeitos do tipo antidepressivo, diminuindo o tempo de imobilidade dos animais submetidos ao teste do nado forçado, e o pré-tratamento com WAY100635 foi capaz de bloquear estes efeitos, mostrando que esses são, ambos, dependentes da ativação dos receptores 5HT_{1A} nessa estrutura encefálica.

CONCLUSÕES

6. CONCLUSÕES

- A diminuição da formação de NO ou o aumento da disponibilidade de serotonina no hipocampo dorsal induz efeitos do tipo antidepressivo em ratos submetidos ao teste do nado forçado.

- O efeito da inibição da síntese de NO é dependente de serotonina e da ativação de receptores do tipo 5HT_{1A}.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abel EL, Bilitzke PJ (A possible alarm substance in the forced swimming test. *Physiol Behav* 48:233-239.1990).
- Adachi M, Abe M, Sasaki T, Kato H, Kasahara J, Araki T (Role of inducible or neuronal nitric oxide synthase in neurogenesis of the dentate gyrus in aged mice. *Metab Brain Dis* 25:419-424.2010).
- Arancio O, Kiebler M, Lee CJ, Lev-Ram V, Tsien RY, Kandel ER, Hawkins RD (Nitric oxide acts directly in the presynaptic neuron to produce long-term potentiation in cultured hippocampal neurons. *Cell* 87:1025-1035.1996a).
- Arancio O, Lev-Ram V, Tsien RY, Kandel ER, Hawkins RD (Nitric oxide acts as a retrograde messenger during long-term potentiation in cultured hippocampal neurons. *J Physiol Paris* 90:321-322.1996b).
- Arora DK, Cosgrave AS, Howard MR, Bubb V, Quinn JP, Thippeswamy T (Evidence of postnatal neurogenesis in dorsal root ganglion: role of nitric oxide and neuronal restrictive silencer transcription factor. *J Mol Neurosci* 32:97-107.2007).
- Baldwin DS, Birtwistle J (An atlas of depression. The Parthenon Publishing Group.106p, London.2002).
- Battista D, Rutishauser U (Removal of polysialic acid triggers dispersion of subventricularly derived neuroblasts into surrounding CNS tissues. *J Neurosci* 30:3995-4003.2010).
- Bhagwagar Z, Rabiner EA, Sargent PA, Grasby PM, Cowen PJ (Persistent reduction in brain serotonin_{1A} receptor binding in recovered depressed men measured by positron emission tomography with [¹¹C]WAY-100635. *Mol Psychiatry* 9:386-392.2004).
- Blanchard B, Dendane M, Gallard JF, Houee-Levin C, Karim A, Payen D, Launay JM, Ducrocq C (Oxidation, nitrosation, and nitration of serotonin by nitric oxide-derived nitrogen oxides: biological implications in the rat vascular system. *Nitric Oxide* 1:442-452.1997).

- Blier P, de Montigny C, Chaput Y (Modifications of the serotonin system by antidepressant treatments: implications for the therapeutic response in major depression. *J Clin Psychopharmacol* 7:24S-35S.1987).
- Booij L, Van der Does AJ, Riedel WJ (Monoamine depletion in psychiatric and healthy populations: review. *Mol Psychiatry* 8:951-973.2003).
- Brady DR, Carey RG, Mufson EJ (Reduced nicotinamide adenine dinucleotide phosphate-diaphorase (NADPH-d) profiles in the amygdala of human and New World monkey (*Saimiri sciureus*). *Brain Res* 577:236-248.1992).
- Bremner JD (Does stress damage the brain? *Biol Psychiatry* 45:797-805.1999).
- Burgess A, Wainwright SR, Shihabuddin LS, Rutishauser U, Seki T, Aubert I (Polysialic acid regulates the clustering, migration, and neuronal differentiation of progenitor cells in the adult hippocampus. *Dev Neurobiol* 68:1580-1590.2008).
- Calabrese V, Mancuso C, Calvani M, Rizzarelli E, Butterfield DA, Stella AM (Nitric oxide in the central nervous system: neuroprotection versus neurotoxicity. *Nat Rev Neurosci* 8:766-775.2007).
- Campbell S, Macqueen G (The role of the hippocampus in the pathophysiology of major depression. *J Psychiatry Neurosci* 29:417-426.2004).
- Canossa M, Giordano E, Cappello S, Guarnieri C, Ferri S (Nitric oxide down-regulates brain-derived neurotrophic factor secretion in cultured hippocampal neurons. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99:3282-3287.2002).
- Carli M, Lazarova M, Tatarczynska E, Samanin R (Stimulation of 5-HT_{1A} receptors in the dorsal hippocampus impairs acquisition and performance of a spatial task in a water maze. *Brain Res* 595:50-56.1992).
- Carli M, Luschi R, Garofalo P, Samanin R (8-OH-DPAT impairs spatial but not visual learning in a water maze by stimulating 5-HT_{1A} receptors in the hippocampus. *Behav Brain Res* 67:67-74.1995).
- Carli M, Tatarczynska E, Cervo L, Samanin R (Stimulation of hippocampal 5-HT_{1A} receptors causes amnesia and anxiolytic-like but not antidepressant-like effects in the rat. *Eur J Pharmacol* 234:215-221.1993).

- Caspi A, Sugden K, Moffitt TE, Taylor A, Craig IW, Harrington H, McClay J, Mill J, Martin J, Braithwaite A, Poulton R (Influence of life stress on depression: moderation by a polymorphism in the 5-HTT gene. *Science* 301:386-389.2003).
- Castren E (Is mood chemistry? *Nat Rev Neurosci* 6:241-246.2005).
- Chalmers DT, Kwak SP, Mansour A, Akil H, Watson SJ (Corticosteroids regulate brain hippocampal 5-HT1A receptor mRNA expression. *J Neurosci* 13:914-923.1993).
- Chaput Y, de Montigny C, Blier P (Presynaptic and postsynaptic modifications of the serotonin system by long-term administration of antidepressant treatments. An in vivo electrophysiologic study in the rat. *Neuropsychopharmacology* 5:219-229.1991).
- Cryan JF, Page ME, Lucki I (Noradrenergic lesions differentially alter the antidepressant-like effects of reboxetine in a modified forced swim test. *Eur J Pharmacol* 436:197-205.2002).
- Czeh B, Lucassen PJ (What causes the hippocampal volume decrease in depression? Are neurogenesis, glial changes and apoptosis implicated? *Eur Arch Psychiatry Clin Neurosci* 257:250-260.2007).
- d'Ischia M, Costantini C (Nitric oxide-induced nitration of catecholamine neurotransmitters: a key to neuronal degeneration? *Bioorg Med Chem* 3:923-927.1995).
- de Kloet ER (Stress in the brain. *Eur J Pharmacol* 405:187-198.2000).
- Deakin JF (Depression and 5HT. *Int Clin Psychopharmacol* 6 Suppl 3:23-28; discussion 29-31.1991).
- Delabreche ML, Servy C, Lenfant M, Ducrocq C (Nitration of Catecholamines with Nitrogen-Oxides in Mild Conditions - a Hypothesis for the Reactivity of No in Physiological Systems. *Tetrahedron Lett* 35:7231-7232.1994).

- Delgado PL (Monoamine depletion studies: implications for antidepressant discontinuation syndrome. *J Clin Psychiatry* 67 Suppl 4:22-26.2006).
- Dijk SN, Francis PT, Stratmann GC, Bowen DM (NMDA-induced glutamate and aspartate release from rat cortical pyramidal neurones: evidence for modulation by a 5-HT_{1A} antagonist. *Br J Pharmacol* 115:1169-1174.1995).
- Drevets WC, Frank E, Price JC, Kupfer DJ, Greer PJ, Mathis C (Serotonin type-1A receptor imaging in depression. *Nucl Med Biol* 27:499-507.2000).
- Duman RS, Monteggia LM (A neurotrophic model for stress-related mood disorders. *Biol Psychiatry* 59:1116-1127.2006).
- Dun NJ, Dun SL, Forstermann U (Nitric-Oxide Synthase Immunoreactivity in Rat Pontine Medullary Neurons. *Neuroscience* 59:429-445.1994).
- Ellison DW, Kowall NW, Martin JB (Subset of neurons characterized by the presence of NADPH-diaphorase in human substantia innominata. *J Comp Neurol* 260:233-245.1987).
- Eriksson TM, Delagrangé P, Spedding M, Popoli M, Mathe AA, Ogren SO, Svenningsson P (Emotional memory impairments in a genetic rat model of depression: involvement of 5-HT/MEK/Arc signaling in restoration. *Mol Psychiatry*.2011).
- Flugge G (Dynamics of central nervous 5-HT_{1A}-receptors under psychosocial stress. *J Neurosci* 15:7132-7140.1995).
- Flugge G, Kramer M, Rensing S, Fuchs E (5HT_{1A}-receptors and behaviour under chronic stress: selective counteraction by testosterone. *Eur J Neurosci* 10:2685-2693.1998).
- Fossier P, Blanchard B, Ducrocq C, Leprince C, Tauc L, Baux G (Nitric oxide transforms serotonin into an inactive form and this affects neuromodulation. *Neuroscience* 93:597-603.1999).
- Fricker AD, Rios C, Devi LA, Gomes I (Serotonin receptor activation leads to neurite outgrowth and neuronal survival. *Brain Res Mol Brain Res* 138:228-235.2005).

- Garthwaite J, Charles SL, Chess-Williams R (Endothelium-derived relaxing factor release on activation of NMDA receptors suggests role as intercellular messenger in the brain. *Nature* 336:385-388.1988).
- Gascon E, Vutskits L, Jenny B, Durbec P, Kiss JZ (PSA-NCAM in postnatally generated immature neurons of the olfactory bulb: a crucial role in regulating p75 expression and cell survival. *Development* 134:1181-1190.2007).
- Gass P, Riva MA (CREB, neurogenesis and depression. *Bioessays* 29:957-961.2007).
- Gerlach JL, McEwen BS (Rat brain binds adrenal steroid hormone: radioautography of hippocampus with corticosterone. *Science* 175:1133-1136.1972).
- Gigliucci V, Buckley KN, Nunan J, O'Shea K, Harkin A (A role for serotonin in the antidepressant activity of NG-Nitro-L-arginine, in the rat forced swimming test. *Pharmacol Biochem Behav* 94:524-533.2010).
- Giovacchini G, Lang L, Ma Y, Herscovitch P, Eckelman WC, Carson RE (Differential effects of paroxetine on raphe and cortical 5-HT_{1A} binding: a PET study in monkeys. *Neuroimage* 28:238-248.2005).
- Gould E, McEwen BS, Tanapat P, Galea LA, Fuchs E (Neurogenesis in the dentate gyrus of the adult tree shrew is regulated by psychosocial stress and NMDA receptor activation. *J Neurosci* 17:2492-2498.1997).
- Gould E, Tanapat P (Stress and hippocampal neurogenesis. *Biol Psychiatry* 46:1472-1479.1999).
- Graeff FG, Guimaraes FS, De Andrade TG, Deakin JF (Role of 5-HT in stress, anxiety, and depression. *Pharmacol Biochem Behav* 54:129-141.1996).
- Guimaraes FS, Beijamini V, Moreira FA, Aguiar DC, de Lucca AC (Role of nitric oxide in brain regions related to defensive reactions. *Neurosci Biobehav Rev* 29:1313-1322.2005).
- Harkin A, Connor TJ, Burns MP, Kelly JP (Nitric oxide synthase inhibitors augment the effects of serotonin re-uptake inhibitors in the forced swimming test. *Eur Neuropsychopharmacol* 14:274-281.2004).

- Harkin A, Connor TJ, Walsh M, St John N, Kelly JP (Serotonergic mediation of the antidepressant-like effects of nitric oxide synthase inhibitors. *Neuropharmacology* 44:616-623.2003).
- Harvey BH, Bothma T, Nel A, Wegener G, Stein DJ (Involvement of the NMDA receptor, NO-cyclic GMP and nuclear factor K-beta in an animal model of repeated trauma. *Hum Psychopharmacol* 20:367-373.2005).
- Harvey BH, Duvenhage I, Viljoen F, Scheepers N, Malan SF, Wegener G, Brink CB, Petzer JP (Role of monoamine oxidase, nitric oxide synthase and regional brain monoamines in the antidepressant-like effects of methylene blue and selected structural analogues. *Biochem Pharmacol* 80:1580-1591.2010).
- Harvey BH, Oosthuizen F, Brand L, Wegener G, Stein DJ (Stress-restress evokes sustained iNOS activity and altered GABA levels and NMDA receptors in rat hippocampus. *Psychopharmacology (Berl)* 175:494-502.2004).
- Hayakawa H, Shimizu M, Nishida A, Motohashi N, Yamawaki S (Increase in serotonin 1A receptors in the dentate gyrus as revealed by autoradiographic analysis following repeated electroconvulsive shock but not imipramine treatment. *Neuropsychobiology* 30:53-56.1994).
- Heiberg IL, Wegener G, Rosenberg R (Reduction of cGMP and nitric oxide has antidepressant-like effects in the forced swimming test in rats. *Behav Brain Res* 134:479-484.2002).
- Hirvonen J, Karlsson H, Kajander J, Lepola A, Markkula J, Rasi-Hakala H, Nagren K, Salminen JK, Hietala J (Decreased brain serotonin 5-HT1A receptor availability in medication-naive patients with major depressive disorder: an in-vivo imaging study using PET and [carbonyl-11C]WAY-100635. *Int J Neuropsychopharmacol* 11:465-476.2008).
- Holmans P, Weissman MM, Zubenko GS, Scheftner WA, Crowe RR, Depaulo JR, Jr., Knowles JA, Zubenko WN, Murphy-Eberenz K, Marta DH, Boutelle S, McInnis MG, Adams P, Gladis M, Steele J, Miller EB, Potash JB, Mackinnon DF, Levinson DF (Genetics of recurrent early-onset major depression (GenRED): final genome scan report. *Am J Psychiatry* 164:248-258.2007).

- Hu M, Sun YJ, Zhou QG, Chen L, Hu Y, Luo CX, Wu JY, Xu JS, Li LX, Zhu DY (Negative regulation of neurogenesis and spatial memory by NR2B-containing NMDA receptors. *J Neurochem* 106:1900-1913.2008).
- Huang GJ, Herbert J (Stimulation of neurogenesis in the hippocampus of the adult rat by fluoxetine requires rhythmic change in corticosterone. *Biol Psychiatry* 59:619-624.2006).
- Ikenouchi-Sugita A, Toyohira Y, Yoshimura R, Ueno S, Tsutsui M, Nakamura J, Yanagihara N (Opposite effects of milnacipran, a serotonin norepinephrine reuptake inhibitor, on the levels of nitric oxide and brain-derived neurotrophic factor in mouse brain cortex. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* 380:479-486.2009).
- Inan SY, Yalcin I, Aksu F (Dual effects of nitric oxide in the mouse forced swimming test: possible contribution of nitric oxide-mediated serotonin release and potassium channel modulation. *Pharmacol Biochem Behav* 77:457-464.2004).
- Invernizzi R, Bramante M, Samanin R (Chronic treatment with citalopram facilitates the effect of a challenge dose on cortical serotonin output: role of presynaptic 5-HT1A receptors. *Eur J Pharmacol* 260:243-246.1994).
- Ishihara K, Amano T, Hayakawa H, Yamawaki S, Sasa M (Enhancement of serotonin(1A) receptor function following repeated electroconvulsive shock in young rat hippocampal neurons in vitro. *Int J Neuropsychopharmacol* 2:101-104.1999).
- Iuras A, Telles MM, Bertoncini CR, Ko GM, de Andrade IS, Silveira VL, Ribeiro EB (Central administration of a nitric oxide precursor abolishes both the hypothalamic serotonin release and the hypophagia induced by interleukin-1beta in obese Zucker rats. *Regul Pept* 124:145-150.2005).
- Ivy AS, Rodriguez FG, Garcia C, Chen MJ, Russo-Neustadt AA (Noradrenergic and serotonergic blockade inhibits BDNF mRNA activation following exercise and antidepressant. *Pharmacol Biochem Behav* 75:81-88.2003).
- Jefferys D, Funder J (Nitric oxide modulates retention of immobility in the forced swimming test in rats. *Eur J Pharmacol* 295:131-135.1996).

- Joca S, Stanquini L, Ferreira F, Guimaraes F (Chronic, but not acute, inhibition of nitric oxide (NO) synthesis prevents learned helplessness development in rats. *International Journal of Neuropsychopharmacology* 11:122-122.2008).
- Joca SR, Ferreira FR, Guimaraes FS (Modulation of stress consequences by hippocampal monoaminergic, glutamatergic and nitrergic neurotransmitter systems. *Stress* 10:227-249.2007).
- Joca SR, Guimaraes FS (Inhibition of neuronal nitric oxide synthase in the rat hippocampus induces antidepressant-like effects. *Psychopharmacology (Berl)* 185:298-305.2006).
- Joca SR, Padovan CM, Guimaraes FS (Activation of post-synaptic 5-HT(1A) receptors in the dorsal hippocampus prevents learned helplessness development. *Brain Res* 978:177-184.2003a).
- Joca SR, Padovan CM, Guimaraes FS ([Stress, depression and the hippocampus]. *Rev Bras Psiquiatr* 25 Suppl 2:46-51.2003b).
- Joca SR, Zanelati T, Guimaraes FS (Post-stress facilitation of serotonergic, but not noradrenergic, neurotransmission in the dorsal hippocampus prevents learned helplessness development in rats. *Brain Res* 1087:67-74.2006).
- Joels M (Functional actions of corticosteroids in the hippocampus. *Eur J Pharmacol* 583:312-321.2008).
- Johnson MD, Ma PM (Localization of NADPH diaphorase activity in monoaminergic neurons of the rat-brain. *J Comp Neurol* 332:391-406.1993).
- Karten YJ, Nair SM, van Essen L, Sibug R, Joels M (Long-term exposure to high corticosterone levels attenuates serotonin responses in rat hippocampal CA1 neurons. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96:13456-13461.1999).
- Katz MM, Bowden CL, Frazer A (Rethinking depression and the actions of antidepressants: uncovering the links between the neural and behavioral elements. *J Affect Disord* 120:16-23.2010).

- Keks NA, Burrows GD, Copolov DL, Newton R, Paoletti N, Schweitzer I, Tiller J (Beyond the evidence: is there a place for antidepressant combinations in the pharmacotherapy of depression? *Med J Aust* 186:142-144.2007).
- Kendler KS, Kessler RC, Walters EE, MacLean C, Neale MC, Heath AC, Eaves LJ (Stressful life events, genetic liability, and onset of an episode of major depression in women. *Am J Psychiatry* 152:833-842.1995).
- Kennett GA, Dickinson SL, Curzon G (Central serotonergic responses and behavioural adaptation to repeated immobilisation: the effect of the corticosterone synthesis inhibitor metyrapone. *Eur J Pharmacol* 119:143-152.1985a).
- Kennett GA, Dickinson SL, Curzon G (Enhancement of some 5-HT-dependent behavioural responses following repeated immobilization in rats. *Brain Res* 330:253-263.1985b).
- Kennett GA, Marcou M, Dourish CT, Curzon G (Single administration of 5-HT_{1A} agonists decreases 5-HT_{1A} presynaptic, but not postsynaptic receptor-mediated responses: relationship to antidepressant-like action. *Eur J Pharmacol* 138:53-60.1987).
- Keser A, Balkan B, Gozen O, Kanit L, Pogun S (Hippocampal neuronal nitric oxide synthase (nNOS) is regulated by nicotine and stress in female but not in male rats. *Brain Res* 1368:134-142).
- Kessler RC, Angermeyer M, Anthony JC, R DEG, Demyttenaere K, Gasquet I, G DEG, Gluzman S, Gureje O, Haro JM, Kawakami N, Karam A, Levinson D, Medina Mora ME, Oakley Browne MA, Posada-Villa J, Stein DJ, Adley Tsang CH, Aguilar-Gaxiola S, Alonso J, Lee S, Heeringa S, Pennell BE, Berglund P, Gruber MJ, Petukhova M, Chatterji S, Ustun TB (Lifetime prevalence and age-of-onset distributions of mental disorders in the World Health Organization's World Mental Health Survey Initiative. *World Psychiatry* 6:168-176.2007).
- Khovryakov AV, Podrezova EP, Kruglyakov PP, Shikhanov NP, Balykova MN, Semibratova NV, Sosunov AA, McKhann G, 2nd, Airapetyants MG (Involvement of the NO synthase system in stress-mediated brain reactions. *Neurosci Behav Physiol* 40:333-337).

- Kim SH, Won SJ, Mao XO, Ledent C, Jin K, Greenberg DA (Role for neuronal nitric-oxide synthase in cannabinoid-induced neurogenesis. *J Pharmacol Exp Ther* 319:150-154.2006).
- Klemenhagen KC, Gordon JA, David DJ, Hen R, Gross CT (Increased fear response to contextual cues in mice lacking the 5-HT1A receptor. *Neuropsychopharmacology* 31:101-111.2006).
- Klimek V, Papp M (The effect of MK-801 and imipramine on beta-adrenergic and 5-HT2 receptors in the chronic mild stress model of depression in rats. *Pol J Pharmacol* 46:67-69.1994).
- Knowles RG, Palacios M, Palmer RM, Moncada S (Formation of nitric oxide from L-arginine in the central nervous system: a transduction mechanism for stimulation of the soluble guanylate cyclase. *Proc Natl Acad Sci U S A* 86:5159-5162.1989).
- Kojima T, Matsumoto M, Togashi H, Tachibana K, Kemmotsu O, Yoshioka M (Fluvoxamine suppresses the long-term potentiation in the hippocampal CA1 field of anesthetized rats: an effect mediated via 5-HT1A receptors. *Brain Res* 959:165-168.2003).
- Kreiss DS, Lucki I (Effects of acute and repeated administration of antidepressant drugs on extracellular levels of 5-hydroxytryptamine measured in vivo. *J Pharmacol Exp Ther* 274:866-876.1995).
- Kuhn DM, Arthur R, Jr. (Molecular mechanism of the inactivation of tryptophan hydroxylase by nitric oxide: attack on critical sulfhydryls that spare the enzyme iron center. *J Neurosci* 17:7245-7251.1997).
- Kuhn DM, Arthur RE, Jr. (Inactivation of brain tryptophan hydroxylase by nitric oxide. *J Neurochem* 67:1072-1077.1996).
- Lapin IP, Oxenkrug GF (Intensification of the central serotonergic processes as a possible determinant of the thymoleptic effect. *Lancet* 1:132-136.1969).
- Layer RT, Popik P, Olds T, Skolnick P (Antidepressant-like actions of the polyamine site NMDA antagonist, eliprodil (SL-82.0715). *Pharmacol Biochem Behav* 52:621-627.1995).

- Lee J, Duan W, Mattson MP (Evidence that brain-derived neurotrophic factor is required for basal neurogenesis and mediates, in part, the enhancement of neurogenesis by dietary restriction in the hippocampus of adult mice. *J Neurochem* 82:1367-1375.2002).
- Leger L, Charnay Y, Burlet S, Gay N, Schaad N, Bouras C, Cespuglio R (Comparative distribution of nitric oxide synthase- and serotonin-containing neurons in the raphe nuclei of four mammalian species. *Histochem Cell Biol* 110:517-525.1998).
- Leigh PN, Connick JH, Stone TW (Distribution of NADPH-diaphorase positive cells in the rat brain. *Comp Biochem Physiol C* 97:259-264.1990).
- Lerer B, Gelfin Y, Gorfine M, Allolio B, Lesch KP, Newman ME (5-HT_{1A} receptor function in normal subjects on clinical doses of fluoxetine: blunted temperature and hormone responses to ipsapirone challenge. *Neuropsychopharmacology* 20:628-639.1999).
- Li N, Lee B, Liu RJ, Banasr M, Dwyer JM, Iwata M, Li XY, Aghajanian G, Duman RS (mTOR-dependent synapse formation underlies the rapid antidepressant effects of NMDA antagonists. *Science* 329:959-964).
- Li N, Liu RJ, Dwyer JM, Banasr M, Lee B, Son H, Li XY, Aghajanian G, Duman RS (Glutamate N-methyl-D-aspartate receptor antagonists rapidly reverse behavioral and synaptic deficits caused by chronic stress exposure. *Biol Psychiatry* 69:754-761).
- Linden DR, El-Fakahany EE (Microglial derived nitric oxide decreases serotonin content in rat basophilic leukemia (RBL-2H3) cells. *Eur J Pharmacol* 436:53-56.2002).
- Lopez-Figueroa AL, Norton CS, Lopez-Figueroa MO, Armellini-Dodel D, Burke S, Akil H, Lopez JF, Watson SJ (Serotonin 5-HT_{1A}, 5-HT_{1B}, and 5-HT_{2A} receptor mRNA expression in subjects with major depression, bipolar disorder, and schizophrenia. *Biol Psychiatry* 55:225-233.2004).
- Lopez JF, Chalmers DT, Little KY, Watson SJ (A.E. Bennett Research Award. Regulation of serotonin_{1A}, glucocorticoid, and mineralocorticoid receptor in rat and human hippocampus: implications for the neurobiology of depression. *Biol Psychiatry* 43:547-573.1998).

- Lucassen PJ, Muller MB, Holsboer F, Bauer J, Holtrop A, Wouda J, Hoogendijk WJ, De Kloet ER, Swaab DF (Hippocampal apoptosis in major depression is a minor event and absent from subareas at risk for glucocorticoid overexposure. *Am J Pathol* 158:453-468.2001a).
- Lucassen PJ, Vollmann-Honsdorf GK, Gleisberg M, Czeh B, De Kloet ER, Fuchs E (Chronic psychosocial stress differentially affects apoptosis in hippocampal subregions and cortex of the adult tree shrew. *Eur J Neurosci* 14:161-166.2001b).
- Lundberg J, Borg J, Halldin C, Farde L (A PET study on regional coexpression of 5-HT1A receptors and 5-HTT in the human brain. *Psychopharmacology (Berl)* 195:425-433.2007).
- Luo CX, Zhu XJ, Zhou QG, Wang B, Wang W, Cai HH, Sun YJ, Hu M, Jiang J, Hua Y, Han X, Zhu DY (Reduced neuronal nitric oxide synthase is involved in ischemia-induced hippocampal neurogenesis by up-regulating inducible nitric oxide synthase expression. *J Neurochem* 103:1872-1882.2007).
- Maj J, Rogoz Z, Skuza G, Sowinska H (The effect of CGP 37849 and CGP 39551, competitive NMDA receptor antagonists, in the forced swimming test. *Pol J Pharmacol Pharm* 44:337-346.1992a).
- Maj J, Rogoz Z, Skuza G, Sowinska H (Effects of MK-801 and antidepressant drugs in the forced swimming test in rats. *Eur Neuropsychopharmacol* 2:37-41.1992b).
- Malberg JE, Duman RS (Cell proliferation in adult hippocampus is decreased by inescapable stress: reversal by fluoxetine treatment. *Neuropsychopharmacology* 28:1562-1571.2003).
- Maqbool A, Batten TFC, Mcwilliam PN (Colocalization of Neurotransmitter Immunoreactivities in Putative Nitric-Oxide Synthesizing Neurons of the Cat Brain-Stem. *J Chem Neuroanat* 8:191-206.1995).
- Matsuyama S, Nei K, Tanaka C (Regulation of glutamate release via NMDA and 5-HT1A receptors in guinea pig dentate gyrus. *Brain Res* 728:175-180.1996).

- McBlane JW, Handley SL (Effects of two stressors on behaviour in the elevated X-maze: preliminary investigation of their interaction with 8-OH-DPAT. *Psychopharmacology (Berl)* 116:173-182.1994).
- McEwen BS (Protection and damage from acute and chronic stress: allostasis and allostatic overload and relevance to the pathophysiology of psychiatric disorders. *Ann N Y Acad Sci* 1032:1-7.2004).
- McEwen BS (Physiology and neurobiology of stress and adaptation: central role of the brain. *Physiol Rev* 87:873-904.2007).
- McEwen BS, Weiss JM, Schwartz LS (Selective retention of corticosterone by limbic structures in rat brain. *Nature* 220:911-912.1968).
- McKittrick CR, Magarinos AM, Blanchard DC, Blanchard RJ, McEwen BS, Sakai RR (Chronic social stress reduces dendritic arbors in CA3 of hippocampus and decreases binding to serotonin transporter sites. *Synapse* 36:85-94.2000).
- McLeod TM, Lopez-Figueroa AL, Lopez-Figueroa MO (Nitric oxide, stress, and depression. *Psychopharmacol Bull* 35:24-41.2001).
- Meloni D, Gambarana C, De Montis MG, Dal Pra P, Taddei I, Tagliamonte A (Dizocilpine antagonizes the effect of chronic imipramine on learned helplessness in rats. *Pharmacol Biochem Behav* 46:423-426.1993).
- Mizukawa K, McGeer PL, Vincent SR, McGeer EG (Ultrastructure of reduced nicotinamide adenine dinucleotide phosphate (NADPH) diaphorase-positive neurons in the cat cerebral cortex, amygdala and caudate nucleus. *Brain Res* 452:286-292.1988).
- Murray CJ, Lopez AD (Global mortality, disability, and the contribution of risk factors: Global Burden of Disease Study. *Lancet* 349:1436-1442.1997).
- Mutlu O, Ulak G, Laugeray A, Belzung C (Effects of neuronal and inducible NOS inhibitor 1-[2-(trifluoromethyl) phenyl] imidazole (TRIM) in unpredictable chronic mild stress procedure in mice. *Pharmacol Biochem Behav* 92:82-87.2009).

- Nair A, Vaidya VA (Cyclic AMP response element binding protein and brain-derived neurotrophic factor: molecules that modulate our mood? *J Biosci* 31:423-434.2006).
- Naylor GJ, Smith AH, Connelly P (A controlled trial of methylene blue in severe depressive illness. *Biol Psychiatry* 22:657-659.1987).
- Nestler EJ (Antidepressant treatments in the 21st century. *Biol Psychiatry* 44:526-533.1998).
- Nestler EJ, Barrot M, DiLeone RJ, Eisch AJ, Gold SJ, Monteggia LM (Neurobiology of depression. *Neuron* 34:13-25.2002).
- Netto SM, Guimaraes FS (Role of hippocampal 5-HT_{1A} receptors on elevated plus maze exploration after a single restraint experience. *Behav Brain Res* 77:215-218.1996).
- Nimgaonkar VL, Goodwin GM, Davies CL, Green AR (Down-regulation of beta-adrenoceptors in rat cortex by repeated administration of desipramine, electroconvulsive shock and clenbuterol requires 5-HT neurones but not 5-HT. *Neuropharmacology* 24:279-283.1985).
- Olesen J, Baker MG, Freund T, di Luca M, Mendlewicz J, Ragan I, Westphal M (Consensus document on European brain research. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 77 Suppl 1:i1-49.2006).
- Oliveira RM, Guimaraes FS, Deakin JF (Expression of neuronal nitric oxide synthase in the hippocampal formation in affective disorders. *Braz J Med Biol Res* 41:333-341.2008).
- Organização Mundial da Saúde (Classificação internacional estatística das doenças e problemas de saúde relacionados 10a versão Atualizada – CID - 10 em: <http://apps.who.int/classifications/apps/icd/icd10online/> versão 2007. Acesso em: 21 de maio de 2011).
- Padovan CM, Guimaraes FS (Antidepressant-like effects of NMDA-receptor antagonist injected into the dorsal hippocampus of rats. *Pharmacol Biochem Behav* 77:15-19.2004).

- Papp M, Moryl E (New evidence for the antidepressant activity of MK-801, a non-competitive antagonist of NMDA receptors. *Pol J Pharmacol* 45:549-553.1993).
- Papp M, Moryl E (Antidepressant activity of non-competitive and competitive NMDA receptor antagonists in a chronic mild stress model of depression. *Eur J Pharmacol* 263:1-7.1994).
- Park C, Cho K, Ryu JH, Shin KS, Kim J, Ahn H, Huh Y (7-Nitroindazole upregulates phosphorylated cAMP response element binding protein, polysialylated-neural cell adhesion molecule and tryptophan hydroxylase expression in the adult rat hippocampus. *Brain Res* 1008:120-125.2004).
- Paul IA, Trullas R, Skolnick P, Nowak G (Down-regulation of cortical beta-adrenoceptors by chronic treatment with functional NMDA antagonists. *Psychopharmacology (Berl)* 106:285-287.1992).
- Pineyro G, Blier P (Autoregulation of serotonin neurons: role in antidepressant drug action. *Pharmacol Rev* 51:533-591.1999).
- Pitkanen A, Amaral DG (Distribution of reduced nicotinamide adenine dinucleotide phosphate diaphorase (NADPH-d) cells and fibers in the monkey amygdaloid complex. *J Comp Neurol* 313:326-348.1991).
- Pitsikas N, Rigamonti AE, Cella SG, Sakellaridis N, Muller EE (The nitric oxide donor molsidomine antagonizes age-related memory deficits in the rat. *Neurobiol Aging* 26:259-264.2005a).
- Pitsikas N, Tsitsirigou S, Zisopoulou S, Sakellaridis N (The 5-HT1A receptor and recognition memory. Possible modulation of its behavioral effects by the nitrenergic system. *Behav Brain Res* 159:287-293.2005b).
- Pittenger C, Duman RS (Stress, depression, and neuroplasticity: a convergence of mechanisms. *Neuropsychopharmacology* 33:88-109.2008).
- Porsolt RD, Anton G, Blavet N, Jalfre M (Behavioural despair in rats: a new model sensitive to antidepressant treatments. *Eur J Pharmacol* 47:379-391.1978).

- Porsolt RD, Bertin A, Jalfre M (Behavioral despair in mice: a primary screening test for antidepressants. *Arch Int Pharmacodyn Ther* 229:327-336.1977).
- Post RM (Transduction of psychosocial stress into the neurobiology of recurrent affective disorder. *Am J Psychiatry* 149:999-1010.1992).
- Prast H, Philippu A (Nitric oxide as modulator of neuronal function. *Prog Neurobiol* 64:51-68.2001).
- Przegalinski E, Tatarczynska E, Deren-Wesolek A, Chojnacka-Wojcik E (Antidepressant-like effects of a partial agonist at strychnine-insensitive glycine receptors and a competitive NMDA receptor antagonist. *Neuropharmacology* 36:31-37.1997).
- Radley JJ, Jacobs BL (5-HT_{1A} receptor antagonist administration decreases cell proliferation in the dentate gyrus. *Brain Res* 955:264-267.2002).
- Sackeim HA, Manji HK, Perera TD, Santarelli L, Kornack D, Kempermann G, Eisch A (Environmental and pharmacological regulation of hippocampal neurogenesis. *Biol Psychiat* 53:3S-3S.2003).
- Sakai N, Tanaka C (Inhibitory modulation of long-term potentiation via the 5-HT_{1A} receptor in slices of the rat hippocampal dentate gyrus. *Brain Res* 613:326-330.1993).
- Sanacora G, Zarate CA, Krystal JH, Manji HK (Targeting the glutamatergic system to develop novel, improved therapeutics for mood disorders. *Nat Rev Drug Discov* 7:426-437.2008).
- Santarelli L, Saxe M, Gross C, Surget A, Battaglia F, Dulawa S, Weisstaub N, Lee J, Duman R, Arancio O, Belzung C, Hen R (Requirement of hippocampal neurogenesis for the behavioral effects of antidepressants. *Science* 301:805-809.2003).
- Savitz J, Lucki I, Drevets WC (5-HT_{1A}) receptor function in major depressive disorder. *Prog Neurobiol* 88:17-31.2009).

- Schildkraut JJ (The catecholamine hypothesis of affective disorders: a review of supporting evidence. *Am J Psychiatry* 122:509-522.1965).
- Segieth J, Pearce B, Fowler L, Whitton PS (Regulatory role of nitric oxide over hippocampal 5-HT release in vivo. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* 363:302-306.2001).
- Seidenbecher T, Laxmi TR, Stork O, Pape HC (Amygdalar and hippocampal theta rhythm synchronization during fear memory retrieval. *Science* 301:846-850.2003).
- Seki T, Arai Y (Distribution and possible roles of the highly polysialylated neural cell adhesion molecule (NCAM-H) in the developing and adult central nervous system. *Neurosci Res* 17:265-290.1993).
- Sevgi S, Ozek M, Eroglu L (L-NAME prevents anxiety-like and depression-like behavior in rats exposed to restraint stress. *Methods Find Exp Clin Pharmacol* 28:95-99.2006).
- Sheline YI, Mittler BL, Mintun MA (The hippocampus and depression. *Eur Psychiatry* 17 Suppl 3:300-305.2002).
- Shumake J, Edwards E, Gonzalez-Lima F (Dissociation of septo-hippocampal metabolism in the congenitally helpless rat. *Neuroscience* 114:373-377.2002).
- Sims KS, Williams RS (The human amygdaloid complex: a cytologic and histochemical atlas using Nissl, myelin, acetylcholinesterase and nicotinamide adenine dinucleotide phosphate diaphorase staining. *Neuroscience* 36:449-472.1990).
- Smith JC, Whitton PS (Nitric oxide modulates N-methyl-D-aspartate-evoked serotonin release in the raphe nuclei and frontal cortex of the freely moving rat. *Neurosci Lett* 291:5-8.2000).
- Southwick SM, Vythilingam M, Charney DS (The psychobiology of depression and resilience to stress: implications for prevention and treatment. *Annu Rev Clin Psychol* 1:255-291.2005).

- Stahl SM, Hauger RL, Rausch JL, Fleishaker JC, Hubbell-Alberts E (Downregulation of serotonin receptor subtypes by nortriptyline and adinazolam in major depressive disorder: neuroendocrine and platelet markers. *Clin Neuropharmacol* 16 Suppl 3:S19-31.1993).
- Strosznajder J, Chalimoniuk M, Samochocki M (Activation of serotonergic 5-HT_{1A} receptor reduces Ca²⁺- and glutamatergic receptor-evoked arachidonic acid and No/cGMP release in adult hippocampus. *Neurochem Int* 28:439-444.1996).
- Sullivan PF, Neale MC, Kendler KS (Genetic epidemiology of major depression: review and meta-analysis. *Am J Psychiatry* 157:1552-1562.2000).
- Suzuki E, Yagi G, Nakaki T, Kanba S, Asai M (Elevated plasma nitrate levels in depressive states. *J Affect Disord* 63:221-224.2001).
- Szabo ST, Blier P (Effects of chronic antidepressant drug administration and electroconvulsive shock on locus coeruleus electrophysiologic activity. *Biol Psychiatry* 50:644-646.2001).
- Tachibana K, Matsumoto M, Togashi H, Kojima T, Morimoto Y, Kemmotsu O, Yoshioka M (Milnacipran, a serotonin and noradrenaline reuptake inhibitor, suppresses long-term potentiation in the rat hippocampal CA1 field via 5-HT_{1A} receptors and alpha 1-adrenoceptors. *Neurosci Lett* 357:91-94.2004).
- Tanapat P, Hastings NB, Reeves AJ, Gould E (Estrogen stimulates a transient increase in the number of new neurons in the dentate gyrus of the adult female rat. *J Neurosci* 19:5792-5801.1999).
- Tanapat P, Hastings NB, Rydel TA, Galea LA, Gould E (Exposure to fox odor inhibits cell proliferation in the hippocampus of adult rats via an adrenal hormone-dependent mechanism. *J Comp Neurol* 437:496-504.2001).
- Trullas R, Skolnick P (Functional antagonists at the NMDA receptor complex exhibit antidepressant actions. *Eur J Pharmacol* 185:1-10.1990).
- Valtschanoff JG, Weinberg RJ, Kharazia VN, Nakane M, Schmidt HH (Neurons in rat hippocampus that synthesize nitric oxide. *J Comp Neurol* 331:111-121.1993).

- van Riel E, Meijer OC, Steenbergen PJ, Joels M (Chronic unpredictable stress causes attenuation of serotonin responses in cornu ammonis 1 pyramidal neurons. *Neuroscience* 120:649-658.2003).
- van Riel E, van Gemert NG, Meijer OC, Joels M (Effect of early life stress on serotonin responses in the hippocampus of young adult rats. *Synapse* 53:11-19.2004).
- Verge D, Daval G, Marcinkiewicz M, Patey A, el Mestikawy S, Gozlan H, Hamon M (Quantitative autoradiography of multiple 5-HT1 receptor subtypes in the brain of control or 5,7-dihydroxytryptamine-treated rats. *J Neurosci* 6:3474-3482.1986).
- Vincent SR, Kimura H (Histochemical mapping of nitric oxide synthase in the rat brain. *Neuroscience* 46:755-784.1992).
- Wang D, An SC, Zhang X (Prevention of chronic stress-induced depression-like behavior by inducible nitric oxide inhibitor. *Neurosci Lett* 433:59-64.2008).
- Wang QP, Guan JL, Nakai Y (Distribution and Synaptic Relations of Nos Neurons in the Dorsal Raphe Nucleus - a Comparison to 5-Ht Neurons. *Brain Research Bulletin* 37:177-187.1995).
- Wegener G, Harvey BH, Bonefeld B, Muller HK, Volke V, Overstreet DH, Elfving B (Increased stress-evoked nitric oxide signalling in the Flinders sensitive line (FSL) rat: a genetic animal model of depression. *Int J Neuropsychopharmacol* 13:461-473).
- Wegener G, Volke V, Harvey BH, Rosenberg R (Local, but not systemic, administration of serotonergic antidepressants decreases hippocampal nitric oxide synthase activity. *Brain Res* 959:128-134.2003).
- Wegener G, Volke V, Rosenberg R (Endogenous nitric oxide decreases hippocampal levels of serotonin and dopamine in vivo. *Br J Pharmacol* 130:575-580.2000).
- Willner P (The validity of animal models of depression. *Psychopharmacology (Berl)* 83:1-16.1984).

- Willner P (Animal models of depression: an overview. *Pharmacol Ther* 45:425-455.1990).
- Willner P, Mitchell PJ (The validity of animal models of predisposition to depression. *Behav Pharmacol* 13:169-188.2002).
- Wotherspoon G, Albert M, Rattray M, Priestley JV (Serotonin and NADPH-Diaphorase in the Dorsal Raphe Nucleus of the Adult-Rat. *Neuroscience Letters* 173:31-36.1994).
- Yildiz F, Erden BF, Ulak G, Utkan T, Gacar N (Antidepressant-like effect of 7-nitroindazole in the forced swimming test in rats. *Psychopharmacology (Berl)* 149:41-44.2000).
- Zhang HQ, Fast W, Marletta MA, Martasek P, Silverman RB (Potent and selective inhibition of neuronal nitric oxide synthase by N omega-propyl-L-arginine. *J Med Chem* 40:3869-3870.1997).
- Zhou QG, Hu Y, Hua Y, Hu M, Luo CX, Han X, Zhu XJ, Wang B, Xu JS, Zhu DY (Neuronal nitric oxide synthase contributes to chronic stress-induced depression by suppressing hippocampal neurogenesis. *J Neurochem* 103:1843-1854.2007).