UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO

DEPARTAMENTO DE FARMACOLOGIA

**Estudo do envolvimento da via NMDA-NO do eixo dorso-ventral do hipocampo
sobre o comportamento induzido pelo estresse de nado forçado.**

Cassiano Ricardo Alves Faria Diniz

Ribeirão Preto-SP

2013

Cassiano Ricardo Alves Faria Diniz

Estudo do envolvimento da via NMDA-NO do eixo dorso-ventral do hipocampo sobre o comportamento induzido pelo estresse de nado forçado.

Dissertação apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo para obtenção do grau de Mestre em Ciências.

Área de concentração: Farmacologia

Orientadora: Prof. Dra. Sâmia Regiane Lourenço Joca

Ribeirão Preto
2013

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

Diniz, Cassiano Ricardo Alves Faria

Estudo do envolvimento da via NMDA-NO do eixo dorso-ventral do hipocampo sobre o comportamento induzido pelo estresse de nado forçado./ Cassiano Ricardo Alves Faria Diniz; orientadora: Sâmia Regiane Lourenço Joca. – Ribeirão Preto, 2013.

72 fls.: il. ; 30 cm

Dissertação (Mestrado em Ciências – Área de concentração: Farmacologia) - Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto/USP.

- 1. NMDAr/NO/GCs. 2. Hipocampo ventral. 3. Hipocampo dorsal.**
- 4. Nado forçado. 5. Depressão - Neurobiologia.**

FOLHA DE APROVAÇÃO

Cassiano Ricardo Alves Faria Diniz

Estudo do envolvimento da via NMDA-NO do eixo dorso-ventral do hipocampo sobre o comportamento induzido pelo estresse de nado forçado.

Dissertação apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo para obtenção do grau de Mestre em Ciências.

Área de Concentração: Farmacologia.

Aprovado em: ____/____/2013.

Banca examinadora

Prof(a). Dra. Sâmia Regiane Lourenço Joca

Instituição: FMRP – USP

Assinatura:_____.

Prof. Dr. Hélio Zangrossi Júnior

Instituição: FMRP – USP

Assinatura:_____.

Prof. Dr. Cilene Lino de Oliveira

Instituição: CCB – UFSC

Assinatura:_____.

“Não há fenômenos morais, mas apenas uma interpretação moral de fenômenos.” (Friedrich Nietzsche)

Aos meus pais, Mário Sérgio e Débora, pela dedicação, carinho, amor, paciência e principalmente por acreditarem em meu potencial e fazerem não somente o possível, mas também o impossível, para tornar factível mais esta conquista...

A todos os amigos de coração, por qualquer motivo que seja, já que motivos não se fazem mais necessários a partir do momento que amigos se tornam irmãos...

às minhas irmãs que tanto amo, pelo simples fato de, inerente ao sangue compartilhado, demonstrarem tanto afeto, carinho e amor, qualquer motivo se faz suficiente para o mais simples e puro amor que sinto por vocês, por fim...

Agradeço e dedico a todos vocês este trabalho

AGRADECIMENTOS

Primeiramente à minha orientadora, pela confiança, dedicação, paciência e principalmente pelos conhecimentos a mim compartilhados, os quais incluem não só conhecimentos didáticos e intelectuais, mas também, amplo conhecimento de que podemos nos fazer respeitados sem precisarmos deixar a educação, delicadeza e principalmente o respeito de lado.

A todos os professores que de alguma maneira se fizeram presentes em minha caminhada intelectual, desde a graduação até o atual momento, em especial o professor “Chico” Guimarães, que faz sempre possível uma simples discussão tornar-se uma grande discussão e também por todo apoio material e estrutural, ao professor “Leo” pelo apoio, discussões, conselhos e amizade.

Ao casal Plínio e Carol pelas discussões, conselhos, amizade e principalmente pela disposição e solicitude sempre presente a qualquer momento que se faça necessário.

À Técnica do nosso laboratório, Flávia Salata, pela constante ajuda e agradável convivência no laboratório, ao Técnico Zé Carlos, pela vasta experiência técnica que sempre de alguma maneira se faz útil e presente em nosso cotidiano.

Às secretárias Marlene, Soninha, Fátima e ao técnico administrativo, José Waldik Ramon que sempre, na medida do possível, fazem nossas vidas menos burocráticas e mais prática.

Aos companheiros e amigos do laboratório pelas discussões filosóficas, farmacológicas e também pelas boas risadas e ótima convivência.

Aos amigos e companheiros dos demais laboratórios os quais eu insisto em tomar um café e bagunçar um pouco a rotina, pelas risadas, churrascos, festas, e não menos importante, as infinitas discussões farmacológicas.

Ao Casal Téo e Nádia pela sempre calorosa recepção nos grandes churrascos do grupo e pelas intensas (calorosas, fervorosas, infindáveis) discussões filosoficamente filosóficas.

Aos amigos da graduação que ainda se fazem presentes em minha vida.

À faculdade de Farmácia e Medicina pela estrutura e condições oferecidas para o andamento e conclusão do projeto.

Às agências de fomento CNPQ, FAPESP e FAEPA, pelo apoio financeiro, seja de forma direta ou indireta.

Por fim, novamente aos meus pais, familiares, amigos conterrâneos, todos os quais nunca é demais agradecer.

RESUMO

DINIZ, C.R.A.F. Estudo do envolvimento da via NMDA-NO do eixo dorso-ventral do hipocampo sobre o comportamento induzido pelo estresse de nado forçado. **2013. 72f.** Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2013.

Acredita-se que diferenças morfológicas e diferente padrão de expressão gênica ao longo do eixo dorso/ventral do hipocampo seriam responsáveis pela distinta função entre a porção dorsal (HD) e ventral do mesmo (HV). HD seria responsável por processos cognitivos, tais como memória e aprendizagem espacial, e o HV pelas respostas neuroendócrinas e emocional-motivacionais ao estresse. No entanto, não há muitos estudos acerca de diferenças entre HD e HV na modulação de comportamentos relacionados à neurobiologia da depressão. Há, contudo, dados indicando que o bloqueio de receptores glutamatérgicos do tipo NMDA ou da síntese de NO no HD induz efeito semelhante ao dos antidepressivos (i.e. do tipo antidepressivo) no teste do nado forçado (TNF). Quanto ao HV, a função da neurotransmissão glutamatérgica/nitrérgica na neurobiologia da depressão permanece não investigado. Dessa forma, o objetivo do presente estudo foi realizar o bloqueio reversível do HD ou do HV, em diferentes momentos, em animais submetidos ao TNF. O próximo passo foi realizar a micro-injeção intra-HD ou intra-HV do antagonista NMDA AP-7 ou do inibidor da óxido nítrico sintase neuronal (nNOS), N-PLA, ou do inibidor da guanilato ciclase solúvel (sGC), ODQ. Os resultados mostram que o bloqueio do HD ou do HV com cloreto de cobalto (CoCl_2 , bloqueador da neurotransmissão sináptica dependente de cálcio) não modificou o comportamento dos animais no TNF. No entanto a administração de AP-7 ou N-PLA ou ODQ no HV antes do teste, reduziu o tempo de imobilidade no TNF. Por outro lado, a injeção dessas drogas no HD foi capaz de reduzir o tempo de imobilidade quando administradas tanto depois do pré-teste quanto antes do teste. Estes resultados sugerem que as vias NMDA-NO do HD e do HV, estariam envolvidas na modulação da resposta comportamental frente ao estresse do nado forçado. Além disso, os dados indicam que a participação dessas estruturas é importante em diferentes momentos após a exposição ao estresse.

Palavras chave: receptor glutamatérgico NMDA, óxido nítrico, hipocampo dorsal e ventral, teste do nado forçado.

ABSTRACT

Diniz, C.R.A.F. **Involvement of the NMDA-NO pathway of the dorso/ventral hippocampal axis in the modulation of behavioral responses elicited by the forced swimming test. 2013. 72p.** Thesis (Masters) – School of Medicine of Ribeirão Preto, University of São Paulo, Ribeirão Preto, 2013.

It is believed that hodological and genetic pattern of expression differences along dorsal/ventral hippocampal axis would be responsible for distinct functions attributed to its dorsal (DH) and ventral (VH) poles. DH would be responsible for cognitive process, such as spatial memory and learning, whereas the VH would be responsible for neuroendocrine and emotional-motivation responses to stress. However, there is no many studies about possible differences between DH and VH in the modulation of behavioral responses related to the neurobiology of depression. Though, there are data showing that the blockade of glutamatergic NMDA receptors blockers or NO synthesis inhibition within the DH induces similar effect to that of antidepressant drugs (like antidepressant effect) in the forced swimming test (FST). On the VH, The role of the glutamatergic/nitrergic neurotransmission remains to be investigated. Thus, the aim of this work was to perform the reversible blockade of DH or VH, at different times, in animals subjected to FST. Additionally, the next step was to perform a microinjections into the DH or the VH of NMDA antagonist (AP-7), inhibitor of neuronal nitric oxide synthase (nNOS, N-PLA), or the inhibitor of soluble guanylate cyclase (sGC, ODQ). The results show that blocking the VH or the DH (cobalt chloride, calcium dependent neurotransmission inhibitor) did not modify the behavior of animals during the TNF. However administration of AP-7, N-PLA or ODQ intra-HV, before testing, caused antidepressant-like effects. Moreover, injection of such drugs, intra-HD, was able to induce similar results when administered both after the pre-test and before testing. These results suggest that NMDA-NO pathway of both VH and DH is involved in the modulation of emotional responses to the forced swim stress, although there may be an interest differential participation of these structures at different times after exposure to stress.

Keywords: glutamatergic NMDA receptor, nitric oxide, dorsal and ventral hippocampus, forced swimming test

LISTA DE ABREVIATURAS

5HT -	Serotonina
BDNF -	Fator de crescimento derivado do cérebro
cAMP -	Adenosina mono-fosfato cíclica
cGMP -	Guanosina mono-fosfato cíclica
CoCl₂ -	Cloreto de cobalto
CREB -	Proteína ligante ao elemento de resposta cAMP
EPM -	Erro padrão da média
ERK -	Quinase regulada por sinal extracelular
FCFRP-USP -	Faculdade de Farmácia da Universidade de São Paulo
FMRP-USP -	Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto - Universidade de São Paulo
GC -	Glicocorticóide
GCs -	Guanilato ciclase solúvel
GTP -	Guanosina trifosfato
HD -	Hipocampo dorsal
HV-	Hipocampo ventral
HPA -	Hipotálamo-pituitária-adrenal
IL-1B -	Interleucina B
IL-6 -	Interleucina 6
LTP -	Potenciação de longo prazo
LTD -	Depressão de longo prazo
LCE -	Labirinto em cruz elevado
CPFm -	Córtex pré-frontal medial
NLET -	Núcleo do leito da estria terminal

NMDA -	N-metil-D-aspartato
NO -	Óxido nítrico
nNOS -	Óxido nítrico sintaseneuronal
PT -	Pré-teste
RNMDA -	Receptor NMDA
R5HT1a -	Receptor 5HT1a
SNC-	Sistema nervoso central
T -	Teste
TCA -	Teste do campo aberto
TNF -	Teste do nado forçado

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Pontos representativos mostrando injeções bilaterais no HD e HV	41
Figura 2. Efeito da injeção do CoCl_2 no hipocampo dos animais submetidos ao teste do nado forçado.....	42
Figura 3. Efeito da injeção de AP-7, N-PLA, ODQ ou veículo, antes do PT, no hipocampo de animais submetidos ao teste do nado forçado.....	43
Figura 4. Efeito da injeção de AP-7, N-PLA, ODQ ou veículo, depois do PT, no hipocampo de animais submetidos ao teste do nado forçado.....	44
Figura 5. A administração de AP-7 no HV, antes ou após o PT, não modifica o tempo de imobilidade de animais submetidos ao teste do nado forçado	45
Figura 6. Efeito da injeção de AP-7, N-PLA, ODQ ou veículo, antes do T, no hipocampo de animais submetidos ao teste do nado forçado.....	46
Figura 7. Efeitos da administração de AP-7, N-PLA, ODQ ou veículo, intra-HD (n=5-6) ou HV (n=5-9), em ratos expostos ao teste do campo aberto	47
Figura 8. Níveis de NO_x no HD ou HV de animais submetidos ao teste do nado forçado e sacrificados depois PT ou antes ou depois do T	48

SUMÁRIO

RESUMO	8
ABSTRACT	9
LISTA DE ABREVIATURAS	10
LISTA DE FIGURAS	12
1. Introdução	15
1.1 Depressão	15
1.2 Depressão e estresse	16
1.3 Antidepressivos e a neurobiologia da depressão	20
1.4 Glutamato – NO – depressão	24
1.5 Hipocampo e depressão	27
2. Objetivos	33
2.1 Objetivo geral	33
2.2 Objetivos específicos	33
3. Materiais e Métodos	34
3.1 Animais	34
3.2 Drogas	34
3.3 Protocolos experimentais	35
3.3.1 Cirurgia estereotáxica e administração intracerebral de drogas	35
3.3.2 Análise histológica dos sítios de administração de drogas	36
3.3.3 Teste do nado forçado (TNF)	36
3.3.4 Teste do campo aberto (TCA)	37
3.3.5 Determinação de nitrito hipocampal	37
3.4 Desenho experimental	38
3.4.1 Experimento 1: efeito da injeção do CoCl_2 no hipocampo dos animais submetidos ao teste do nado forçado	38

3.4.2 Experimento 2: efeito do bloqueio da via glutamato-NO hipocampal, <u>antes do pré-teste</u> , no HD e no HV de ratos submetidos ao nado forçado -----	38
3.4.3 Experimento 3: efeito do bloqueio da via glutamato-NO hipocampal, <u>após o pré-teste</u> , no HD e no HV de ratos submetidos ao nado forçado -----	39
3.4.4 Experimento 4: análise do perfil dose-resposta induzida pela administração de AP-7 (3, 10, 30 nmoles/0,5µL) intra-HV, antes ou após o pré-teste -----	39
3.4.5 Experimento 5: efeito do bloqueio da via glutamato-NO hipocampal, <u>antes do teste</u> , no HD e no HV de ratos submetidos ao nado forçado -----	39
3.4.6 Experimento 6: efeito do bloqueio da via glutamato-NO hipocampal no HD ou no HV de ratos expostos ao campo aberto -----	39
3.4.7 Experimento 7: quantificação do nitrito hipocampal -----	40
3.5 Análise estatística -----	40
4. Resultados -----	41
4.1 Localização do sítio de injeção -----	41
4.2 Experimento 1: efeito da injeção do CoCl ₂ no hipocampo dos animais submetidos ao teste do nado forçado -----	42
4.3 Experimento 2: efeito do bloqueio da via glutamato-NO hipocampal, <u>antes do pré-teste</u> , no HD e no HV de ratos submetidos ao nado forçado -----	43
4.4 Experimento 3: efeito do bloqueio da via glutamato-NO hipocampal, <u>após o pré-teste</u> , no HD e no HV de ratos submetidos ao nado forçado -----	44
4.5 Experimento 4: análise do perfil dose-resposta induzida pela administração de AP-7 (3, 10, 30 nmoles/0,5µL) intra-HV, antes ou após o pré-teste -----	45
4.6 Experimento 5: efeito do bloqueio da via glutamato-NO hipocampal, <u>antes do teste</u> , no HD e no HV de ratos submetidos ao nado forçado -----	46
4.7 Experimento 6: efeito do bloqueio da via glutamato-NO hipocampal no HD ou no HV de ratos expostos ao campo aberto -----	47
4.8 Experimento 7: quantificação do nitrito hipocampal -----	48
5. Discussão -----	49
6. Conclusões -----	61
7. Bibliografia-----	62

1. Introdução

1.1 Depressão

Da antiguidade à idade contemporânea em que vivemos, a depressão foi alvo das mais diversas interpretações filosóficas, religiosas e sociais, que variavam de acordo com as bases conceituais e ideais particulares de cada época (Gonçalves e Machado 2007). Por exemplo, observamos a depressão na idade média interpretada como um castigo de Deus ante o afastamento do ser a tudo o que era sagrado. Na Idade moderna observou-se um misto de interpretação, onde inicialmente a depressão era vista como algo desejável e louvável (muito característico do período “Romântico”). Ainda na idade média, com o surgimento das idéias e estudos antropocêntricos, essa interpretação baseou-se na ciência e na observação, delineando a depressão como uma doença tratável com trabalho e isolamento social (Gonçalves e Machado 2007).

Mais recentemente, através dos avanços e descobertas nos campos da psicopatologia, farmacologia, fisiologia, anatomia patológica, neurologia e genética, somadas à observação clínica experimental e ao surgimento dos antidepressivos em meados dos anos 1950, a depressão pôde ser entendida como um processo neuropatológico (Gonçalves e Machado 2007). Embora ainda não totalmente compreendida sua neurobiologia, a depressão pode ser classificada, diagnosticada e tratada, a fim de melhor socializar e reinserir o paciente de forma sustentável novamente à sociedade, proporcionando uma melhor qualidade de vida ao mesmo.

Atualmente o DSM IV TR (Manual Diagnóstico e Estatístico de Transtornos Mentais, 4º edição, texto revisado) descreve a depressão como sendo um distúrbio afetivo caracterizado principalmente por um intenso humor deprimido e/ou presença

de anedonia, perda de prazer por algo antes prazeroso (DSM IV TR, 2002). Sintomas esses que, para fins diagnósticos, necessitam somar-se a um conjunto de pelo menos mais quatro dos seguintes sintomas: alterações de sono e apetite, fadiga, alterações motoras, sentimentos de desamparo e culpa, dificuldade de concentração e raciocínio e idéias suicidas. Esses sintomas são reações normais do organismo frente a estressores do dia a dia, porém quando intensos e persistentes por mais de duas semanas a ponto de promover um prejuízo social e/ou produtivo, tornam-se deletérios ao organismo e caracterizam a depressão maior.

A depressão além de ser uma desordem bastante abrangente, atingindo aproximadamente 350 milhões de pessoas em todo o mundo, é uma desordem bastante debilitante, com aproximadamente 1 milhão de casos de suicídios/ano (WHO, world health organization, 2012). Além de tamanha abrangência e agregada característica incapacitante, a depressão apresenta uma importante carga econômica e social, seja na forma de grandes gastos públicos com tratamentos e internações, seja na forma de prejuízo na capacidade intelectual ou menor aproveitamento na esfera do trabalho e serviço prestado à comunidade (Greenberg, Kessler et al. 2003).

1.2 Depressão e estresse

Sabe-se que há uma estreita relação entre depressão e a exposição a eventos estressantes, tais como divórcio, problemas ou perdas familiares, problemas no trabalho ou financeiros, dificuldades de interação social, abuso ou negligência durante a infância, dentre outros (Hasler 2010; Charney e Manji 2004). Há também uma contribuição de fatores genéticos na gênese da depressão, entre 30-40% (Hasler 2010), o que pode resultar em uma maior sensibilidade aos efeitos induzidos

pela exposição a eventos estressantes durante a vida (Kendler, Kessler et al. 1995). Portanto a interação gene-ambiente provavelmente caracteriza a sensibilidade ao estresse e a vulnerabilidade à depressão.

O estresse aumenta a produção e liberação de glicocorticóides na circulação sanguínea (Herman e Cullinan 1997; Sapolsky 2000). O aumento de glicocorticóides, associado ao aumento do tônus simpático, é uma resposta normal e adaptativa do organismo frente a situações estressantes e aversivas. No entanto, a hipercortisolemia crônica pode ser prejudicial ao organismo (Sapolsky 2000). Glicocorticóides são produtos finais da atividade do eixo hipotálamo-pituitária-adrenal (HPA). Tal atividade começa com a ativação de neurônios parvocelulares do núcleo paraventricular do hipotálamo, os quais produzem o fator de liberação da corticotropina (Lightman 2008). Este é liberado na eminência mediana e, através do sistema vascular porta hipotalâmico-hipofisário, chega à porção anterior da hipófise, promovendo a produção de corticotropina pelas células glandulares corticotrópicas. A corticotropina, por sua vez, adentra o sistema circulatório e chega à região cortical da glândula adrenal, onde, então, vai estimular a produção de glicocorticóides. O glicocorticóide liberado na corrente sanguínea atinge regiões cerebrais importantes para a modulação da atividade neuronal do hipotálamo, controlando a atividade do eixo HPA através de mecanismos de retroalimentação negativa. Em pacientes deprimidos o eixo HPA parece estar hiper-reativo e o controle inibitório do mesmo ineficaz (Herman e Cullinan 1997; Joca, Padovan et al. 2003). Isso pode ser observado em dados que descrevem hipercortisolemia em pacientes deprimidos e comprometimento da supressão do eixo, mesmo após administração do corticóide sintético dexametasona (Baumgartner, Graf et al. 1985).

Além de alterações neuroendócrinas, o estresse induz diversas alterações plásticas no sistema nervoso central (SNC). Dentre essas alterações, temos uma diminuição da neuroplasticidade hipocampal, a qual pode ser decorrente de vários fatores: diminuição da neurogênese, diminuição populacional dos espinhos dendríticos, diminuição da arborização dendrítica e do comprimento axonal (Maras e Baram 2012; Huether, Doering et al. 1999; Sapolsky 2000; Warner-Schmidt e Duman 2006; Pittenger e Duman 2008). Acredita-se que todas essas modificações levam à atrofia hipocampal observada, através de estudos de ressonância magnética e estudos pós-morte, em pacientes deprimidos (Campbell e Macqueen 2004). Alterações na expressão de moléculas importantes para a plasticidade hipocampal são observadas com a exposição a eventos estressantes (Duman e Aghajanian 2012; Lee e Kim 2012; Nestler, Barrot et al. 2002; Castren 2005; Lu, Pang et al. 2005; Krishnan e Nestler 2008). Essas alterações parecem explicar, pelo menos em parte, o déficit plástico e estrutural encontrado no hipocampo de indivíduos deprimidos. Uma das moléculas mais estudadas é o BDNF (brain derived neurotrophic factor), o qual é uma das neurotrofinas mais abundantes no SNC (Lee e Kim., 2010).

Corticóides, quando em excesso, tornam-se prejudiciais e desencadeiam uma série de prejuízos plásticos hipocampusais, dentre os quais podemos citar atrofia de processos dendríticos, diminuição da neurogênese e, em situações extremas, até mesmo morte neuronal (Sapolsky 2000). O hipocampo é uma estrutura bastante rica em receptores para glicocorticóides e uma das estruturas cerebrais importantes para o controle da atividade do eixo HPA (Chao, Choo et al. 1989; Herman e Cullinan 1997). Portanto, o aumento excessivo de glicocorticóides, frente a situações

aversivas recorrentes ou contínuas, contribuiria para o desenvolvimento dos prejuízos na neuroplasticidade hipocampal.

Antidepressivos restauram o controle inibitório sobre o eixo HPA (Nestler, Barrot et al. 2002; Juruena, Cleare et al. 2004), ao passo que promovem uma maior plasticidade hipocampal, como aumento da arborização dendrítica e da neurogênese (Snyder, Soumier et al., 2011; Santarelli, Saxe et al. 2003; Sairanen, Lucas et al. 2005; Bessa, Ferreira et al. 2009). Consistente com a restauração das funções hipocampais, a partir de tratamento crônico com antidepressivos, pacientes deprimidos, responsivos ao tratamento, apresentam melhoras em tarefas cognitivas dependentes da integridade hipocampal, as quais se encontravam antes prejudicadas (Nestler, Barrot et al. 2002).

Através do prévio conhecimento dessa interação estresse-depressão, diversos modelos animais foram criados baseados na apresentação de um agente estressor ao animal, para o estudo da neurobiologia da depressão, com o intuito de buscar uma translação entre a pesquisa básica e a pesquisa clínica. Em todos os modelos criados, drogas antidepressivas revertem e/ou impedem os efeitos induzidos pelo estresse. Cada modelo apresenta particular validade de face, constructo e valor preditivo (Nestler e Hyman 2010; Cryan, Markou et al. 2002). Portanto, não há um modelo animal ideal de depressão, mas sim, há modelos animais que se utilizam de uma determinada característica fenomenológica observável e mensurável, a qual de alguma maneira aparenta semelhança com a face clínica da depressão.

Por várias circunstâncias (simples, barato e rápido), o modelo animal de depressão mais utilizado na pesquisa básica é o teste do nado forçado (TNF). Criado em 1977, o TNF apresenta uma ótima validade preditiva a ação de drogas

antidepressivas, possibilitando o estudo da neurobiologia da depressão, consequentemente o estudo de novos alvos terapêuticos e por fim o estudo de potenciais novas drogas antidepressivas. No teste, o rato é exposto por 15 minutos ao estresse do nado forçado e inescapável (PT, pré-teste), e no dia seguinte (T, teste) é avaliado o tempo de imobilidade do animal por um total de 5 min (Porsolt, Le Pichon et al. 1977). Animais tratados com antidepressivos, substâncias clinicamente utilizadas no tratamento da depressão do humor, apresentam menor tempo de imobilidade durante o teste. Assim, neste texto vamos adotar o termo “tipo-antidepressivo” para descrever os efeitos dos tratamentos que também reduzam o tempo de imobilidade no TNF. Inicialmente, essa resposta comportamental de imobilidade foi chamada de desespero comportamental, pois se acreditava que o animal, em condições normais, no dia do PT, aprende que o nado é uma situação aversiva e inescapável, então, no dia seguinte apresenta uma resposta de desesperança motivacional (ausência de motivação para o comportamento direcionado ao escape), resultando em uma falha no comportamento direcionado à tentativa de fuga (Porsolt, Le Pichon et al. 1977). No entanto, a imobilidade também pode refletir exaustão ou mesmo tentativa de poupar energia frente ao estresse inescapável (Petit-Demouliere, Chenu et al. 2005). Assim, embora não haja muita semelhança entre esse comportamento e os sinais clínicos da doença, o modelo apresenta uma boa validade preditiva, o que tem justificado sua ampla utilização (Cryan et al., 2002).

1.3 Antidepressivos e a neurobiologia da depressão

Embora hoje tenhamos essas diversas vertentes, descritas anteriormente, abrangendo a neurobiologia da depressão, somente na década de 1950 foram

descobertas as primeiras drogas antidepressivas (Elhwuegi 2004). Em 1952, Selikoff observou melhora do humor em pacientes tuberculosos tratados com iproniazida (Selikoff e Robitzek 1952). Nesse mesmo ano, Zeller e colaboradores desvendaram o mecanismo de ação da iproniazida como um inibidor da monoamina oxidase (MAO), enzima que degrada as monoaminas serotonina, noradrenalina e dopamina (Zeller e Barsky 1952). Posteriormente, em 1958, Kline confirmou efeito antidepressivo da iproniazida em pacientes deprimidos (Kline 1958). Paralelo a esses achados, em 1958, Roland Kuhn observou uma grande semelhança estrutural da imipramina com a clorpromazina, a qual estava sendo utilizada na clínica como um antipsicótico. Ao testar o potencial antipsicótico da imipramina, Kuhn observou uma melhora nos sintomas negativos de pacientes esquizofrênicos. Posteriormente Kuhn confirmou, com sucesso, um potencial efeito terapêutico antidepressivo em pacientes deprimidos (Kuhn 1958). Em 1961, Axelrod verificou que a imipramina tinha a capacidade de bloquear a recaptação de noradrenalina (Axelrod, Whitby et al. 1961) e em 1968, Arvid Carlsson descobriu a capacidade da imipramina em bloquear a recaptação de serotonina (Carlsson, Fuxe et al. 1968). No final da década de 70 surgiram os inibidores seletivos da recaptação de serotonina (ISRS), os quais induzem significativo efeito antidepressivo e menos efeitos colaterais, quando comparados a qualquer outra classe de medicamentos antidepressivos (Fuller, Perry et al. 1974; Benkert, Laakmann et al. 1977; Wong e Bymaster 1995; Wong, Bymaster et al. 1995; Carlsson e Wong 1997).

Baseado nos mecanismos de ação das drogas antidepressivas, Schildkraut propôs, em 1965, a primeira teoria relacionada à fisiopatologia da depressão, conhecida como a hipótese monoaminérgica da depressão (Schildkraut 1965). Esta propõe que tal desordem do humor seria causada por uma deficiência de

monoaminas em importantes regiões do SNC. Porém, tal teoria falha em explicar o fato que apenas 50-60% dos pacientes respondem satisfatoriamente ao tratamento antidepressivo (Belmaker e Agam 2008). Além disso, essa hipótese também não explica o fato de que sinais clínicos de melhora aparecem somente de 2 a 4 semanas após o início do tratamento (Blier 2003).

Em 1983, Blier e Montigny verificaram que, inicialmente, drogas antidepressivas promoviam uma inibição dos disparos sinápticos de neurônios do núcleo dorsal da rafe (NDR) que projetavam para o prosencéfalo, incluindo a região do hipocampo (Blier e De Montigny 1983). Este efeito agudo era ocasionado pela ativação de receptores inibitórios 5HT_{1a} somatodendríticos a partir de uma maior disponibilidade de serotonina no NDR. Em contrapartida, o uso crônico de antidepressivos promove uma dessensibilização desses receptores somatodendríticos, aumentando os disparos sinápticos de neurônios do NDR e, por consequência, a transmissão sináptica serotoninérgica hipocampal. Além disso, o uso crônico de antidepressivos aumenta a expressão e a eficiência de transdução de sinal de receptores hipocampais pós sinápticos do tipo 5HT_{1a}, os quais parecem ser importantes para a eficácia do efeito antidepressivo. Todas essas alterações moleculares parecem ser necessárias para o início do efeito terapêutico dos antidepressivos, já que coincidem temporalmente com o início da melhora dos sintomas clínicos do paciente deprimido. Portanto, a necessidade de tais alterações para o efeito antidepressivo parece contribuir para o surgimento da latência usualmente observada entre o início da utilização dessas drogas e a melhora clínica.

Portanto, houve um direcionamento da hipótese monoaminérgica clássica para uma hipótese complementar e mais ampla, a hipótese química e molecular da depressão. Esta se baseia na modulação de receptores e moléculas de sinalização

intracelulares induzidas por drogas clinicamente consideradas antidepressivas e explica, pelo menos em parte, a latência para o efeito terapêutico de tais drogas.

Em seguida, surgiram trabalhos demonstrando que a depleção dos níveis sistêmicos de monoaminas impede ação terapêutica dos antidepressivos, ou promove a recaída aos sintomas depressivos em pacientes responsivos ao tratamento clínico (Delgado, Charney et al. 1990; Miller, Delgado et al. 1996; Miller, Delgado et al. 1996). Porém, essa depleção não originou sintomas depressivos em pacientes saudáveis e não piorou o quadro clínico de pacientes deprimidos. Portanto, logo se observou que tal teoria ainda continuava a não explicar satisfatoriamente a neurobiologia da depressão, pois ainda concentrava-se na idéia da deficiência de monoaminas no SNC como causa principal do humor deprimido (Heninger, Delgado et al. 1996).

Mais recentemente, foi proposto que o efeito comportamental produzido com a administração de drogas antidepressivas parece depender e coincidir temporalmente com o processo de maturação celular que se sucede à indução da neurogênese hipocampal pelo uso crônico de antidepressivos (Santarelli, Saxe et al. 2003). Trabalhos posteriores evidenciaram, porém, que drogas antidepressivas além de promoverem um aumento da proliferação celular hipocampal e/ou aumento da taxa de sobrevivência desses recentes neurônios, aumenta também a taxa de apoptose de neurônios já estabelecidos (Sairanen, Lucas et al. 2005). Portanto, na verdade os antidepressivos estariam promovendo uma importante renovação celular na rede de conexão entre o giro denteado do hipocampo e a região CA3 do mesmo. Outros trabalhos, porém, não observaram nenhuma relação causal entre efeito comportamental e neurogênese hipocampal na eficácia de drogas antidepressivas, observando, contudo, um possível importante remodelamento sináptico e dendrítico

hipocampal (Bessa, Ferreira et al. 2009). Portanto, o efeito terapêutico de antidepressivos parece estar relacionado à renovação celular hipocampal somada à renovação de ramos axonais e contatos sinápticos (Castren 2005). Todos esses processos plásticos dependem da integridade do sistema BDNF e TrkB, seu receptor (Castren 2004; Pittenger e Duman 2008). Isso é corroborado por inúmeros trabalhos que demonstram que o estresse diminui enquanto o uso crônico de antidepressivos aumenta, os níveis hipocampais de BDNF (Nibuya, Morinobu et al. 1995). Tais evidências caracterizam a hipótese neurotrófica ou neuroplástica da depressão.

1.4 Glutamato – NO – depressão

Em uma tentativa de melhor se entender a neurobiologia da depressão e propor à clínica a utilização de novas drogas antidepressivas com melhor perfil quanto à eficácia e eficiência terapêutica, recentemente tem se estudado a via Glutamato-NMDA-NO do SNC (Sanacora, Treccani et al., 2012). Em tal via, primeiramente o receptor glutamatérgico do tipo NMDA (RNMDA) é ativado pela ligação com glutamato, promovendo influxo de cálcio (Snyder e Ferris 2000). Este por sua vez se liga a calmodulina, formando o complexo cálcio-calmodulina. Este complexo ativa a óxido nítrico sintase neuronal (nNOS), a qual catalisa a conversão de L-arginina em L-citrulina e produz óxido nítrico (NO). O NO se liga a guanilato ciclase solúvel (GCs), ativando-a, para em seguida transformar GTP em cGMP. Tanto o cGMP formado por último quanto o NO formado anteriormente apresentam diversas funções, dentre as quais podemos destacar a ativação de proteínas quinases e a modulação de diversas vias de sinalização intracelular (Garthwaite 2008).

Diversos trabalhos presentes na literatura relacionam o bloqueio da via NMDA-NO-cGMP com efeito do tipo antidepressivo observados em modelos animais. Por exemplo, administração sistêmica de antagonista competitivo (AP-7) ou não competitivo (MK-801) do RNMDA promove efeito tipo-antidepressivo em animais submetidos a diferentes modelos (Trullas e Skolnick 1990; Petrie, Reid et al. 2000). De maneira semelhante, a administração sistêmica de inibidores da nNOS ou da GCs (ODQ) também promove efeito tipo-antidepressivo em diferentes modelos animais, incluindo o TNF (Wegener, Harvey et al., 2010; Trullas e Skolnick 1990; Yildiz, Erden et al. 2000; Heiberg, Wegener et al. 2002).

Além do efeito antidepressivo induzido em animais, em testes clínicos observou-se que a administração de ketamina produz um importante efeito antidepressivo que perdura por até uma semana e é observado já nas primeiras duas horas após uma única infusão intravenosa (Zarate, Singh et al. 2006). Além disso, a administração crônica de azul de metileno (inibidor da NOS e da GCs) em pacientes deprimidos promoveu significativa melhora no humor desses indivíduos (Naylor, Smith et al. 1987). Consistente com os dados farmacológicos acima, Suzuki e colaboradores encontraram níveis plasmáticos aumentados de nitrato (metabólito do NO) em pacientes deprimidos (Suzuki, Yagi et al. 2001). Outro estudo bastante relevante aponta evidências de aumento da expressão da enzima nNOS na região CA1 do hipocampo direito de indivíduos deprimidos (Oliveira, Guimaraes et al. 2008).

Semelhante à administração sistêmica, a injeção intra-hipocampo dorsal de AP-7 (antagonista RNMDA), de 7NI (inibidor da nNOS) ou de ODQ induz efeito tipo-antidepressivo no TNF, indicando que o hipocampo seria um importante sítio de ação dessas drogas (Padovan e Guimaraes 2004; Joca e Guimaraes 2006).

Diversos trabalhos evidenciam ainda que, após exposição animal a estressores, há um aumento na liberação de glutamato e de óxido nítrico na fenda sináptica hipocampal, assim como uma diminuição da captação glial de glutamato extracelular (de Vasconcellos-Bittencourt, Vendite et al., 2011; Musazzi, Racagni et al., 2011; Sanacora, Treccani et al., 2011; Li, Chen et al. 2007). A partir de estudos animais observou-se que o estresse altera conexões e circuitos sinápticos, em sua maioria de natureza glutamatérgica, nas mesmas regiões que demonstram mudanças volumétricas em pacientes deprimidos (Sanacora, Treccani et al., 2011). Dessa forma, associa-se a disfunção do sistema glutamatérgico com as mudanças morfológicas do SNC observadas em pacientes deprimidos e em modelos animais de exposição ao estresse.

Diversas classes de antidepressivos reduzem a probabilidade de liberação de glutamato em sinaptossomas originados a partir do córtex pré-frontal de animais expostos a choque nas patas (Musazzi, Milanese et al., 2010; Musazzi, Racagni et al., 2011). Outro trabalho encontrou que os antidepressivos imipramina e venlafaxina diminuíram os níveis de nitrito e nitrato em cérebro de animais (Krass, Wegener et al., 2011). Ainda, o tratamento crônico com reboxetina ou fluoxetina diminuiu a expressão de receptores NMDA contendo o subtipo NR1 em sinaptossomas originados a partir de tecido hipocampal (Pittaluga, Raiteri et al. 2007). Portanto, esses trabalhos sugerem que a dessensibilização da via NMDA-NO no SNC poderia ser um efeito final comum a diferentes fármacos antidepressivos, estando possivelmente relacionado a seus efeitos terapêuticos (Li, Zhang et al. 2006).

Além disso, assim como os antidepressivos, o tratamento crônico com antagonistas de receptores glutamatérgicos do tipo NMDA ou com inibidores da

nNOS previne os efeitos plásticos induzidos pelo estresse (Sanacora, Treccani et al.).

1.5 Hipocampo e depressão

O hipocampo pertence ao sistema límbico, é uma estrutura sub-paleocortical, bilateral e umas das estruturas prosencefálicas mais estudadas no que concerne a neurobiologia da depressão (Nestler, Barrot et al. 2002; Joca, Padovan et al. 2003; Maletic, Robinson et al. 2007; Krishnan e Nestler 2008). Estudos de ressonância magnética apontam para uma diminuição da estrutura hipocampal de pacientes deprimidos, principalmente a parte hipocampal presente no hemisfério esquerdo (Campbell e Macqueen 2004). Estudos clínicos de neuroimagem funcional mostram que pacientes deprimidos não respondedores à fluoxetina permanecem com um alto metabolismo hipocampal, enquanto que pacientes respondedores ao tratamento apresentam uma diminuição do metabolismo hipocampal (Mayberg, Brannan et al. 2000). Esses estudos de neuroimagem in vivo, quando somados aos estudos descritos nos tópicos anteriores, reforçam o papel de uma possível disfunção hipocampal na etiologia da depressão.

Ultimamente há uma tendência em caracterizar o hipocampo de acordo com suas particularidades sub-regionais, principalmente entre a porção dorsal (HD) e ventral (HV) do mesmo. O HD apresenta conexões eferentes e aferentes com estruturas relacionadas com funções exploratórias tais como, locomoção, orientação de movimentos e direção espacial, p. ex. conexões com núcleos mamilares, parte reticulada da substância nigra, subiculum dorsal, complexo talâmico anterior, área tegmental ventral, dentre outras regiões (Fanselow e Dong 2010; Segal, Richter-Levin et al., 2010); enquanto que o HV apresenta conexões eferentes e aferentes

com estruturas relacionadas com a regulação neuroendócrina e autonômica em resposta a experiências emocionais, e também, com o controle geral de estados afetivos, p. ex. conexões com subiculum ventral, núcleo do leito da estria terminal, amígdala, córtex pré-frontal medial, núcleo accumbens, dentre outras regiões (Fanselow e Dong 2010; Segal, Richter-Levin et al., 2010).

Tais diferenças anatômicas parecem refletir em diferenças funcionais importantes entre o HD e HV (Bannerman, Rawlins et al. 2004). Kjelstrup e colaboradores (2002) observaram que lesões do HV aumentaram a exploração dos braços abertos no labirinto em cruz elevado (LCE), um efeito ansiolítico, sem promover alterações em testes de memória. Por outro lado, lesões do HD prejudicaram a memória espacial animal no labirinto de Morris (Kjelstrup, Tuvnes et al. 2002), mas não modificaram o comportamento dos animais no LCE. Além disso, foi observado que a inativação temporária do HV através da administração de lidocaína ou mesmo o bloqueio de RNMDA, promoveu efeito ansiolítico quando os animais eram expostos pela primeira vez ao LCE, enquanto que os mesmos tratamentos no HD afetaram o comportamento dos animais apenas quando estes eram re-expostos ao aparato (Bertoglio, Joca et al. 2006; Nascimento Hackl e Carobrez 2007). Portanto, esses trabalhos sustentam a hipótese de que o HD estaria mais envolvido na modulação de processos cognitivos, enquanto o HV modularia a resposta emocional ao estresse (Bannerman, Rawlins et al. 2004).

De fato, há evidências de que lesões do HD assemelharam-se a lesões completas do hipocampo ao prejudicar a memória de trabalho no labirinto radial (Pothuizen, Zhang et al. 2004). Outro trabalho verificou que somente 20% de todo hipocampo é suficiente para memória espacial no labirinto de Morris, desde que a principal área poupada seja o HD (Moser, Moser et al. 1995). Consistente com o

envolvimento do HV na modulação de respostas ao estresse, em 1990, Henke descreveu um aumento no surgimento de úlceras gástricas, causadas pelo estresse de restrição realizado a 4°C, somente quando o HV do animal era lesado (Henke 1990).

Trabalhos de eletrofisiologia dão sustentação à distinta função em torno do eixo septo-temporal hipocampal, pois evidenciam um aumento da LTP (potenciação de longo prazo) e diminuição da LTD (depressão de longo prazo) no HV, mas uma diminuição da LTP e reforço da LTD no HD, em animais expostos ao estresse de nado forçado (Maggio e Segal 2007; Maggio e Segal 2009). LTP é o aumento na eficiência de transmissão sináptica que ocorre após estimulação neuronal de alta frequência, enquanto a LTD é a diminuição na eficiência de transmissão sináptica que ocorre após estímulo neuronal de baixa frequência. Ambos os mecanismos estão relacionados com plasticidade sináptica e acredita-se que também sejam um substrato fisiológico para aprendizagem e memória (Segal, Richter-Levin et al., 2010). Portanto, esses dados evidenciam uma ativação ou maior eficiência sináptica do HV como consequência à exposição a um estressor imediato.

Portanto, baseado nas diferenças funcionais, estruturais e eletrofisiológicas descritas acima, o hipocampo dorsal parece estar mais relacionado a processos cognitivos e sensoriais tais como aprendizagem espacial e memória, sendo então, importante em processos de locomoção, exploração e navegação espacial; enquanto que o hipocampo ventral parece estar mais relacionado à resposta ou ao controle tanto hormonal quanto motivacional e emocional ao estresse, sendo então, importante em diversas desordens afetivas.

No entanto, Apesar da recente tendência em separar o hipocampo em duas sub-regiões funcionalmente distintas, sabe-se que tal distinção não é de todo

simples e algumas funções parecem compartilhadas por ambas as sub-regiões. Corroborando essa assertiva, temos que lesões do HD também podem prejudicar respostas emocionais ao estresse, em particular no teste do medo condicionado ao contexto, mas não ao som (Kim e Fanselow 1992). Porém, outros dois trabalhos mostram que uma possível dicotomia com relação à importância funcional do HD ou HV, no medo condicionado, não seja tão consistente ou de fácil compreensão, e depende da neurotransmissão envolvida ou das sub-regiões encontradas no HD e HV (Czerniawski, Ree et al., 2012; Hunsaker e Kesner 2008). Um desses trabalhos observou que ao bloquear RNMDA do HV houve prejuízo da aquisição e da evocação da resposta de congelamento, seja contexto ou pista (som) dependente (Czerniawski, Ree et al., 2012). Nesse mesmo trabalho, prejuízo temporário da atividade glutamatérgica do HD promoveu somente uma aquisição inadequada da resposta emocional, contexto ou pista dependente. Outro trabalho, ao utilizar lesões excitotóxicas, verificou que somente lesões intra HD promoveram um déficit na aquisição da resposta emocional no medo condicionado ao contexto (Hunsaker e Kesner 2008). Lesões do HD ou do HV não promoveram qualquer prejuízo na aquisição da resposta emocional condicionada ao som. Lesões do HD apresentaram mais consistentes prejuízos na evocação de respostas emocionais condicionadas ao contexto, enquanto que somente lesões do HV demonstraram prejuízo na evocação da resposta condicionada ao som.

Até recentemente, os estudos relacionando a função hipocampal com a neurobiologia da depressão sempre abordavam o mesmo como um todo, ou somente o hipocampo dorsal. Por exemplo, Petty e Sherman (1981) relatam que animais desamparados (comportamento tipo depressivo) apresentam diminuição do conteúdo de GABA e aumento dos níveis de glutamato no hipocampo, sem

diferenciar suas sub-regiões (Petty e Sherman 1981). Tal abordagem tem sido observada mesmo em trabalhos mais recentes, onde estudos moleculares com animais estressados e/ou tratados com antidepressivos não abordaram a diferença entre HD e HV (Yang, Hu et al.; Joca, Padovan et al. 2003; Padovan e Guimaraes 2004; Joca e Guimaraes 2006; Heldt, Stanek et al. 2007; Resstel, Joca et al. 2008). Por outro lado, para os pesquisadores Blier e De Montigny o efeito comportamental de drogas antidepressivas estaria mais relacionado a indução de alterações neuroquímicas e moleculares nos sistemas serotoninérgico e noradrenérgico do hipocampo dorsal, sem no entanto terem avaliado uma possível participação do HV (Mongeau, De Montigny et al. 1994; Pineyro, Blier et al. 1994; Mongeau, Blier et al. 1997). De maneira semelhante, para Graeff e colaboradores (1996), a neurotransmissão serotoninérgica do HD seria importante para mediar adaptação ao estresse inescapável e sua disfunção estaria associada ao aparecimento da depressão (Graeff, Guimaraes et al. 1996). Corroborando esses dados, há evidências de que a manipulação farmacológica de diferentes sistemas de neurotransmissão no HD, incluindo o sistema serotoninérgico, noradrenérgico e glutamatergico, modifica o comportamento de animais submetidos a testes preditivos de efeitos antidepressivos (Joca, Padovan et al. 2003; Padovan e Guimaraes 2004; Joca e Guimaraes 2006; Joca, Zanelati et al. 2006; Joca, Ferreira et al. 2007). No entanto, esses trabalhos não avaliaram a participação da porção ventral do hipocampo nos comportamentos analisados.

Há, contudo, trabalhos que sugerem que o HV também esteja envolvido na neurobiologia da depressão. Nesse sentido, há evidências de que o efeito tipo-antidepressivo de algumas drogas ocorra associado a um aumento da neurogênese no HV, mas não no HD (Felice, O'Leary et al., 2012; O'Leary, O'Connor et al., 2012;

Banasr, Soumier et al. 2006). Por outro lado, fatores ambientais como o estresse (Ho e Wang, 2010) ou o enriquecimento ambiental (Tanti, Rainer et al., 2012) podem alterar a neurogênese especificamente no HD. Portanto, esses dados sugerem que tanto o HD quanto o HV poderiam estar envolvidos na modulação de funções relacionadas à neurobiologia da depressão.

Diante do exposto, torna-se interessante investigar se haveria diferenças funcionais entre as sub-regiões dorsal e ventral do hipocampo na modulação de comportamentos desencadeados por estresse inescapável e relacionados à neurobiologia da depressão. Além disso, considerando a predominância da via glutamatérgica no hipocampo (Vizi e Kiss 1998), seria interessante avaliar se a manipulação farmacológica desse sistema de neurotransmissão no HD ou no HV evidenciaria possíveis diferenças funcionais entre essas sub-regiões, em testes preditivos de efeitos antidepressivos.

2. Objetivos

2.1 Objetivo geral

Estudar a participação do hipocampo dorsal e do hipocampo ventral, bem como das neurotransmissões glutamatérgica e nitrérgica presentes nessas estruturas, sobre a expressão do comportamento de ratos expostos ao estresse do nado forçado.

2.2 Objetivos específicos

- Investigar os efeitos da inativação temporária do HV e do HD sobre a expressão do comportamento de ratos expostos ao teste do nado forçado.
- Investigar a participação dos receptores glutamatérgicos do tipo NMDA do HV e do HD sobre a expressão do comportamento de ratos expostos ao teste do nado forçado.
- Investigar o envolvimento do óxido nítrico do HV e do HD sobre a expressão do comportamento de ratos expostos ao teste nado forçado.
- Investigar o envolvimento da via de sinalização do óxido nítrico do HV e do HD sobre a expressão do comportamento de ratos expostos ao teste do nado forçado.

3. Materiais e métodos

3.1 Animais

Foram utilizados ratos Wistar, 220-270g, provenientes do Biotério Central USP, Campus de Ribeirão Preto. Os animais foram mantidos aos pares, em caixas de acrílico (570 cm²), no Laboratório de Farmacologia da Faculdade de Farmácia da Universidade de São Paulo (FCFRP-USP), em condições controladas: temperatura ($24 \pm 1^\circ\text{C}$), ciclo de luz (acesas das 6:00 às 18:00 horas), sem privação de alimento e água, exceto durante a realização do experimento. Os procedimentos foram conduzidos de acordo com as diretrizes da Sociedade Brasileira de Neurociências e Comportamento sobre os cuidados com animais de laboratório, que estão de acordo com as leis e políticas internacionais. Ademais, o presente projeto foi avaliado e aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) do Campus de Ribeirão Preto (Protocolo no. 08.1.1133.53.4).

3.2 Drogas

Foram utilizadas as seguintes drogas:

- Cloreto de cobalto, CoCl_2 (Sigma): bloqueador de canais de cálcio voltagem dependente, dissolvido em salina isotônica estéril e administrado através de injeção intra-HV ou intra-HD, bilateral, na concentração de 1mM (Resstel, Joca et al. 2008).
- DL-2-Amino-7-phosphonoheptanoic acid, AP7 (Tocris): antagonista seletivo do receptor glutamatérgico NMDA, dissolvido em salina isotônica estéril e administrado através de injeção intra-HV ou intra-HD, bilateral, na dose de 10nmoles/0,5 μL /lado (Guimaraes, Carobrez et al. 1991; Padovan e Guimaraes 2004).
- N ω -propil-L-arginina, N-PLA (Tocris): inibidor seletivo da nNOS, dissolvido em salina isotônica estéril e administrado através de injeção intra-HV ou intra-HD, bilateral, na dose de 0,01nmol/0,5 μL /lado (Resstel, Correa et al. 2008).

- 1-H-[1,2,4] oxadiazole[4,3-a] quinoxalin-1-one, ODQ (Sigma): inibidor da GCs, dissolvido em dimetil-sulfoxido (DMSO: em salina, Gold Lab) 100% e administrado através de injeção intra-HV ou intra-HD, bilateral, na dose de 1nmol/0,5µL/lado (dados não publicados).

Além disso, foram utilizados durante os procedimentos cirúrgicos: tribromoetanol (Aldrich 2,5%, 1 mL/100g), Banamine (Schering-Plough, 0,25%, 0,1 mL/100g), Lidocaína (PROBEM 3%, 0,2 ml) e pentabiotico veterinário (Fort Dodge, 1.200.000UI, 0,1ml/100g) contendo Benzilpenicilinabenzatina 600.000UI, Benzilpenicilina procaína 300.000UI, Benzilpenicilinapotassica 300.000UI, Diidroestreptomicina base (sulfato) 250mg e Estreptomicina base (sulfato) 250mg.

3.3 Protocolos experimentais

3.3.1 Cirurgia estereotáxica e administração intracerebral de drogas

Os ratos foram anestesiados com tribromoetanol (i.p, dose de 1 ml/100g) e fixados na armação estereotáxica. Uma cânula guia (11mm OD) de aço inoxidável foi implantada bilateralmente e direcionada para o HV (coordenadas: Anteroposterior: -5mm, lateral: -5,2mm, vertical: -4mm) e para o HD (coordenadas: Antero-posterior: -4mm, lateral: -2,8mm, vertical: -2,1mm), de acordo com o atlas de Paxinos e Watson, 1997. A ponta da cânula alocou-se 2,0mm acima do local da injeção (HV) e 1,5mm (HD). A mesma foi presa ao osso do crânio por parafuso de aço e cimento acrílico. Um mandril foi colocado na cânula guia para evitar sua obstrução. Após os procedimentos cirúrgicos, os animais receberam administração de pentabiotico veterinário (i.m., 0,1mL/100g) e do antiinflamatório Banamine (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 às suas gaiolas, onde permaneceram em repouso

por 5-7 dias, até o início dos experimentos. Posteriormente, foram realizados os experimentos comportamentais e as injeções intra-cerebrais, as quais foram administradas com auxílio de agulhas dentárias (0.3mm OD) que foram introduzidas bilateralmente através da cânula guia (2,0mm abaixo do fim da cânula – HV ou 1,5mm – HD). Foi injetado um volume de 0.5µL/lado, durante 1 minuto, usando uma micro-seringa controlada por uma bomba de infusão.

3.3.2 Análise histológica dos sítios de administração de drogas

Ao término dos experimentos comportamentais, os ratos foram anestesiados com hidrato de cloral 5% (i.p, 1ml/100g) e logo em seguida, uma agulha dentária foi inserida na cânula guia e 0,2µl do corante azul de metileno foram injetados bilateralmente, para posteriormente, os animais serem perfundidos com salina isotônica, seguida por solução de formalina 10%. Os cérebros foram removidos e imersos em solução de formalina 10%, a fim de serem posteriormente (3-4 dias) seccionados em criostato (Cryocut 1800, -18°C) numa espessura de 40µm. 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 encontrou-se fora do HV ou do HD.

3.3.3 Teste do nado forçado (TNF)

O teste do nado forçado é usado para verificar os efeitos comportamentais induzidos por drogas antidepressivas que, neste caso, são evidenciados através da redução da imobilidade durante o teste (Porsolt, Le Pichon et al. 1977). O procedimento consistiu em colocar os animais para nadar, individualmente, em um cilindro de plástico (30 cm de diâmetro, 40 cm de altura), contendo 25 cm de água

com temperatura de $24 \pm 1^\circ\text{C}$, por um período de 15 min (pré-teste, PT; adaptado de Joca & Guimaraes 2006). Após esse período, os animais foram retirados e colocados, separadamente, para secar, antes de retornarem para suas caixas de origem. Vinte e quatro horas depois, os animais foram re-expostos a 5 minutos de nado forçado (teste, T), quando se registrou o tempo total de imobilidade de maneira cega. A imobilidade foi registrada quando o animal permanecia parado, realizando apenas pequenos movimentos necessários para a flutuação. A água foi trocada entre as sessões de nado para evitar a influência de substâncias de alarme (Abel and Bilitzke 1990).

3.3.4 Teste do campo aberto (TCA)

O teste do campo aberto é usado para verificar os efeitos locomotores induzidos por drogas. O teste consiste em colocar os animais para se locomoverem livremente, individualmente, no centro de uma caixa quadrada de madeira (72cm x 72cm, 40cm de altura), dividida em 16 quadrantes (18cm x 18cm), por um período de 5 min. Durante esse período, foram contados os números de cruzamentos que o animal fez entre os quadrantes, sendo que cada cruzamento somente foi contado quando o animal atravessou com as quatro patas de um quadrante para o outro (Nascimento, Zangrossi et al., 2010).

3.3.5 Determinação de nitrito hipocampal

Os tecidos dos animais submetidos ao TNF foram macerados em tampão Tris-HCl 20mM pH 8.0, seguido por centrifugação a 20.000 g por 10 min. Após a centrifugação, o sobrenadante foi incubado overnight com a enzima nitrato redutase (Sigma) e NADPH (Sigma) a 37°C . As concentrações de NO_x foram obtidas

incubando-se 70µL de cada amostra com 40µL do reagente de Griess (kit para determinação de nitrito, Invitrogen). Após período de incubação de 30 min à temperatura ambiente, quantificou-se a absorbância de cada amostra a 540nm (espectrofotômetro Victor X3, Perkin Elmer). A determinação dos níveis de nitrito presentes em cada amostra foi feita subtraindo-se os valores de absorbância inespecífica da absorbância bruta e, em seguida, calculando a concentração em µM com base na curva padrão de nitrito de sódio. Posteriormente, foi feita ainda a normalização dos dados pela concentração de proteínas totais quantificada pelo método colorimétrico de Bradford (BioRad). Os valores finais foram expressos em µM de nitrito/ug proteínas totais.

3.4 Desenho experimental

3.4.1 Experimento 1: efeito da injeção do CoCl_2 no hipocampo dos animais submetidos ao teste do nado forçado

Os animais foram submetidos à cirurgia estereotáxica para implantação de cânulas no HD ou no HV. Cinco a sete dias depois, os animais foram expostos ao PT e 24 h depois ao T. Em grupos independentes de animais, a administração de CoCl_2 ou veículo ocorreu em 3 momentos: 10 min antes do PT, após o PT ou 10 min antes do T.

3.4.2 Experimento 2: efeito do bloqueio da via glutamato-NO hipocampal, antes do pré-teste, no HD e no HV de ratos submetidos ao nado forçado

Os animais foram submetidos à cirurgia estereotáxica para implantação de cânulas no HD ou no HV. Cinco a sete dias depois, os animais foram expostos ao PT e 24 h depois ao T. Animais receberam infusão bilateral de AP-7, N-PLA, ODQ ou veículo 10 min antes do PT. Em grupos independentes de animais, a administração das drogas ocorreu intra HD ou HV.

3.4.3 Experimento 3: efeito do bloqueio da via glutamato-NO hipocampal, após o pré-teste, no HD e no HV de ratos submetidos ao nado forçado

Os animais foram submetidos à cirurgia estereotáxica para implantação de cânulas no HD ou no HV. Cinco a sete dias depois, os animais foram expostos ao PT e 24 h depois ao T. Animais receberam infusão bilateral de AP-7, N-PLA, ODQ ou veículo imediatamente após o PT. Em grupos independentes de animais, a administração das drogas ocorreu intra HD ou HV.

3.4.4 Experimento 4: análise do perfil dose-resposta induzida pela administração de AP-7 (3, 10, 30 nmoles/0,5µL) intra-HV, antes ou após o pré-teste

Os animais foram submetidos à cirurgia estereotáxica para implantação de cânulas no HD ou no HV. Cinco a sete dias depois, os animais foram expostos ao PT e 24 h depois ao T. Animais receberam infusão bilateral de AP-7 nas doses de 3, 10 ou 30 nmoles/0,5µL ou veículo, antes ou após o PT. Em grupos independentes de animais, a administração da droga ocorreu intra HD ou HV.

3.4.5 Experimento 5: efeito do bloqueio da via glutamato-NO hipocampal, antes do teste, no HD e no HV de ratos submetidos ao nado forçado

Os animais foram submetidos à cirurgia estereotáxica para implantação de cânulas no HD ou no HV. Cinco a sete dias depois, os animais foram expostos ao PT e 24 h depois ao T. Animais receberam infusão bilateral de AP-7, N-PLA, ODQ ou veículo 10 min antes do teste. Em grupos independentes de animais, a administração das drogas ocorreu intra HD ou HV.

3.4.6 Experimento 6: efeito do bloqueio da via glutamato-NO hipocampal no HD ou no HV de ratos expostos ao campo aberto

Animais com cânulas direcionadas ao HD ou ao HV receberam infusão bilateral de AP-7, N-PLA, ODQ ou veículo e foram submetidos ao teste do campo aberto 10 min depois.

3.4.7 Experimento 7: quantificação do nitrito hipocampal

Grupos independentes de animais foram submetidos ao protocolo do nado forçado e foram sacrificados depois do PT, antes do teste ou depois do teste. Imediatamente após o sacrifício os encéfalos foram removidos e foram dissecadas as porções dorsal e ventral do hipocampo para posterior análise dos níveis de NOx (método de griess).

Todos os grupos de animais ficaram de 5 a 7 dias no biotério do laboratório para a habituação. Após o termino de todos os experimentos, os animais foram perfundidos e seus encéfalos removidos para posterior análise dos sítios de injeção (exceto pelo experimento 7). Além disso, todos os testes comportamentais foram realizados com experimentador cego ao tratamento e repetidos pelo menos uma vez, a fim de que se obtivesse o número final de pelo menos 6-8 animais/grupo.

3.5 Análise estatística

O tempo de imobilidade no NF, a distância movida no CA e o nitrito hipocampal foram analisados usando ou o teste t de Student (experimento 1), ou a análise de variância ANOVA de 1 via (experimentos 2, 3, 4, 5 e 7) ou de 2 vias (experimentos 6). Quando diferenças estatísticas foram encontradas, posterior análise foi realizada usando o teste de Dunnett. Quando necessário (quando não foi observado homoscedasticidade), teste não paramétrico de Dunn foi utilizado (experimento 5, HD). Diferenças estatísticas foram consideradas significantes quando $p < 0,05$.

4. Resultados

4.1 Localização do sítio de injeção

Figura 1 representa pontos demonstrando todas as micro-injeções bilaterais, através do rostro-caudal direção, via Atlas de Paxinos & Watson, 1998. Devido à sobreposição, há menos pontos que números de animais utilizados no estudo.

Figura 1. Pontos representativos mostrando injeções bilaterais no HD e HV. Pontos representativos localizam todas as micro-injeções consideradas para análise estatística dos dados. Referência espacial das micro-injeções são organizadas em mm de distância em relação ao bregma.

4.2 Experimento 1: efeito da injeção do CoCl_2 no hipocampo dos animais submetidos ao teste do nado forçado

O tempo de imobilidade não foi alterado com a injeção intra-HD de CoCl_2 antes do PT [$t_{18} = 0,6766$, não significante – NS], ou depois do PT [$t_{16} = 0,2236$, NS], ou antes do T [$t_{21} = 0,1011$, NS]. Nenhum efeito foi observado com a injeção de CoCl_2 intra-HV quer antes do PT [$t_{16} = 0,4053$, NS], depois do PT [$t_{17} = 0,7902$, NS] ou antes do T [$t_{16} = 0,2002$, NS]. Figura 2A e 2B.

Figura 2. Efeito da injeção do CoCl_2 no hipocampo dos animais submetidos ao teste do nado forçado. (A) Injeção intra-HD bilateral de CoCl_2 ou veículo, antes ($n=10,10$) ou após o PT ($n=10,9$) ou antes do T ($n=11,12$). (B) Injeção bilateral intra-HV de CoCl_2 ou veículo, quer antes ($n=10,10$) ou após o PT ($n=10,9$) ou antes do T ($n=11,12$). Dados são expressos como média $\pm$ EPM do tempo de imobilidade (seg).

4.3 Experimento 2: efeito do bloqueio da via glutamato-NO hipocampal, antes do pré-teste, no HD e no HV de ratos submetidos ao nado forçado

O tempo de imobilidade no TNF não foi alterado com a injeção intra-HD de AP-7, N-PLA ou ODQ [$F_{3,30} = 0,6178$, NS]. Nenhum efeito foi observado também com injeções intra-HV de AP-7, N-PLA ou ODQ [$F_{3,42} = 0,6512$, NS]. Figura 3A e 3B.

Figura 3. Efeito da injeção de AP-7, N-PLA, ODQ ou veículo, antes do PT, no hipocampo de animais submetidos ao teste do nado forçado. (A) Infusão intra-HD bilateral de AP-7 (n=9), N-PLA (n=7), ODQ (n=7) ou veículo (n=8). (B) Infusão intra-HV bilateral de AP-7 (n=11), N-PLA (n=10), ODQ (n=10) ou veículo (n=12). Dados são expressos como média $\pm$ EPM do tempo de imobilidade (seg).

4.4 Experimento 3: efeito do bloqueio da via glutamato-NO hipocampal, após o pré-teste, no HD e no HV de ratos submetidos ao nado forçado

A administração intra-HD de AP-7, N-PLA ou ODQ promoveu diminuição significativa do tempo de imobilidade no TNF [$F_{3,43} = 7,137$, $p < 0,05$]. Nenhum efeito foi observado quando os mesmos tratamentos foram realizados no HV [$F_{3,37} = 1,842$, NS]. Figura 4A e 4B.

Figura 4. Efeito da injeção de AP-7, N-PLA, ODQ ou veículo, depois do PT, no hipocampo de animais submetidos ao teste do nado forçado. (A) Infusão intra-HD bilateral de AP-7 (n=11), N-PLA (n=10), ODQ (n=11) ou veículo (n=12). (B) Infusão intra-HV bilateral de AP-7 (n=9), N-PLA (n=10), ODQ (n=7) ou veículo (n=12). Dados são expressos como média $\pm$ EPM do tempo de imobilidade (seg); * $p < 0,05$ em relação ao grupo controle (one-way ANOVA seguida de Dunnett).

4.5 Experimento 4: análise do perfil dose-resposta induzida pela administração de AP-7 (3, 10, 30 nmoles/0,5µL) intra-HV, antes ou após o pré-teste.

A administração intra-HV de AP-7 não modificou o tempo de imobilidade, em qualquer dose testada (3 ou 10 ou 30 nmoles/0,5µL), antes PT [$F_{3,34} = 2,349$ NS] ou após PT [$F_{3,33} = 0,7201$ NS]. Figura 5.

Figura 5. A administração de AP-7 no HV, antes ou após o PT, não modifica o tempo de imobilidade de animais submetidos ao teste do nado forçado. *Figura superior:* infusão bilateral, intra-HV antes PT, de AP-7 (3 (n=8) ou 10 (n=8) ou 30 (n=8) nmoles/0,5µL) ou veículo (n=11). *Figura inferior:* infusão bilateral de AP-7 (3 (n=8) ou 10 (n=7) ou 30 (n=8) nmoles/0,5µL) ou veículo (n=11), intra-HV após PT. Dados são expressos como média ± EPM do tempo de imobilidade (seg).

4.6 Experimento 5: efeito do bloqueio da via glutamato-NO hipocampal, antes do teste, no HD e no HV de ratos submetidos ao nado forçado

Administração intra-HD de AP-7 ou ODQ diminuiu significativamente o tempo de imobilidade no TNF [$F_{3,34} = 19,53$, teste de Dunn: $p < 0,05$; figura 6A]. No HV, todas as drogas administradas promoveram diminuição significativa do tempo de imobilidade [$F_{3,37} = 7,314$, teste de Dunnett: $p < 0,05$; figura 6B].

Figura 6. Efeito da injeção de AP-7, N-PLA, ODQ ou veículo, antes do T, no hipocampo de animais submetidos ao teste do nado forçado. (A) Infusão intra-HD bilateral de AP-7 (n=8), N-PLA (n=9), ODQ (n=7) ou veículo (n=11). (B) Infusão intra-HV bilateral de AP-7 (n=7), N-PLA (n=8), ODQ (n=8) ou veículo (n=15). Dados são expressos como média $\pm$ EPM do tempo de imobilidade (seg); * $p < 0,05$ em relação ao grupo controle (one-way ANOVA seguida de Dunnetts).

4.7 Experimento 6: efeito do bloqueio da via glutamato-NO hipocampal no HD ou no HV de ratos expostos ao campo aberto

Na figura 7, observa-se que a atividade locomotora não foi alterada com AP-7, N-PLA ou ODQ injetados intra-HD [efeito de tratamento: $F_{3,68} = 1,343$, NS; efeito de tempo: $F_{4,68} = 22,79$, $p < 0,05$; interação entre fatores: $F_{12,68} = 3,996$, $p < 0,05$] ou intra-HV [efeito de tratamento: $F_{3,84} = 0,2506$, NS; efeito de tempo: $F_{4,84} = 15,41$, $p < 0,05$; interação entre fatores: $F_{12,84} = 1,512$, NS].

Figura 7. Efeitos da administração de AP-7, N-PLA, ODQ ou veículo, intra-HD (n=5-6) ou HV (n=5-9), em ratos expostos ao teste do campo aberto. Dados são expressos como média $\pm$ EPM do total de número de cruzamentos.

4.8 Experimento 7: quantificação do nitrito hipocampal

ANOVA de uma via indica nenhuma influência significativa do estresse do nado forçado sobre níveis de NOx. Os dados observados na figura 8 indicam que não há mudanças relativas à exposição ao estresse do nado forçado, seja sobre HD [efeito do tratamento: $F_{3,31} = 1,314$; NS] ou HV [efeito do tratamento: $F_{3,31} = 0,5366$; NS], em qualquer momento analisado.

Figura 8. Níveis de NOx no HD ou HV de animais submetidos ao teste do nado forçado e sacrificados depois PT ou antes ou depois do T. Dados são expressos como média $\pm$ EPM de NOx/microgramas de proteína total.

5. Discussão

O nado forçado é o teste mais amplamente utilizado para avaliar o efeito antidepressivo induzido por drogas, pois é de fácil manuseio, emprega um desenho experimental simples, rápido e sem grandes custos (Cryan, Markou et al. 2002). Apresenta também uma grande validade preditiva, sendo um ótimo teste experimental para o “screening” de drogas antidepressivas e, consequentemente, se faz útil na avaliação de possíveis mecanismos moleculares adjacentes ao efeito antidepressivo. O teste foi inicialmente proposto por Porsolt e colaboradores, em 1977, os quais observaram que somente drogas antidepressivas diminuía o tempo de imobilidade dos animais (antipsicóticos não alteraram o tempo de imobilidade no teste), quando estes eram re-expostos ao nado forçado (Porsolt, Le Pichon et al. 1977). Essa diminuição do tempo de imobilidade com o uso de antidepressivos não era consequência de uma alteração na atividade motora dos animais, ao contrário do que foi verificado com o uso de anfetaminas.

Nossos dados indicam que tratamento com cobalto não alterou a imobilidade no TNF, quando injetado intra-HD ou intra-HV, independente do momento de administração (ver figura 2). AP-7, N-PLA e ODQ, quando infundidos intra-HD após o PT, diminuía o tempo de imobilidade animal no dia do teste (figura 4A), e somente AP-7 e ODQ diminuía significativamente o tempo de imobilidade quando injetados antes do teste (figura 6A). Quando tais drogas foram administradas intra-HV, houve redução do tempo de imobilidade somente quando infundidas antes do teste (figura 6B). Nenhuma interferência na atividade locomotora dos animais foi observada no teste do campo aberto em resposta aos tratamentos, excluindo qualquer possível resultado antidepressivo falso positivo no nado forçado (ver figura 7).

Inesperadamente, a administração de cloreto de cobalto em qualquer tempo de administração, seja no HV ou HD, não promoveu alterações comportamentais no TNF quando comparado aos respectivos grupos controles. A ausência de efeito aqui observado, com esse método farmacológico de inibição funcional da atividade sináptica cálcio-dependente, contrasta com os resultados obtidos com inativação do HD ou HV em diversos outros modelos comportamentais animais os quais utilizaram outras metodologias de inibição funcional do hipocampo, tais como lesões químicas, eletrolíticas, uso de lidocaína ou muscimol (Kjelstrup, Tuvnes et al. 2002; Pothuizen, Zhang et al. 2004; Trivedi and Coover 2004; Bertoglio, Joca et al. 2006; Hunsaker e Kesner 2008). Essa aparente contradição poderia ser explicada pelas diferenças neurobiológicas intrínsecas entre os modelos animais utilizados e o TNF.

A mesma dose de CoCl_2 utilizada no presente trabalho foi empregada em outros trabalhos, onde a droga foi injetada no HD (Resstel, Joca et al. 2008) ou no córtex pré-frontal medial (CPFm; Resstel, Joca et al. 2006), tendo promovido significativo efeito ansiolítico no modelo do condicionamento aversivo ao contexto, dependendo do momento administrado após a primeira exposição ao estresse. Além disso, a injeção de 1 mM CoCl_2 no CPFm (Scopinho et al. 2010) ou no NLET (Crestani, Alves et al., 2010) foi eficaz em reduzir o tempo de imobilidade em animais submetidos ao teste do nado forçado, também dependendo do momento de administração da droga. Portanto, a ausência de efeito observada no presente trabalho não poderia ser atribuída a ausência de efeito da droga na dose utilizada.

Além disso, no presente trabalho não foram avaliados os efeitos promovidos pela inativação completa da formação hipocampal (HD e HV). Portanto, é possível que a integridade funcional em uma sub-região tenha compensado a inativação da

outra, de maneira que nenhum efeito tenha sido percebido com a inativação parcial da estrutura.

Outra possível explicação para a ausência de modulação comportamental no FST com o uso de CoCl_2 é sua ação inibitória e indiscriminada a toda e qualquer neurotransmissão, de modo que inibiria a atuação de diferentes neurotransmissores hipocampais responsáveis por modular distintas respostas comportamentais frente à exposição ao estresse. Assim, o hipocampo teria um papel modulatório frente ao comportamento induzido com o estresse do nado forçado que poderia ser individualizado pela modulação/manipulação de um sistema de neurotransmissão específico. Por exemplo, está descrito na literatura que a administração de zimelidina, um inibidor seletivo da recaptação de serotonina, intra-HD, imediatamente após a sessão de exposição a choques inescapáveis no modelo do desamparo aprendido, promove uma diminuição na porcentagem de animais desamparados, consistindo em um efeito antidepressivo (Joca, Padovan et al. 2003). Tais dados sugerem que a facilitação serotoninérgica hipocampal promove um efeito do tipo antidepressivo. Por outro lado, acredita-se que a neurotransmissão glutamatérgica hipocampal parece sobrejazer os déficits comportamentais observados em animais estressados, uma vez que esses animais apresentam quantidades aumentadas de glutamato e de óxido nítrico hipocampal (Musazzi, Racagni et al. 2011; Sanacora, Treccani et al. 2012; Obrenovitch 1999; Mathew, Keegan et al. 2005). Na mesma linha de raciocínio, a administração intra-HD de antagonistas de receptores NMDA ou bloqueadores da atividade da nNOS impede o desenvolvimento dos déficits comportamentais induzidos pelo estresse de nado forçado (Padovan e Guimaraes 2004; Joca e Guimaraes 2006).

Portanto, o estudo de vias específicas no HD e no HV poderia revelar alguma diferença funcional entre essas sub-regiões na modulação da resposta comportamental ao estresse de nado forçado. Dessa forma, no presente trabalho realizamos o bloqueio seletivo de diferentes passos das vias glutamatérgica e nitrérgica no HD e no HV. Para tanto, AP-7, N-PLA e ODQ foram administradas ou na porção dorsal, ou na porção ventral do hipocampo, a fim de tornar possível a observação de uma distinta função da via NMDA-NO sobre a consequência comportamental induzida pelo estresse do nado forçado.

Quando injetados intra-HD antes do PT, AP-7, N-PLA e ODQ não promovem qualquer alteração comportamental frente à imobilidade induzida pelo estresse do nado forçado. Essas mesmas drogas, quando administradas intra-HD após o PT, promovem um consistente efeito do tipo antidepressivo. Apenas AP-7 e ODQ significativamente diminuíram o tempo de imobilidade no TNF, quando foram administrados intra-HD antes do T, porém, N-PLA demonstrou uma grande tendência em também diminuir o tempo de imobilidade. Os efeitos observados com as drogas administradas após o PT estão de acordo com trabalhos prévios que demonstram que AP-7 e 7-NI (inibidor menos seletivo da nNOS que N-PLA) também promovem um efeito tipo antidepressivo, quando infundidos intra HD após o PT, no TNF (Padovan e Guimaraes 2004; Joca e Guimaraes 2006). Porém, Padovan e colaboradores não encontraram resposta antidepressiva com AP-7 administrado intra-HD antes do T, e Joca e colaboradores encontraram também um efeito do tipo antidepressivo com 7-NI administrado intra-HD antes do PT (Padovan e Guimaraes 2004; Joca e Guimaraes 2006). Intrínsecas diferenças metodológicas podem ser responsáveis por tal discrepância (p. ex. diferenças conceituais quanto a análise manual do tempo de imobilidade animal, períodos sazonais diferentes os quais os

experimentos foram realizados, dentre outras diferenças). Portanto, somando se nossos resultados à literatura, a modulação do sistema glutamatérgico/nitrérgico do HD se faz mais consistente quando o manuseio farmacológico do mesmo ocorre após o PT.

A função hipocampal do sistema glutamatérgico/nitrérgico em modular as consequências comportamentais induzidas pelo estresse do nado forçado, principalmente após a exposição do animal ao estresse é consistente com dados na literatura demonstrando a importância hipocampal na consolidação da memória aversiva (Kim e Fanselow 1992). De acordo com esse possível efeito mnemônico está o fato que o HD parece estar associado a processos cognitivos relacionados à aprendizagem e memória espacial (Fanselow e Dong., 2010). O fato do efeito do antidepressivo ser observado através de um possível efeito mnemônico não exclui a importância do sistema glutamatérgico como um modulador do comportamento depressivo, pois talvez a alteração nesses processos cognitivos seja o mecanismo pelos quais o comportamento emocional seja modulado. Para Graeff et al (1996), a inibição da consolidação de memórias aversivas facilitaria a adaptação a um estresse inescapável, diminuindo assim as consequências comportamentais/emocionais da experiências aversiva (Graeff, Guimaraes et al. 1996). Mais especificamente, os referidos autores sugerem que a facilitação da neurotransmissão serotoninérgica no HD promoveria efeito tipo-antidepressivo por inibir a consolidação de memórias aversivas relacionadas à exposição ao estresse.

É importante destacar que o efeito do tipo antidepressivo observado com as drogas administradas antes do T, muito provavelmente, não ocorre em consequência de processos cognitivos. Tal conjectura é possível a partir de estudos realizados com primatas humanos, não humanos e em ratos, os quais demonstram

que a estrutura hipocampal está envolvida com processos de re-consolidação, ao passo que o processo de armazenamento e evocação seria dependente de estruturas para-hipocampais ou neocorticais (Kim e Fanselow 1992; Alvarez e Squire 1994; Kapur e Brooks 1999). Portanto esse resultado reforça a atuação do HD também em processos emocionais-motivacionais, os quais ocorreriam de maneira independente de influências mnemônicas. Essa assertiva contraria a função do HD descrita na literatura como estritamente responsável por processos cognitivos relacionados com memória e aprendizagem. Ao encontro de nossos resultados, recentemente foi observado que aumento na atividade neuronal do HD, a partir da redução na expressão de canais HCN (hyperpolarization-activated cyclic nucleotide-gated channels), promove consistente efeito do tipo antidepressivo no modelo do TNF, além de consistente efeito ansiolítico no modelo do CA e do LCE (Kim, Chang et al., 2012). Portanto, fica claro a possibilidade do HD também modular respostas comportamentais (emocionais-motivacionais) engatilhadas frente a situações estressantes.

É interessante ressaltar que dados prévios do nosso grupo evidenciaram que o efeito tipo-antidepressivo obtido com a administração de inibidor da nNOS no HD pode ser bloqueado pelo pré-tratamento com antagonista do receptor serotoninérgico do tipo 1a (5-HT_{1a}), na mesma dose em que se observou bloqueio do efeito antidepressivo induzido pela administração local de fluoxetina (Sato, Joca et al., 2011). Portanto, esses dados indicam que o bloqueio da via NMDA-NO no HD poderia estar promovendo desinibição da neurotransmissão serotoninérgica local, a qual, por meio da ativação de receptores 5-HT_{1a} promoveria efeitos do tipo antidepressivo. Esses dados corroboram resultados obtidos com a administração sistêmica de inibidor da nNOS, onde o efeito antidepressivo dessas drogas pode ser

bloqueado com PCPA, inibidor da síntese de serotonina (Harkin, Connor et al. 2003). De acordo com tal linha de raciocínio, sabe-se que o NO pode inativar a enzima passo limitante triptofano hidroxilase, a qual desencadeia a formação de serotonina a partir do aminoácido triptofano (Kuhn e Arthur 1997). O NO pode também regular a recaptação de serotonina (Pogun e Kuhar 1994) e inativar a mesma (Fossier, Blanchard et al. 1999).

Assim, considerando que a neurotransmissão serotoninérgica do HD facilitaria, enquanto a via NMDA-NO dessa sub-região prejudicaria a adaptação ao estresse de nado forçado (via prejuízo da neurotransmissão serotoninérgica), é possível, conforme apontado anteriormente, que o bloqueio de todo HD com COCl_2 não tenha aparecido porque ambas as vias foram bloqueadas.

Atuais evidências têm sugerido diferente padrão de expressão gênica e diferente padrão hodológico ao longo do eixo dorso/ventral do hipocampo, levando a existência de diferenças funcionais entre o HD e HV (Fanselow e Dong 2010; Bannerman, Rawlins et al. 2004). Esta distinção funcional conduz o HV como o principal responsável pelas respostas tanto comportamentais quanto neuroendócrinas frente à exposição a situações estressantes, porém, até o momento o HD permanece como a principal sub-região hipocampal estudada em modelos animais de depressão, incluindo o TNF.

Com o intuito de contribuir para a elucidação das funções do HV, foi encontrado nesse estudo que, diferentemente do HD, a modulação do sistema glutamatérgico/nitrérgico do HV com AP-7, N-PLA e ODQ tem efeito do tipo antidepressivo somente quando tais drogas são injetadas antes do T. Ausência de efeito das drogas nos demais tempos não poderiam ser decorrentes do uso de doses sub-efetivas, já que foi observado que administração de diferentes doses de

AP-7 não promoveu qualquer efeito sobre o TNF (ver figura 5). É importante ressaltar também, que pelo mesmo motivo discutido acima com o HD para o efeito das drogas antes do T, muito provavelmente o resultado descrito para o HV não seja decorrente de influências mnemônicas (Kim e Fanselow 1992; Alvarez e Squire 1994; Kapur and Brooks 1999). Ao excluirmos esta possibilidade, o exclusivo efeito do tipo antidepressivo observado com as drogas administradas somente antes do T reforça o papel do HV em modular única e exclusivamente respostas emocionais-motivacionais relacionadas com a exposição a agentes estressores.

O HV comunica-se, através de projeções eferentes, com o CPFm e com o complexo amigdalóide (Ishikawa e Nakamura 2006). Essas 3 estruturas, diretamente ou indiretamente, projetam para o NLET, o qual é uma estrutura rica em neurônios gabaérgicos que projetam para neurônios do núcleo paraventricular do hipotálamo (Radley e Sawchenko., 2011). Estes são responsáveis pela produção de hormônio liberador de corticotropina, dessa forma regulando a ativação do eixo HPA e a secreção de glicocorticóides. Projeções glutamatérgicas diretas, a partir do HV e do CPFm, e projeções glutamatérgicas indiretas, a partir do HV (via CPFm), ativariam neurônios gabaérgicos do NLET, diminuindo a ativação do eixo HPA em resposta a situações aversivas (Radley e Sawchenko 2011; Herman e Cullinan 1997; Ishikawa e Nakamura 2006). Projeções gabaérgicas diretas, a partir da amígdala, e projeções glutamatérgicas indiretas, a partir do VH (via projeções gabaérgica da amígdala para o CPFm ou para o NLET), inibiriam neurônios gabaérgicos do NLET, assim ativando o eixo HPA. O hipocampo também recebe projeções aferentes, através da via perforante do córtex entorhinal (Fanselow e Dong 2010; Henke 1990). Este, por sua vez, envia mensagens sensoriais ao hipocampo às quais situam e integram o animal ao ambiente externo (Fanselow e Dong., 2010). É possível que o HV se utilize dessa

integração para modular a atividade do eixo HPA de acordo com as circunstâncias ambientais vigentes no momento.

Há evidências sugerindo que o mecanismo descrito acima possa envolver a participação de glutamato e NO (Zhou, Zhu et al., 2011). Tratamento crônico com corticosterona e o estresse crônico variado promovem uma sub-regulação de receptores glicocorticóides hipocampais, culminando com uma maior liberação de hormônio liberador de corticotropina. Esta hiperatividade do eixo HPA é óxido nítrico dependente e parcialmente GCs-dependente (Zhou, Zhu et al., 2011). Por outro lado, o efeito do estresse em aumentar os níveis de liberação de glutamato e/ou aumentar a expressão da nNOS no hipocampo parece depender da atuação de glicocorticóides (Musazzi, Racagni et al., 2011; Zhou, Zhu et al., 2011; Venero and Borrell 1999; Karst, Berger et al. 2005).

Portanto o aumento de glicocorticóides parece promover um aumento dos níveis de glutamato liberado, este por sua vez reforça os efeitos deletérios do estresse ao desregular o eixo HPA, de forma a criar um mecanismo reverberativo entre esses dois sistemas que contribuiria para a hiper-reatividade do eixo descrita em indivíduos deprimidos. É interessante notar que o tratamento com antidepressivos tem a capacidade de diminuir o aumento na liberação de glutamato intracerebral em animais, ou os níveis plasmáticos de glutamato em humanos, além de regular o funcionamento do eixo HPA (Musazzi, Racagni et al., 2011; Sanacora, Treccani et al., 2012; Holsboer 2001; Kucukibrahimoglu, Saygin et al. 2009).

Assim, é possível especular que o efeito tipo-antidepressivo obtido com o bloqueio da via NMDA-NO no HV esteja relacionado com uma interferência sobre o desenvolvimento de uma atividade anormal do eixo HPA. Essa possível interferência descrita acima corrobora a influência do HV sobre processos emocionais-

motivacionais relacionados com o estresse, já que a ativação do eixo HPA é, também, extremamente envolvida com situações aversivas e estressantes (Sapolsky, Romero et al. 2000; Joca, Padovan et al. 2003).

Outro possível mecanismo pelo qual o AP-7, N-PLA e ODQ podem estar promovendo um efeito do tipo antidepressivo é através da interação óxido nítrico e BDNF. Canossa e colaboradores verificaram que em cultura primária de neurônios hipocampais doadores de óxido nítrico diminuem os níveis da expressão de BDNF, ao passo que o inibidor da nNOS aumenta a expressão do mesmo (Canossa, Giordano et al. 2002). Nesse mesmo trabalho, a ativação da adenilato ciclase e o próprio cGMP diminuem a expressão de BDNF. É consistente na literatura a importância do BDNF hipocampal para o adequado perfil antidepressivo de drogas clinicamente consideradas antidepressivas (Lee e Kim 2010; Monteggia, Barrot et al. 2004). O próprio BDNF, quando administrado intra-HD, promove efeito do tipo antidepressivo em diversos modelos animais (Shirayama, Chen et al. 2002). Portanto um aumento nos níveis hipocampais de BDNF pode ser o responsável pelo efeito antidepressivo observado em nosso trabalho com o bloqueio da neurotransmissão glutamatérgica/nitrérgica no FST.

É importante mencionar que, no presente trabalho, não foram observadas diferenças significativas nos níveis de NOx, tanto no HD quanto no HV, em grupos de animais expostos ao TNF e sacrificados em diferentes momentos. O método de griess avalia uma variação de NOx na casa do μM , portanto, talvez um método analítico mais sensível possa ser útil para dar significância a um menor grau de variação de NOx. Assim, acreditamos que a ausência de diferenças significativas nos níveis de NOx em animais estressados tenha sido uma limitação técnica, uma vez que outros trabalhos descrevem um aumento nos níveis de NOS hipocampal

após a exposição animal a estressores inescapáveis, embora distinção entre HD e HV não tenha sido levado em conta (Khovryakov, Podrezova et al., 2010; Wegener, Harvey et al., 2010; Khovriakov, Podrezova et al. 2009).

Em conclusão, observamos que a completa inibição funcional farmacológica, seja do HD ou do HV, não exerce qualquer efeito sobre o tempo de imobilidade durante o TNF, independente do momento de administração da droga. Essa ausência de efeito tanto no HD quanto no HV não possibilitou uma discussão pertinente quanto a uma possível diferença funcional entre as duas sub-regiões, frente ao estresse do nado forçado. Diferenças funcionais, hodológicas e fisiológicas entre o HD e o HV são conhecidas na literatura. Portanto o estudo de uma determinada via de neurotransmissão mais específica fez-se necessário para o alcance do objetivo em diferenciar o HD e o HV quanto a modulação da resposta de imobilidade no TNF, o qual é associado à neurobiologia da depressão. Assim sendo, o sistema glutamatérgico-nitrérgico foi estudado com o objetivo de verificar uma possível distinção temporal, quanto a função do HD e do HV, frente ao estresse do nado forçado e sobre a subsequente resposta comportamental observada com a re-exposição animal ao mesmo estressor. Dessa forma verificou-se que assim como o HD, o HV parece também influenciar respostas comportamentais associados à depressão. Essa abordagem farmacológica diferenciando ambas as regiões, HD e HV, permitiu-nos propor uma distinta funcionalidade temporal do sistema glutamatérgico/nitrérgico em torno do eixo dorso/ventral hipocampal, sobre a consequência comportamental induzida pelo estresse do nado forçado. Portanto, nossos resultados além de permitir uma distinção entre HD e HV, dão consistência à influência do sistema glutamatérgico/nitrérgico do HV em respostas comportamentais associadas à depressão. Os resultados comportamentais com a

manipulação do HD estão de acordo com a literatura e assim reforçam a confiabilidade sobre os resultados oriundos da manipulação farmacológica do HV. Portanto, futuras investigações à cerca da função glutamatérgica/nitrérgica do HV são imperativas para o estudo da neurobiologia da depressão e das desordens de humor.

6. Conclusões

Os resultados do presente trabalho permitem concluir:

- A inativação temporária do HD ou do HV não promove efeitos sobre o comportamento dos animais expostos ao estresse de nado forçado;
- O sistema glutamatérgico/nitrérgico, presente por todo o eixo dorso-ventral do hipocampo modula a consequência comportamental induzida pelo estresse do nado forçado de maneira temporalmente distinta, quando considerado separadamente a porção dorsal e ventral do mesmo;
- Em conjunto, os resultados corroboram uma distinção funcional entre as sub-regiões dorsal e ventral do hipocampo e dão sustentação para a importância de aprofundar nosso conhecimento e estudar a participação do hipocampo ventral na neurobiologia da depressão. De maneira semelhante e não menos importante, sustenta a influência da modulação glutamatérgica/nitrérgica hipocampal sobre comportamentos animais associados à neurobiologia da depressão.

7. Bibliografia

Abel, E. L. and P. J. Bilitzke (1990). "A possible alarm substance in the forced swimming test." Physiol Behav **48**(2): 233-9.

Alvarez, P. and L. R. Squire (1994). "Memory consolidation and the medial temporal lobe: a simple network model." Proc Natl Acad Sci U S A **91**(15): 7041-5.

American Psychiatric Association. Manual diagnóstico e estatístico de transtornos mentais. 4 ed. Texto revisado DSM-IV-TR. Porto Alegre: Artmed; 2002.

Axelrod, J., L. G. Whitby, et al. (1961). "Effect of psychotropic drugs on the uptake of H3-norepinephrine by tissues." Science **133**(3450): 383-4.

Banasr, M., A. Soumier, et al. (2006). "Agomelatine, a new antidepressant, induces regional changes in hippocampal neurogenesis." Biol Psychiatry **59**(11): 1087-96.

Bannerman, D. M., J. N. Rawlins, et al. (2004). "Regional dissociations within the hippocampus--memory and anxiety." Neurosci Biobehav Rev **28**(3): 273-83.

Baumgartner, A., K. J. Graf, et al. (1985). "The Dexamethasone Suppression Test in depression, in schizophrenia, and during experimental stress." Biol Psychiatry **20**(6): 675-9.

Belmaker, R. H. and G. Agam (2008). "Major depressive disorder." N Engl J Med **358**(1): 55-68.

Benkert, O., G. Laakmann, et al. (1977). "Effect of zimelidine (H 102/09) in depressive patients." Arzneimittelforschung **27**(12): 2421-3.

Bertoglio, L. J., S. R. Joca, et al. (2006). "Further evidence that anxiety and memory are regionally dissociated within the hippocampus." Behav Brain Res **175**(1): 183-8.

Bessa, J. M., D. Ferreira, et al. (2009). "The mood-improving actions of antidepressants do not depend on neurogenesis but are associated with neuronal remodeling." Mol Psychiatry **14**(8): 764-73, 739.

Blier, P. (2003). "The pharmacology of putative early-onset antidepressant strategies." Eur Neuropsychopharmacol **13**(2): 57-66.

Blier, P. and C. De Montigny (1983). "Electrophysiological investigations on the effect of repeated zimelidine administration on serotonergic neurotransmission in the rat." J Neurosci **3**(6): 1270-8.

Campbell, S. and G. Macqueen (2004). "The role of the hippocampus in the pathophysiology of major depression." J Psychiatry Neurosci **29**(6): 417-26.

Canossa, M., E. Giordano, et al. (2002). "Nitric oxide down-regulates brain-derived neurotrophic factor secretion in cultured hippocampal neurons." Proc Natl Acad Sci U S A **99**(5): 3282-7.

Carlsson, A., K. Fuxe, et al. (1968). "The effect of imipramine on central 5-hydroxytryptamine neurons." J Pharm Pharmacol **20**(2): 150-1.

Carlsson, A. and D. T. Wong (1997). "Correction: a note on the discovery of selective serotonin reuptake inhibitors." Life Sci **61**(12): 1203.

Castren, E. (2004). "Neurotrophic effects of antidepressant drugs." Curr Opin Pharmacol **4**(1): 58-64.

Castren, E. (2005). "Is mood chemistry?" Nat Rev Neurosci **6**(3): 241-6.

Chao, H. M., P. H. Choo, et al. (1989). "Glucocorticoid and mineralocorticoid receptor mRNA expression in rat brain." Neuroendocrinology **50**(4): 365-71.

Charney, D. S. and H. K. Manji (2004). "Life stress, genes, and depression: multiple pathways lead to increased risk and new opportunities for intervention." Sci STKE **2004**(225): re5.

Crestani, C. C., F. H. Alves, et al. "Acute reversible inactivation of the bed nucleus of stria terminalis induces antidepressant-like effect in the rat forced swimming test." Behav Brain Funct **6**: 30.

Cryan, J. F., A. Markou, et al. (2002). "Assessing antidepressant activity in rodents: recent developments and future needs." Trends Pharmacol Sci **23**(5): 238-45.

Czerniawski, J., F. Ree, et al. "Dorsal versus ventral hippocampal contributions to trace and contextual conditioning: differential effects of regionally selective NMDA receptor antagonism on acquisition and expression." Hippocampus **22**(7): 1528-39.

de Vasconcellos-Bittencourt, A. P., D. A. Vendite, et al. "Chronic stress and lithium treatments alter hippocampal glutamate uptake and release in the rat and potentiate necrotic cellular death after oxygen and glucose deprivation." Neurochem Res **36**(5): 793-800.

Delgado, P. L., D. S. Charney, et al. (1990). "Serotonin function and the mechanism of antidepressant action. Reversal of antidepressant-induced remission by rapid depletion of plasma tryptophan." Arch Gen Psychiatry **47**(5): 411-8.

Duman, R. S. and G. K. Aghajanian "Synaptic dysfunction in depression: potential therapeutic targets." Science **338**(6103): 68-72.

Elhwuegi, A. S. (2004). "Central monoamines and their role in major depression." Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry **28**(3): 435-51.

Fanselow, M. S. and H. W. Dong "Are the dorsal and ventral hippocampus functionally distinct structures?" Neuron **65**(1): 7-19.

Felice, D., O. F. O'Leary, et al. "Blockade of the GABA(B) receptor increases neurogenesis in the ventral but not dorsal adult hippocampus: relevance to antidepressant action." Neuropharmacology **63**(8): 1380-8.

Fossier, P., B. Blanchard, et al. (1999). "Nitric oxide transforms serotonin into an inactive form and this affects neuromodulation." Neuroscience **93**(2): 597-603.

Fuller, R. W., K. W. Perry, et al. (1974). "Effect of an uptake inhibitor on serotonin metabolism in rat brain: studies with 3-(p-trifluoromethylphenoxy)-N-methyl-3-phenylpropylamine (Lilly 110140)." Life Sci **15**(6): 1161-71.

Garthwaite, J. (2008). "Concepts of neural nitric oxide-mediated transmission." Eur J Neurosci **27**(11): 2783-802.

Gonçalves, C. A. V e Machado, A. L (2007). Depressão, o mal do século: de que século? R Enferm UERJ **15**(2): 298-304.

Graeff, F. G., F. S. Guimaraes, et al. (1996). "Role of 5-HT in stress, anxiety, and depression." Pharmacol Biochem Behav **54**(1): 129-41.

Greenberg, P. E., R. C. Kessler, et al. (2003). "The economic burden of depression in the United States: how did it change between 1990 and 2000?" J Clin Psychiatry **64**(12): 1465-75.

Guimaraes, F. S., A. P. Carobrez, et al. (1991). "Anxiolytic effect in the elevated plus-maze of the NMDA receptor antagonist AP7 microinjected into the dorsal periaqueductal grey." Psychopharmacology (Berl) **103**(1): 91-4.

Harkin, A., T. J. Connor, et al. (2003). "Serotonergic mediation of the antidepressant-like effects of nitric oxide synthase inhibitors." Neuropharmacology **44**(5): 616-23.

Hasler, G. "Pathophysiology of depression: do we have any solid evidence of interest to clinicians?" World Psychiatry **9**(3): 155-61.

Heiberg, I. L., G. Wegener, et al. (2002). "Reduction of cGMP and nitric oxide has antidepressant-like effects in the forced swimming test in rats." Behav Brain Res **134**(1-2): 479-84.

Heldt, S. A., L. Stanek, et al. (2007). "Hippocampus-specific deletion of BDNF in adult mice impairs spatial memory and extinction of aversive memories." Mol Psychiatry **12**(7): 656-70.

Heninger, G. R., P. L. Delgado, et al. (1996). "The revised monoamine theory of depression: a modulatory role for monoamines, based on new findings from

monoamine depletion experiments in humans." Pharmacopsychiatry **29**(1): 2-11.

Henke, P. G. (1990). "Hippocampal pathway to the amygdala and stress ulcer development." Brain Res Bull **25**(5): 691-5.

Herman, J. P. and W. E. Cullinan (1997). "Neurocircuitry of stress: central control of the hypothalamo-pituitary-adrenocortical axis." Trends Neurosci **20**(2): 78-84.

Ho, Y. C. and S. Wang "Adult neurogenesis is reduced in the dorsal hippocampus of rats displaying learned helplessness behavior." Neuroscience **171**(1): 153-61.

Holsboer, F. (2001). "Stress, hypercortisolism and corticosteroid receptors in depression: implications for therapy." J Affect Disord **62**(1-2): 77-91.

Huether, G., S. Doering, et al. (1999). "The stress-reaction process and the adaptive modification and reorganization of neuronal networks." Psychiatry Res **87**(1): 83-95.

Hunsaker, M. R. and R. P. Kesner (2008). "Dissociations across the dorsal-ventral axis of CA3 and CA1 for encoding and retrieval of contextual and auditory-cued fear." Neurobiol Learn Mem **89**(1): 61-9.

Ishikawa, A. and S. Nakamura (2006). "Ventral hippocampal neurons project axons simultaneously to the medial prefrontal cortex and amygdala in the rat." J Neurophysiol **96**(4): 2134-8.

Joca, S. R., F. R. Ferreira, et al. (2007). "Modulation of stress consequences by hippocampal monoaminergic, glutamatergic and nitroergic neurotransmitter systems." Stress **10**(3): 227-49.

Joca, S. R. and F. S. Guimaraes (2006). "Inhibition of neuronal nitric oxide synthase in the rat hippocampus induces antidepressant-like effects." Psychopharmacology (Berl) **185**(3): 298-305.

Joca, S. R., C. M. Padovan, et al. (2003). "Activation of post-synaptic 5-HT(1A) receptors in the dorsal hippocampus prevents learned helplessness development." Brain Res **978**(1-2): 177-84.

Joca, S. R., C. M. Padovan, et al. (2003). "[Stress, depression and the hippocampus]." Rev Bras Psiquiatr **25 Suppl 2**: 46-51.

Joca, S. R., T. Zanelati, et al. (2006). "Post-stress facilitation of serotonergic, but not noradrenergic, neurotransmission in the dorsal hippocampus prevents learned helplessness development in rats." Brain Res **1087**(1): 67-74.

Juruena, M. F., A. J. Cleare, et al. (2004). "[The hypothalamic pituitary adrenal axis, glucocorticoid receptor function and relevance to depression]." Rev Bras Psiquiatr **26**(3): 189-201.

-
- Kapur, N. and D. J. Brooks (1999). "Temporally-specific retrograde amnesia in two cases of discrete bilateral hippocampal pathology." Hippocampus **9**(3): 247-54.
- Karst, H., S. Berger, et al. (2005). "Mineralocorticoid receptors are indispensable for nongenomic modulation of hippocampal glutamate transmission by corticosterone." Proc Natl Acad Sci U S A **102**(52): 19204-7.
- Kendler, K. S., R. C. Kessler, et al. (1995). "Stressful life events, genetic liability, and onset of an episode of major depression in women." Am J Psychiatry **152**(6): 833-42.
- Khovriakov, A. V., E. P. Podrezova, et al. (2009). "[Participation of NO-synthase system in the stress-mediated reactions of the brain]." Morfologiya **135**(2): 7-11.
- Khovryakov, A. V., E. P. Podrezova, et al. "Involvement of the NO synthase system in stress-mediated brain reactions." Neurosci Behav Physiol **40**(3): 333-7.
- Kim, C. S., P. Y. Chang, et al. "Enhancement of dorsal hippocampal activity by knockdown of HCN1 channels leads to anxiolytic- and antidepressant-like behaviors." Neuron **75**(3): 503-16.
- Kim, J. J. and M. S. Fanselow (1992). "Modality-specific retrograde amnesia of fear." Science **256**(5057): 675-7.
- Kjelstrup, K. G., F. A. Tuvnes, et al. (2002). "Reduced fear expression after lesions of the ventral hippocampus." Proc Natl Acad Sci U S A **99**(16): 10825-30.
- Kline, N. S. (1958). "Clinical experience with iproniazid (marsilid)." J Clin Exp Psychopathol **19**(2, Suppl. 1): 72-8; discussion 78-9.
- Krass, M., G. Wegener, et al. "The antidepressant action of imipramine and venlafaxine involves suppression of nitric oxide synthesis." Behav Brain Res **218**(1): 57-63.
- Krishnan, V. and E. J. Nestler (2008). "The molecular neurobiology of depression." Nature **455**(7215): 894-902.
- Kucukibrahimoglu, E., M. Z. Saygin, et al. (2009). "The change in plasma GABA, glutamine and glutamate levels in fluoxetine- or S-citalopram-treated female patients with major depression." Eur J Clin Pharmacol **65**(6): 571-7.
- Kuhn, D. M. and R. Arthur, Jr. (1997). "Molecular mechanism of the inactivation of tryptophan hydroxylase by nitric oxide: attack on critical sulfhydryls that spare the enzyme iron center." J Neurosci **17**(19): 7245-51.
- Kuhn, R. (1958). "The treatment of depressive states with G 22355 (imipramine hydrochloride)." Am J Psychiatry **115**(5): 459-64.

Lee, B. H. and Y. K. Kim "The roles of BDNF in the pathophysiology of major depression and in antidepressant treatment." Psychiatry Investig **7**(4): 231-5.

Li, H. C., Q. Z. Chen, et al. (2007). "[Chronic mild stress stimulates nitric oxide production in rat brain cortex and hippocampus]." Zhejiang Da Xue Xue Bao Yi Xue Ban **36**(2): 150-4.

Li, Y. F., Y. Z. Zhang, et al. (2006). "Inhibition of N-methyl-D-aspartate receptor function appears to be one of the common actions for antidepressants." J Psychopharmacol **20**(5): 629-35.

Lightman, S. L. (2008). "The neuroendocrinology of stress: a never ending story." J Neuroendocrinol **20**(6): 880-4.

Lu, B., P. T. Pang, et al. (2005). "The yin and yang of neurotrophin action." Nat Rev Neurosci **6**(8): 603-14.

Maggio, N. and M. Segal (2007). "Striking variations in corticosteroid modulation of long-term potentiation along the septotemporal axis of the hippocampus." J Neurosci **27**(21): 5757-65.

Maggio, N. and M. Segal (2009). "Differential modulation of long-term depression by acute stress in the rat dorsal and ventral hippocampus." J Neurosci **29**(27): 8633-8.

Maletic, V., M. Robinson, et al. (2007). "Neurobiology of depression: an integrated view of key findings." Int J Clin Pract **61**(12): 2030-40.

Maras, P. M. and T. Z. Baram "Sculpting the hippocampus from within: stress, spines, and CRH." Trends Neurosci **35**(5): 315-24.

Mathew, S. J., K. Keegan, et al. (2005). "Glutamate modulators as novel interventions for mood disorders." Rev Bras Psiquiatr **27**(3): 243-8.

Mayberg, H. S., S. K. Brannan, et al. (2000). "Regional metabolic effects of fluoxetine in major depression: serial changes and relationship to clinical response." Biol Psychiatry **48**(8): 830-43.

Miller, H. L., P. L. Delgado, et al. (1996). "Clinical and biochemical effects of catecholamine depletion on antidepressant-induced remission of depression." Arch Gen Psychiatry **53**(2): 117-28.

Miller, H. L., P. L. Delgado, et al. (1996). "Effects of alpha-methyl-para-tyrosine (AMPT) in drug-free depressed patients." Neuropsychopharmacology **14**(3): 151-7.

Mongeau, R., P. Blier, et al. (1997). "The serotonergic and noradrenergic systems of the hippocampus: their interactions and the effects of antidepressant treatments." Brain Res Brain Res Rev **23**(3): 145-95.

Mongeau, R., C. De Montigny, et al. (1994). "Effect of long-term administration of antidepressant drugs on the 5-HT₃ receptors that enhance the electrically

evoked release of [3H]noradrenaline in the rat hippocampus." Eur J Pharmacol **271**(1): 121-9.

Monteggia, L. M., M. Barrot, et al. (2004). "Essential role of brain-derived neurotrophic factor in adult hippocampal function." Proc Natl Acad Sci U S A **101**(29): 10827-32.

Moser, M. B., E. I. Moser, et al. (1995). "Spatial learning with a minislab in the dorsal hippocampus." Proc Natl Acad Sci U S A **92**(21): 9697-701.

Musazzi, L., M. Milanese, et al. "Acute stress increases depolarization-evoked glutamate release in the rat prefrontal/frontal cortex: the dampening action of antidepressants." PLoS One **5**(1): e8566.

Musazzi, L., G. Racagni, et al. "Stress, glucocorticoids and glutamate release: Effects of antidepressant drugs." Neurochem Int **59**(2): 138-49.

Nascimento Hackl, L. P. and A. P. Carobrez (2007). "Distinct ventral and dorsal hippocampus AP5 anxiolytic effects revealed in the elevated plus-maze task in rats." Neurobiol Learn Mem **88**(2): 177-85.

Nascimento, J. O., H. Zangrossi, Jr., et al. "Effects of reversible inactivation of the dorsomedial hypothalamus on panic- and anxiety-related responses in rats." Braz J Med Biol Res **43**(9): 869-73.

Naylor, G. J., A. H. Smith, et al. (1987). "A controlled trial of methylene blue in severe depressive illness." Biol Psychiatry **22**(5): 657-9.

Nestler, E. J., M. Barrot, et al. (2002). "Neurobiology of depression." Neuron **34**(1): 13-25.

Nestler, E. J. and S. E. Hyman "Animal models of neuropsychiatric disorders." Nat Neurosci **13**(10): 1161-9.

Nibuya, M., S. Morinobu, et al. (1995). "Regulation of BDNF and trkB mRNA in rat brain by chronic electroconvulsive seizure and antidepressant drug treatments." J Neurosci **15**(11): 7539-47.

O'Leary, O. F., R. M. O'Connor, et al. "Lithium-induced effects on adult hippocampal neurogenesis are topographically segregated along the dorso-ventral axis of stressed mice." Neuropharmacology **62**(1): 247-55.

Obrenovitch, T. P. (1999). "High extracellular glutamate and neuronal death in neurological disorders. Cause, contribution or consequence?" Ann N Y Acad Sci **890**: 273-86.

Oliveira, R. M., F. S. Guimaraes, et al. (2008). "Expression of neuronal nitric oxide synthase in the hippocampal formation in affective disorders." Braz J Med Biol Res **41**(4): 333-41.

Padovan, C. M. and F. S. Guimaraes (2004). "Antidepressant-like effects of NMDA-receptor antagonist injected into the dorsal hippocampus of rats." Pharmacol Biochem Behav **77**(1): 15-9.

Petit-Demouliere, B., F. Chenu, et al. (2005). "Forced swimming test in mice: a review of antidepressant activity." Psychopharmacology (Berl) **177**(3): 245-55.

Petrie, R. X., I. C. Reid, et al. (2000). "The N-methyl-D-aspartate receptor, synaptic plasticity, and depressive disorder. A critical review." Pharmacol Ther **87**(1): 11-25.

Petty, F. and A. D. Sherman (1981). "GABAergic modulation of learned helplessness." Pharmacol Biochem Behav **15**(4): 567-70.

Pineyro, G., P. Blier, et al. (1994). "Desensitization of the neuronal 5-HT carrier following its long-term blockade." J Neurosci **14**(5 Pt 2): 3036-47.

Pittaluga, A., L. Raiteri, et al. (2007). "Antidepressant treatments and function of glutamate ionotropic receptors mediating amine release in hippocampus." Neuropharmacology **53**(1): 27-36.

Pittenger, C. and R. S. Duman (2008). "Stress, depression, and neuroplasticity: a convergence of mechanisms." Neuropsychopharmacology **33**(1): 88-109.

Pogun, S. and M. J. Kuhar (1994). "Regulation of neurotransmitter reuptake by nitric oxide." Ann N Y Acad Sci **738**: 305-15.

Porsolt, R. D., M. Le Pichon, et al. (1977). "Depression: a new animal model sensitive to antidepressant treatments." Nature **266**(5604): 730-2.

Pothuizen, H. H., W. N. Zhang, et al. (2004). "Dissociation of function between the dorsal and the ventral hippocampus in spatial learning abilities of the rat: a within-subject, within-task comparison of reference and working spatial memory." Eur J Neurosci **19**(3): 705-12.

Radley, J. J. and P. E. Sawchenko "A common substrate for prefrontal and hippocampal inhibition of the neuroendocrine stress response." J Neurosci **31**(26): 9683-95.

Resstel, L. B., F. M. Correa, et al. (2008). "The expression of contextual fear conditioning involves activation of an NMDA receptor-nitric oxide pathway in the medial prefrontal cortex." Cereb Cortex **18**(9): 2027-35.

Resstel, L. B., S. R. Joca, et al. (2008). "Effects of reversible inactivation of the dorsal hippocampus on the behavioral and cardiovascular responses to an aversive conditioned context." Behav Pharmacol **19**(2): 137-44.

Resstel, L. B., S. R. Joca, et al. (2006). "Involvement of medial prefrontal cortex neurons in behavioral and cardiovascular responses to contextual fear conditioning." Neuroscience **143**(2): 377-85.

Sairanen, M., G. Lucas, et al. (2005). "Brain-derived neurotrophic factor and antidepressant drugs have different but coordinated effects on neuronal turnover, proliferation, and survival in the adult dentate gyrus." J Neurosci **25**(5): 1089-94.

Sanacora, G., G. Treccani, et al. "Towards a glutamate hypothesis of depression: an emerging frontier of neuropsychopharmacology for mood disorders." Neuropharmacology **62**(1): 63-77.

Santarelli, L., M. Saxe, et al. (2003). "Requirement of hippocampal neurogenesis for the behavioral effects of antidepressants." Science **301**(5634): 805-9.

Sapolsky, R. M. (2000). "Glucocorticoids and hippocampal atrophy in neuropsychiatric disorders." Arch Gen Psychiatry **57**(10): 925-35.

Sapolsky, R. M., L. M. Romero, et al. (2000). "How do glucocorticoids influence stress responses? Integrating permissive, suppressive, stimulatory, and preparative actions." Endocr Rev **21**(1): 55-89.

Schildkraut, J. J. (1965). "The catecholamine hypothesis of affective disorders: a review of supporting evidence." Am J Psychiatry **122**(5): 509-22.

Scopinho, A. A., M. Scopinho, et al. "Acute reversible inactivation of the ventral medial prefrontal cortex induces antidepressant-like effects in rats." Behav Brain Res **214**(2): 437-42.

Segal, M., G. Richter-Levin, et al. "Stress-induced dynamic routing of hippocampal connectivity: a hypothesis." Hippocampus **20**(12): 1332-8.

Selikoff, I. J. and E. H. Robitzek (1952). "Tuberculosis chemotherapy with hydrazine derivatives of isonicotinic acid." Dis Chest **21**(4): 385-438.

Shirayama, Y., A. C. Chen, et al. (2002). "Brain-derived neurotrophic factor produces antidepressant effects in behavioral models of depression." J Neurosci **22**(8): 3251-61.

Snyder, J. S., A. Soumier, et al. "Adult hippocampal neurogenesis buffers stress responses and depressive behaviour." Nature **476**(7361): 458-61.

Snyder, S. H. and C. D. Ferris (2000). "Novel neurotransmitters and their neuropsychiatric relevance." Am J Psychiatry **157**(11): 1738-51.

Suzuki, E., G. Yagi, et al. (2001). "Elevated plasma nitrate levels in depressive states." J Affect Disord **63**(1-3): 221-4.

Tanti, A., Q. Rainer, et al. "Differential environmental regulation of neurogenesis along the septo-temporal axis of the hippocampus." Neuropharmacology **63**(3): 374-84.

Trivedi, M. A. and G. D. Coover (2004). "Lesions of the ventral hippocampus, but not the dorsal hippocampus, impair conditioned fear expression and

inhibitory avoidance on the elevated T-maze." Neurobiol Learn Mem **81**(3): 172-84.

Trullas, R. and P. Skolnick (1990). "Functional antagonists at the NMDA receptor complex exhibit antidepressant actions." Eur J Pharmacol **185**(1): 1-10.

Venero, C. and J. Borrell (1999). "Rapid glucocorticoid effects on excitatory amino acid levels in the hippocampus: a microdialysis study in freely moving rats." Eur J Neurosci **11**(7): 2465-73.

Vizi, E. S. and J. P. Kiss (1998). "Neurochemistry and pharmacology of the major hippocampal transmitter systems: synaptic and nonsynaptic interactions." Hippocampus **8**(6): 566-607.

Warner-Schmidt, J. L. and R. S. Duman (2006). "Hippocampal neurogenesis: opposing effects of stress and antidepressant treatment." Hippocampus **16**(3): 239-49.

Wegener, G., B. H. Harvey, et al. "Increased stress-evoked nitric oxide signalling in the Flinders sensitive line (FSL) rat: a genetic animal model of depression." Int J Neuropsychopharmacol **13**(4): 461-73.

Wong, D. T. and F. P. Bymaster (1995). "Development of antidepressant drugs. Fluoxetine (Prozac) and other selective serotonin uptake inhibitors." Adv Exp Med Biol **363**: 77-95.

Wong, D. T., F. P. Bymaster, et al. (1995). "Prozac (fluoxetine, Lilly 110140), the first selective serotonin uptake inhibitor and an antidepressant drug: twenty years since its first publication." Life Sci **57**(5): 411-41.

WHO, world health organization, 2012.

<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs369/en/>

Yang, C., Y. M. Hu, et al. "Acute administration of ketamine in rats increases hippocampal BDNF and mTOR levels during forced swimming test." Ups J Med Sci.

Yildiz, F., B. F. Erden, et al. (2000). "Antidepressant-like effect of 7-nitroindazole in the forced swimming test in rats." Psychopharmacology (Berl) **149**(1): 41-4.

Zarate, C. A., Jr., J. B. Singh, et al. (2006). "A randomized trial of an N-methyl-D-aspartate antagonist in treatment-resistant major depression." Arch Gen Psychiatry **63**(8): 856-64.

Zeller, E. A. and J. Barsky (1952). "In vivo inhibition of liver and brain monoamine oxidase by 1-Isonicotinyl-2-isopropyl hydrazine." Proc Soc Exp Biol Med **81**(2): 459-61.

Zhou, Q. G., L. J. Zhu, et al. "Hippocampal neuronal nitric oxide synthase mediates the stress-related depressive behaviors of glucocorticoids by downregulating glucocorticoid receptor." J Neurosci **31**(21): 7579-90.