UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO

**Participação do sistema noradrenérgico do núcleo leito da
estria terminal na mediação das consequências
comportamentais do estresse**

Michelly Martins Nagai

Ribeirão Preto

2012

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO

**Participação do sistema noradrenérgico do núcleo leito da
estria terminal na mediação das consequências
comportamentais do estresse**

Dissertação de Mestrado apresentada
ao Programa de Pós-Graduação em
Ciências Farmacêuticas para obtenção
do Título de Mestre em Ciências

Área de Concentração: Produtos
Naturais e Sintéticos

Orientado(a): Michelly Martins Nagai

Orientador(a): Prof^a. Dr^a. Sâmia
Regiane Lourenço Joca

Ribeirão Preto

2012

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

Martins-Nagai, Michelly

Participação do sistema noradrenérgico do núcleo leito da estria terminal na mediação das consequências comportamentais do estresse. Ribeirão Preto, 2012.

68 p.; 30cm.

Dissertação de Mestrado, apresentada à Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto/USP – Área de concentração: Produtos Naturais e Sintéticos.

Orientador: Joca, Sâmia Regiane Lourenço.

1. Núcleo leito da estria terminal. 2. Depressão. 3. Noradrenalina. 4. Receptores noradrenérgicos. 5. Teste do nado forçado.

FOLHA DE APROVAÇÃO

Michelly Martins Nagai

Participação do sistema noradrenérgico do núcleo leito da estria terminal na mediação das consequências comportamentais do estresse

Dissertação de Mestrado apresentada
ao Programa de Pós-Graduação em
Ciências Farmacêuticas para obtenção
do Título de Mestre em Ciências

Área de Concentração: Produtos
Naturais e Sintéticos.

Orientador(a): Prof^ª. Dr^a. Sâmia Regiane
Lourenço Joca

Aprovado em:

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Dedicatória

Aos meus pais, Jorge e Maria Antonia, que me ensinaram que a maior
riqueza que se pode deixar para um filho é a educação. A vocês,
por terem abdicado de seus sonhos para que os meus
se tornassem realidade.

Ao meu marido, Rafael, pelo apoio, compreensão,
companheirismo, carinho e amor...

Agradecimentos

À Prof^a. Dr^a. Sâmia Regiane Lourenço Joca, pela orientação, amizade e por ter acreditado em mim. Um verdadeiro exemplo de ética profissional e humana a ser seguido.

Aos meus pais, Jorge e Maria Antonia, pelo amor incondicional, dedicação e incentivo. Pelo exemplo de luta, força e determinação e por me ensinarem a encarar as dificuldades como oportunidades de crescimento.

Ao meu marido, Rafael, que esteve ao meu lado em todos os momentos. Por seu companheirismo, compreensão, paciência e, especialmente, por todo seu amor e carinho.

Aos meus irmãos, Raissa, Flávia e Gustavo, pela força e pelo carinho.

Aos professores Dr. Francisco Guimarães e Dr. Leonardo Resstel, por terem disponibilizado seus laboratórios para a realização de grande parte dos experimentos que compõem este trabalho.

Ao professor Dr. Leonardo Resstel, pelo esclarecimento de dúvidas e pelas discussões que aprimoraram este trabalho.

Ao amigo Felipe Villela Gomes, pelo auxílio na realização dos experimentos apresentados neste trabalho, pela paciência e disposição para me ensinar, pelas discussões e esclarecimentos tão enriquecedores.

Aos amigos e companheiros de laboratório (Amanda, Angélica, Ariandra, Carol, Cassiano, Deidiane, Karina, Laura, Mateus, Murilo, Rafaela, Vinícius e Vitor), pela amizade e pela convivência tão agradável.

A todos os amigos do laboratório do professor Dr. Leonardo Resstel, por terem compartilhado comigo seu ambiente de trabalho e por terem me recebido de forma tão agradável.

Às amigas Ariandra, Fernanda, Laena e Laura pelo companheirismo, apoio e inestimável amizade.

À amiga Caroline Teófilo (Carolzinha), que mesmo tão distante, esteve sempre presente me incentivando e torcendo por mim.

À Flávia Fiacadori Salata, Ivanilda A. C. Fortunato e Laura Camargo pelo indispensável apoio técnico.

Aos funcionários do Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Eleni, Rafael e Rosana, pela disponibilidade e competência com que realizam seu trabalho facilitando a vida dos pós-graduandos.

Às funcionárias da Farmacologia da FCFRP, Nina e Marlene, pela indispensável ajuda e agradável convívio.

Aos amigos e companheiros de pós-graduação, pela amizade e pelo aprendizado compartilhado.

Aos professores da banca examinadora do exame de qualificação e da defesa da dissertação, pela avaliação e pelas sugestões que contribuíram para a melhoria deste trabalho.

Às agências de fomento, CAPES e FAPESP, pelo auxílio financeiro.

“Dividir conhecimento é multiplicar sabedoria.”

Ricardo Lenz César

RESUMO

MARTINS-NAGAI, M. **Participação do sistema noradrenérgico do núcleo leito da estria terminal na mediação das consequências comportamentais do estresse.** 2012. 68f. Dissertação (Mestrado). Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2012.

O estresse parece ser um dos principais fatores responsáveis pela predisposição do indivíduo à depressão. Estudos prévios de nosso laboratório mostraram que a inativação aguda da transmissão sináptica no núcleo leito da estria terminal (NLET) provoca efeitos tipo-antidepressivos em animais submetidos ao modelo animal do nado forçado, indicando que sua ativação durante o estresse facilita o desenvolvimento de consequências comportamentais relacionadas à neurobiologia da depressão. Contudo, os neurotransmissores envolvidos na mediação de tais efeitos permanecem desconhecidos. Sabe-se que a neurotransmissão noradrenérgica no NLET é abundante e tem participação importante na regulação de processos emocionais relacionados à resposta ao estresse. Assim, o presente trabalho investigou o envolvimento da neurotransmissão noradrenérgica existente no núcleo leito da estria terminal (NLET) no desenvolvimento das consequências comportamentais do estresse relacionadas à neurobiologia da depressão, através da administração local de antagonistas noradrenérgicos em animais submetidos ao modelo animal do nado forçado. Os resultados mostraram que a administração local de WB4101 (antagonista α_1) (10 e 15 nmol), CGP20712 (antagonista β_1) (5 e 10 nmol) e ICI118,551 (antagonista β_2) (5 nmol) reduziu o tempo de imobilidade de animais submetidos ao teste do nado forçado. Além disso, a administração local das mesmas doses dessas drogas em grupos independentes de animais submetidos ao teste do campo aberto não causou alteração na atividade locomotora dos animais, descartando um possível efeito inespecífico sobre a atividade locomotora. Os resultados sugerem, portanto, o envolvimento da neurotransmissão noradrenérgica no NLET, através da ativação de receptores noradrenérgicos α_1 , β_1 e β_2 , na mediação das consequências comportamentais do estresse e nos mecanismos neurais envolvidos na neurobiologia da depressão.

Palavras-chave: núcleo leito da estria terminal; depressão; noradrenalina; receptores noradrenérgicos; teste do nado forçado.

ABSTRACT

MARTINS-NAGAI, M. **Involvement of the noradrenergic system of the bed nucleus of the stria terminalis in mediating the behavioral consequences of stress.** 2012. 68f. Dissertation (Master). Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2012.

Stress seems to be a major factor responsible for the individual's predisposition to depression. Previous studies from our laboratory have shown that acute inactivation of synaptic transmission within the bed nucleus of the stria terminalis (NLET) with cobalt chloride causes antidepressant-like effects in rats submitted to the forced swimming test, suggesting that NLET activation during stress facilitates the development of the behavioral consequences related to the neurobiology of depression. However, the neurotransmitters involved in mediating these effects remain unknown. It is known that the noradrenergic neurotransmission in NLET is abundant and plays an important role in regulating emotional processes related to stress response. Thus, the present study investigated the involvement of the noradrenergic neurotransmission in the bed nucleus of the stria terminalis (NLET) in the development of the behavioral consequences of stress related to the neurobiology of depression by local administration of noradrenergic antagonists in rats submitted to the forced swimming animal model. The results showed that the local administration of WB4101 (α_1 -antagonist) (10 and 15 nmol), CGP20712 (β_1 -antagonist) (5 and 10 nmol) and ICI118, 551 (β_2 -antagonist) (5 nmol) reduced the immobility time of animals submitted to the forced swimming test, an antidepressant-like effect. Furthermore, local administration of the same doses of these drugs in independent groups of animals submitted to the open field test did not change their locomotor activity, discarding a possible unspecific effect on locomotor activity. The results, therefore, suggest the involvement of the noradrenergic neurotransmission within the NLET, through the activation of noradrenergic receptors α_1 , β_1 and β_2 , in mediating the behavioral consequences of stress and the neural mechanisms involved in the neurobiology of depression.

Key-words: bed nucleus of stria terminalis, depression, noradrenaline, adrenoceptors, forced swimming test.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. A) Fotomicrografia de uma secção coronal do cérebro de rato mostrando o sitio de injeção no NLET. B) Diagramas representativos modificados do atlas de Paxinos e Watson (1997) indicando a dispersão dos sítios de injeção no cérebro dos ratos utilizados nos testes do nado forçado e do campo aberto.	35
Figura 2. Efeitos da injeção bilateral de salina (Sal; 0,1 µL/lado) ou WB4101 (5, 10 e 15 nmol/0,1 µL/lado) no NLET de animais submetidos ao teste do nado forçado (n = 7-9).....	36
Figura 3. Efeitos da injeção bilateral de salina (Sal; 0,1 µL/lado) ou RX821002 (5, 10 e 15 nmol/0,1 µL/lado) no NLET de animais submetidos ao teste do nado forçado (n = 7-9).....	37
Figura 4. Efeitos da injeção bilateral de salina (Sal; 0,1 µL/lado) ou CGP20712 (5, 10 e 15 nmol/0,1 µL/lado) no NLET de animais submetidos ao teste do nado forçado (n = 8-10).....	39
Figura 5. Efeitos da injeção bilateral de salina (Sal; 0,1 µL/lado) ou ICI118,551 (5, 10 e 15 nmol/0,1 µL/lado) no NLET de animais submetidos ao modelo do nado forçado (n = 5-9).....	40
Figura 6. Efeitos da injeção bilateral de salina (Sal; 0,1 µL/lado), ou CGP20712 (0,015 nmol/0,1 µL/lado), ou ICI118,551 (0,004 nmol/0,1 µL/lado) no NLET de animais submetidos à sessão teste do modelo donado forçado (n = 6-10).....	41

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Distância total percorrida no teste do campo aberto por animais que receberam salina ou WB4101.....	37
Tabela 2. Distância total percorrida no teste do campo aberto por animais que receberam salina ou RX821002.....	38
Tabela 3. Distância total percorrida no teste do campo aberto por animais que receberam salina ou CGP20712.....	39
Tabela 4. Distância total percorrida no teste do campo aberto por animais que receberam salina ou ICI118,551.....	41

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

CID-10 – Classificação Internacional das Doenças

OMS – Organização Mundial de Saúde

DSM –IV – Manual Diagnóstico e Estatístico de Doenças Mentais – Quarta Edição

5-HT – serotonina

HPA – eixo hipotálamo-hipófise-adrenal

MR – receptores mineralocorticoides

GR – receptores glicocorticoides

CRF – fator de liberação de corticotropina

CRF₁ – receptor do tipo 1 para fator de liberação de corticotropina

BDNF – fator neurotrófico derivado do cérebro

CREB – proteína ligante aos elementos responsivos ao AMPc

AMPc- Adenosina monofosfato cíclica

NLET- núcleo leito da estria terminal

c-FOS – marcador de ativação neuronal

PVN – núcleo paraventricular do hipotálamo

H³- trítio

SBNec – Sociedade Brasileira de Neurociência e Comportamento

WB4101 – 2-(2,6-Dimethoxyphenoxyethyl)aminomethyl-1,4-benzodioxane hydrochloride

RX821002 – 2-(2,3-Dihydro-2-methoxy-1,4-benzodioxin-2-yl)-4,5-dihydro-1H-imidazole hydrochloride

CGP20712 – 1-[2-((3-Carbamoyl-4-hydroxy)phenoxy)ethylamino]-3-[4-(1-methyl-4-trifluoromethyl-2-imidazolyl)phenoxy]-2-propanol dihydrochloride

ICI118,551 – (±)-*erythro*-(S*,S*)-1-[2,3-(Dihydro-7-methyl-1H-inden-4-yl)oxy]-3-[(1-methylethyl)amino]-2-butanol hydrochloride

K_i – constante de inibição

EPM – erro padrão da média

ANOVA – análise de variância

ACTH – hormônio adrenocorticotrópico

SUMÁRIO

Resumo	i
Abstract	ii
Lista de figuras	iii
Lista de tabelas	iv
Lista de abreviaturas e siglas	v
1.INTRODUÇÃO.....	2
1.1 Depressão.....	2
1.2 Neurobiologia da Depressão.....	4
1.3 Núcleo leito da estria terminal (NLET).....	9
1.3.1 Núcleo leito da estria terminal (NLET): aspectos gerais.....	9
1.3.2 Núcleo leito da estria terminal (NLET) e sua relação com estresse e depressão.....	10
1.4 Noradrenalina.....	14
1.4.1 Noradrenalina: aspectos gerais.....	14
1.4.1 Noradrenalina e sua relação com estresse depressão e núcleo leito da estria terminal (NLET).....	17
2. OBJETIVOS.....	22
2.1 Objetivo geral.....	22
2.2 Objetivos específicos.....	22
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	24
3.1 Animais.....	24
3.2 Drogas.....	24
3.3 Cirurgia estereotáxica.....	25
3.4 Microinjeção de drogas no núcleo leito da estria terminal (NLET)...	26
3.5 Teste do nado forçado.....	27
3.6 Teste do campo aberto.....	28
3.7 Protocolos experimentais.....	28
3.8 Análise histológica dos sítios de administração de drogas.....	31
3.8 Análise histológica dos sítios de administração de drogas.....	32
4. RESULTADOS.....	34
4.1 Localização dos sítios de injeção.....	34
4.2 Efeitos da administração de WB4101 no NLET de ratos submetidos ao teste do nado forçado e ao teste do campo aberto.....	36
4.3 Efeitos da administração de RX821002 no NLET de ratos submetidos ao teste do nado forçado e ao teste do campo aberto.....	37
4.4 Efeitos da administração de CGP20712 no NLET de ratos submetidos ao teste do nado forçado e ao teste do campo aberto.....	38
4.5 Efeitos da administração de ICI118,551 no NLET de ratos submetidos ao teste do nado forçado e ao teste do campo aberto.....	40

4.6 Efeitos da administração de CGP20712 e de ICI118,551, em doses baseadas em seus respectivos K_i 's para os receptores β_1 e β_2 , no NLET de ratos submetidos ao teste do nadoforçado.....	41
5. DISCUSSÃO.....	43
6. CONCLUSÃO.....	55
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	57

Introdução

1– INTRODUÇÃO

1.1 – Depressão

De acordo com a décima versão da Classificação Internacional das Doenças (CID-10), criada pela Organização Mundial de Saúde (OMS), os transtornos afetivos são aqueles cujo distúrbio principal é uma mudança no estado afetivo ou no humor para um estado de depressão (com ou sem associação à ansiedade) ou para um estado de euforia. Esses transtornos afetivos alteram o desempenho do indivíduo em atividades cotidianas e muitos tendem a ser recorrentes. Observa-se também que o início de alguns episódios, frequentemente, está associado a situações de estresse (OMS, 2010).

Os transtornos afetivos compreendem os episódios maníacos, os transtornos afetivos bipolares e os transtornos depressivos. Dentre os transtornos depressivos, incluem-se os episódios depressivos, os transtornos depressivos recorrentes e os transtornos depressivos persistentes, como a ciclotimia e a distímia (OMS, 2010).

De acordo com o Manual Diagnóstico e Estatístico de Transtornos Mentais – Quarta Edição (DSM - IV, 2005), elaborado pela Associação Americana de Psiquiatria, o indivíduo deprimido deve apresentar no mínimo cinco dos sintomas citados a seguir, durante pelo menos duas semanas consecutivas. Além disso, os dois primeiros sintomas citados devem, obrigatoriamente, estar presentes. Tais sintomas são: humor deprimido

(tristeza, desânimo); anedonia (perda do prazer); alterações no sono, no apetite, no peso e nas atividades diárias do indivíduo; falta de energia; dificuldade de concentração; baixa auto-estima; sentimento de culpa e ideia de morte, doença ou suicídio. De acordo com a intensidade e a duração desses sintomas, os episódios depressivos podem ser classificados como leves, moderados ou severos e, no caso daqueles que se repetem, observa-se o distúrbio depressivo recorrente (DSM - IV).

Acredita-se que a depressão atinge cerca de 21% da população mundial (SCHECHTER et al., 2005). Frequentemente, os episódios depressivos aparecem cedo na vida do indivíduo, podem ter um curso crônico e afetar o prognóstico de outras doenças (CHARNEY; MANJI, 2004). Estimativas da OMS indicam que atualmente a maior parte dos indivíduos deprimidos vive nos países em desenvolvimento e que, em 2030, a depressão será a patologia mais comum no mundo. Dessa forma, enormes custos econômicos e sociais serão gerados já que uma maior porcentagem dos recursos financeiros deverá ser destinada a prover o tratamento da população afetada. Adicionalmente, com o baixo desempenho de tal população no trabalho, a produtividade ficará reduzida, gerando considerável déficit econômico. Assim, a depressão passará a ser não só um problema de saúde pública, mas também um problema de ordem política, econômica e social (OMS, 2010).

Diversos estudos vêm sendo realizados com o objetivo de estabelecer as causas e buscar tratamentos mais eficazes para os transtornos afetivos. Entretanto, ainda há muito a ser esclarecido a respeito da neurobiologia desses

transtornos. Assim, considerando o impacto epidemiológico que os transtornos depressivos vêm atingindo no cenário mundial, causando prejuízos para a saúde pública e para o setor econômico-social e, sobretudo, considerando a perda da qualidade de vida e o sofrimento dos indivíduos acometidos, é fundamental a realização de novos estudos para elucidar a neurobiologia da depressão. Através do conhecimento dos mecanismos que desencadeiam estes transtornos, o desenvolvimento de tratamentos mais eficazes, certamente, será otimizado.

1.2– Neurobiologia da Depressão

Inúmeras pesquisas vêm sendo desenvolvidas com o objetivo de elucidar as causas e os processos envolvidos na neurobiologia da depressão. Embora tais questões ainda não estejam totalmente claras, acredita-se que a combinação entre fatores genéticos e fatores ambientais seja determinante no desencadeamento deste transtorno (GUIMARÃES et al., 1999; NESTLER et al., 2002; CHARNEY; MANJI, 2004; HAMET; TREMBLAY, 2005;).

Existem evidências de que polimorfismos em genes relacionados à neurotransmissão monoaminérgica são capazes de aumentar a predisposição de indivíduos ao desenvolvimento de transtornos afetivos. Entretanto, isso ocorre de forma dependente da presença concomitante de fatores ambientais estressantes (NESTLER et al., 2002; CASPI et al., 2003; HOLMANS et al., 2007). Caspi et al. (2003), por exemplo, mostraram que um polimorfismo no gene que codifica o transportador de serotonina (5-HT) é capaz de aumentar a sensibilidade a situações aversivas e, dessa forma, favorecer o

desenvolvimento de transtornos afetivos. Porém, esse polimorfismo teria apenas um caráter modulatório sobre os fatores ambientais, não sendo suficiente para, isoladamente, causar a depressão.

De fato, o estresse parece ser um dos principais fatores ambientais responsáveis pela predisposição do indivíduo à depressão (KENDLER et al., 1999). Segundo a definição clássica elaborada por Hans Selye em 1936, o estresse pode ser descrito como qualquer ameaça real ou potencial à homeostasia, de caráter físico, químico ou psicológico, capaz de induzir alterações comportamentais e fisiológicas significativas (SELYE, 1936). Post (1992) observou que cerca de 60% dos casos de depressão descritos na literatura estavam associados à existência prévia de fatores estressantes, destacando-se os psicossociais. Adicionalmente, o estresse pode aumentar as chances de ocorrência de depressão não só em indivíduos com predisposição genética, como também em indivíduos com baixo risco genético para tal transtorno (KENDLER et al., 1995). Pode-se perceber, então, a relevância de eventos estressantes no desenvolvimento do transtorno depressivo.

Após situações estressantes, o eixo hipotálamo-hipófise-adrenal (HPA) é ativado, com consequente liberação de glicocorticoides pela glândula suprarrenal. Os glicocorticoides são responsáveis por preparar o organismo para desafios fisiológicos ou ambientais, facilitando o desempenho do indivíduo frente ao estresse apresentado e a eventos posteriores (PEETERS; BROEKKAMP, 1994). E, além da função fundamental desempenhada pelos glicocorticoides na atividade basal do eixo HPA, tais substâncias também são primordiais para a limitação da resposta ao estresse, atuando nos receptores

mineralocorticoides (MR) e glicocorticoides (GR), localizados na hipófise, no hipotálamo, no hipocampo e no córtex (DE KLOET, 2000; MCEWEN, 2000).

Existem evidências de que o eixo HPA encontra-se hiperreativo em indivíduos deprimidos (PARIANTE; LIGHTMAN, 2008), indicando uma íntima relação entre estresse e depressão. Dados da literatura mostram que, em pacientes deprimidos, os níveis basais de cortisol estão aumentados e não respondem ao teste de supressão com dexametasona, um corticosteroide sintético (BAUMGARTNER et al., 1985). Foi demonstrado também que níveis basais e subsequentes ao teste de supressão com dexametasona parecem estar positivamente associados à severidade dos sintomas da depressão (WHITEFORD et al., 1987). De fato, em situações em que o estresse é intenso e persistente, o eixo HPA pode tornar-se hiper-reativo e pode produzir danos ao organismo (NESTLER et al., 2002; MCEWEN; WINGFIELD, 2003).

Acredita-se, por exemplo, que o excesso de glicocorticoides possa ser responsável pelos danos observados em estruturas límbicas de indivíduos deprimidos, tais como prejuízo no desenvolvimento e na manutenção de espinhas dendríticas corticais (LISTON; GAN, 2011) e atrofia hipocampal (SAPOLSKY, 1999). Isso poderia acarretar o mal funcionamento dessas estruturas e, conseqüentemente, os prejuízos emocionais e cognitivos que caracterizam tais desordens.

Uma vez que a exposição a situações de estresse predispõe o organismo ao desenvolvimento da depressão, a maior parte dos modelos animais para o estudo da neurobiologia da depressão envolve a pré-exposição do animal a um evento estressante inescapável e, posteriormente, avalia o

desenvolvimento de alterações comportamentais. Tais alterações são sensíveis ao tratamento com drogas antidepressivas (O'NEIL; MOORE, 2003; MATTHEWS, 2005; MCARTHUR; BORSINI, 2006), indicando que tais modelos possuem boa preditibilidade farmacológica.

No modelo animal do nado forçado (modelo utilizado no presente estudo), avalia-se o tempo de imobilidade do animal (período em que este permanece imóvel ou apenas com movimentos leves para não afundar na água) quando este é reexposto ao estresse de nado forçado (PORSOLT, 1977). Como tal alteração comportamental é atenuada pelo tratamento repetido com drogas antidepressivas de diferentes classes, considera-se que a diminuição do tempo de imobilidade durante o teste de nado forçado reflete um efeito tipo-antidepressivo (PORSOLT, 1977; CRYAN et al., 2002).

A maior parte das drogas antidepressivas conhecidas atua sobre o sistema monoaminérgico, seja inibindo a recaptação ou a metabolização de monoaminas, levando, portanto, à facilitação desse sistema de neurotransmissão. Esses dados sustentam a “Teoria monoaminérgica clássica da depressão”, baseada nas propostas de Schildkraut (1965) e de Lapin e Oxenkrug (1969), que preconiza que a depressão ocorreria devido a um prejuízo na neurotransmissão noradrenérgica e/ou serotoninérgica no sistema nervoso central (SCHILDKRAUT, 1965; LAPIN; OXENKRUG, 1969; CASTRÉN, 2005). Contudo, evidências mais recentes têm demonstrado que esta hipótese é bastante reducionista e apresenta falhas (RACAGNI; POPOLI, 2008). A hipótese não explica, por exemplo, o fato de os efeitos clínicos causados pelos antidepressivos só ocorrerem após três a quatro semanas de tratamento,

enquanto a inibição da recaptação de monoaminas ocorre logo após a administração dessas drogas (NESTLER, 1998). Outro aspecto importante é que cerca de 45% dos pacientes com transtornos depressivos não apresentam melhoras significativas com o tratamento farmacológico clássico (KEBS et al., 2007).

Além disso, uma vez que a simples depleção de monoaminas não explicava, completamente, a neurobiologia da depressão, novas teorias têm sido propostas, envolvendo a participação do eixo HPA e de substâncias como fator de liberação de corticotropina (CRF), glicocorticoides, fator neurotrófico derivado do cérebro (BDNF), proteína de ligação em resposta ao AMPc (CREB), cujos níveis se encontram alterados em indivíduos deprimidos e em situações de exposição ao estresse (NESTLER et al., 2002; CHARNEY; MANJI, 2004; CASTRÉN, 2005; DUMAN, 2006; PARIANTE; LIGHTMAN, 2008).

O conjunto de estruturas envolvidas na modulação da resposta comportamental ao estresse e na neurobiologia da depressão é complexo e envolve muitos locais do sistema nervoso central. Porém, certas estruturas têm recebido maior destaque, tais como hipocampo, hipotálamo, amígdala, tálamo, giro cingulado e córtex pré-frontal (PRICE; DREVETS, 2009). Nos últimos anos, grande importância vem sendo atribuída ao papel desempenhado por algumas estruturas subcorticais como núcleo acumbens, hipotálamo, amígdala e núcleo do leito da estria terminal na regulação da motivação, do sono, do apetite, do nível de energia, do ritmo circadiano, na resposta a estímulos

prazerosos e aversivos, características estas que são frequentemente afetadas em pacientes deprimidos (NESTLER et al., 2002).

Entretanto, apesar do surgimento de diversas hipóteses novas, os neurotransmissores e os mecanismos moleculares envolvidos na neurobiologia da depressão ainda não estão totalmente esclarecidos.

1.3– Núcleo leito da estria terminal

1.3.1 – Núcleo leito da estria terminal: aspectos gerais

O núcleo leito da estria terminal (NLET) é uma estrutura límbica situada ventralmente ao núcleo septal lateral e dorsalmente à área pré-óptica do hipotálamo, envolvendo a comissura anterior (DONG et al., 2001; FORRAY; GYSLING, 2004). Possui conexões com diversas estruturas límbicas, como córtex pré-frontal e amígdala, e com núcleos do tronco cerebral que regulam funções autonômicas e endócrinas, como o hipotálamo (MARTIN *et al.*, 1991; WALKER et al., 2003; FORRAY; GYSLING, 2004; SHIN et al., 2008). Dessa forma, sugere-se que o NLET seja um importante centro de integração de informações provenientes de regiões associadas ao controle de respostas endócrinas, autonômicas, cognitivas e emocionais (HERMAN et al., 2005; ALVES et al., 2007; CHOI et al., 2007; CRESTANI et al., 2007, 2008, 2010; RESSTEL et al., 2008).

O NLET é anatômica e funcionalmente heterogêneo (ASTON-JONES et al., 1999) e não há um consenso entre os diversos pesquisadores sobre a sua divisão anatômica. De acordo com Moga et al. (1989), o NLET é dividido nas

porções medial e lateral. A subdivisão medial conecta-se ao núcleo medial da amígdala, à área pré-óptica medial e ao hipotálamo ventromedial, regiões encefálicas envolvidas na regulação neuroendócrina e no comportamento sexual (MOGA et al., 1989; FORRAY; GYSLING, 2004;). Já a subdivisão lateral está estreitamente conectada a regiões cerebrais que coordenam respostas comportamentais, autonômicas e neuroendócrinas ao estresse e a estímulos aversivos, como o núcleo central da amígdala, o núcleo parabraquial, a substância cinzenta periaquedutal, o núcleo do trato solitário, a área tegmental ventral e os núcleos paraventricular, periventricular, dorsomedial e dorsolateral do hipotálamo (DE OLMOS et al., 1985; MOGA et al., 1989; LOEWY, 1991; DONG; SWANSON, 2004).

Mais recentemente, núcleos celulares distintos, dentro das divisões previamente definidas, têm sido reconhecidos com base em características citoarquitetônicas similares (SWANSON, 1998). Cada um desses núcleos recebe e envia projeções nervosas distintas (DONG et al., 2001), podendo causar ativação ou inibição do eixo HPA (CHOI et al., 2007).

1.3.2 – Núcleo leito da estria terminal e sua relação com estresse e depressão

Estudos recentes sugerem que o NLET tem participação importante na modulação da resposta autonômica, endócrina e comportamental ao estresse (MORILAK, 2004; GREENWOOD et al., 2005; BEIJAMINI; GUIMARÃES, 2006; MA; VALLES et al., 2006; CRESTANI et al., 2010). Seu papel na adaptação ao

estresse e suas conexões com outras estruturas límbicas tradicionalmente relacionadas à depressão, como hipocampo e córtex pré-frontal medial, têm tornado a estrutura um importante objeto de estudo sobre a neurobiologia da depressão.

Deve-se também ressaltar a função desempenhada pelo NLET na regulação da atividade do eixo HPA, frequentemente aumentada em indivíduos deprimidos (PARIANTE; LIGHTMAN, 2008). Estruturas límbicas relacionadas à resposta ao estresse, como hipocampo, amígdala e córtex, enviam projeções neuronais para o NLET e este, por sua vez, envia projeções para o núcleo paraventricular do hipotálamo (PVN), influenciando a atividade do eixo HPA durante o estresse (MORILACK et al., 2005; CHOI et al., 2007, 2008; JANKORD; HERMAN, 2008). Estudos de lesão e estimulação sugerem que o NLET pode estimular ou inibir a atividade do eixo HPA, de forma sítio-dependente (MORILACK et al., 2005). As regiões posteriores/mediais do NLET estão envolvidas na inibição da atividade do eixo HPA (DUNN, 1987; HERMAN et al., 1994). Recebem, principalmente, inervação glutamatérgica do hipocampo e enviam projeções GABAérgicas para o PVN (DONG; SWANSON, 2004). Já as regiões anteriores/laterais do NLET estão relacionadas ao aumento da atividade do eixo HPA (DUNN, 1987; GRAY et al., 1993; HERMAN et al., 1994; CRANE et al., 2003a). Recebem tanto projeções inibitórias quanto excitatórias. As projeções inibitórias GABAérgicas são provenientes da amígdala e atuam inibindo os neurônios GABAérgicos do NLET que inervam o PVN. Com relação às projeções excitatórias, podem ser glutamatérgicas e originárias do córtex ou de neurônios da amígdala contendo CRF. Ambas

aumentam a estimulação de neurônios glutamatérgicos e/ou CRF-positivos do NLET que inervam o PVN (DONG et al., 2001; DONG; SWANSON, 2006; CHOI et al., 2007;).

Dados da literatura indicam que o NLET é ativado por diversos estímulos estressantes, como exposição ao predador, ao estresse incontrolável e ao nado forçado (GREENWOOD et al., 2005; BEIJAMINI; GUIMARÃES, 2006; MUIGG et al., 2007). Neste último trabalho, foi observado que a exposição de ratos ao estresse de nado forçado aumentou a expressão da proteína Fos, um marcador de ativação neuronal, no NLET, um efeito que foi atenuado pelo tratamento sistêmico com antidepressivos (MUIGG et al., 2007), indicando a ativação dessa estrutura durante situações de estresse e, conseqüentemente, seu provável envolvimento na mediação das conseqüências comportamentais do estresse e na neurobiologia da depressão. Isso é corroborado por evidências de que a exposição de roedores a estímulos estressantes que induzem o desenvolvimento de conseqüências comportamentais relacionadas à neurobiologia da depressão aumenta a atividade de neurônios presentes no NLET (GREENWOOD et al., 2005; STONE et al., 2006; MUIGG et al., 2007; SILVA et al., 2011;), de maneira sensível ao tratamento sistêmico com drogas antidepressivas (MUIGG et al., 2007; SILVA et al., 2011). Esses dados também sugerem, ainda, que o NLET seria um possível sítio de ação dos antidepressivos.

Entretanto, os estudos realizados para investigar a participação do NLET na neurobiologia da depressão empregando lesão da estrutura, revelam resultados contraditórios. Enquanto lesões químicas no NLET de ratos

submetidos ao modelo animal do desamparo aprendido induziram efeitos tipo-antidepressivo (HAMMACK et al., 2004; GREENWOOD et al., 2005), lesões eletrolíticas no NLET de ratos submetidos ao modelo animal do nado forçado promoveram efeito oposto (SCHULZ; CANBEYLI, 2000; PEZUK et al., 2008). As causas desses resultados contraditórios podem estar relacionadas aos diferentes modelos animais utilizados ou às diferenças nos tipos de lesões empregadas, como tamanho, tempo de recuperação ou natureza da lesão – química ou eletrolítica. Além disso, lesões eletrolíticas podem destruir fibras de passagem e induzir mudanças plásticas locais (RANGEL et al., 2003) que poderiam causar alterações comportamentais.

Outro aspecto negativo das técnicas de lesão é a impossibilidade de se determinar em que momento a interrupção da atividade do NLET interfere no desenvolvimento das alterações comportamentais, por exemplo, durante a pré-exposição ou durante a exposição ao estresse (CRESTANI et al., 2009). Uma vez que o NLET possui conexões com estruturas implicadas na memória e no aprendizado de eventos estressantes, como córtex pré-frontal medial, hipocampo e amígdala (JALABERT et al., 2009), a sua participação nos mecanismos cognitivos envolvidos no desenvolvimento das consequências comportamentais induzidas pelo estresse deve ser considerada.

Assim, corroborando a participação do NLET na neurobiologia da depressão, nosso grupo demonstrou que a inativação temporária da transmissão sináptica no NLET com cloreto do cobalto, um bloqueador sináptico não seletivo, antes ou após a exposição ao estresse, induz efeito tipo-antidepressivo em animais submetidos ao teste do nado forçado (CRESTANI et

al., 2010). Portanto, esses dados sugerem que a ativação do NLET durante o estresse pode favorecer o desenvolvimento de consequências comportamentais relacionadas à depressão.

Apesar das evidências que sustentam um possível envolvimento do NLET na neurobiologia da depressão, ainda não se sabe quais neurotransmissores estariam envolvidos nesses processos.

1.4 - Noradrenalina

1.4.1 - Noradrenalina: aspectos gerais

No início dos anos vinte, Canon e Uridil (1921) verificaram que a estimulação de nervos hepáticos simpáticos resultava na liberação de uma substância idêntica à adrenalina, capaz de induzir aumento da pressão sanguínea e do ritmo cardíaco. Tal substância foi denominada simpatina por Canon e, em estudos subsequentes, demonstrou-se que se tratava de um mediador químico liberado pelos nervos simpáticos nas junções neuroefetoras (GREER et al., 1938).

A simpatina assemelhava-se farmacologicamente à adrenalina, embora os efeitos de estimulação nervosa simpática fossem reproduzidos, de forma mais precisa, pela injeção de aminas simpatomiméticas primárias do que pela injeção de adrenalina ou de outras aminas secundárias (BARGER; DALE, 1910). Dessa forma, Bacq (1934) sugeriu que a simpatina E, a qual possuía atividade excitatória sobre os vasos, causando contração destes, seria a

noradrenalina, o que foi confirmado em 1946, por Von Euler, com extratos purificados do nervo esplênico de bovinos (VON EULER, 1946).

Von Euler (1946) considerou, então, a noradrenalina como a substância simpatomimética principal nos nervos simpáticos pós-ganglionares de mamíferos, agindo como mediador adrenérgico liberado após estimulação dos mesmos. Posteriormente, Vogt (1954) verificou a presença de noradrenalina em várias regiões do sistema nervoso central de cães, através da purificação de extratos de diversas áreas do cérebro desses animais.

Uma vez que a noradrenalina não atravessa a barreira hematoencefálica, as moléculas do neurotransmissor presentes no sistema nervoso central são sintetizadas pelas células nervosas. A L-tirosina, um aminoácido aromático, é o precursor da noradrenalina. Após sua captação, a L-tirosina é hidroxilada produzindo a diidroxifenilalanina, etapa catalisada pela enzima tirosina hidroxilase. Este é o passo limitante da síntese, já que o produto final da via, a noradrenalina, inibe a enzima tirosina hidroxilase. Na etapa seguinte, a enzima dopa descarboxilase catalisa a descarboxilação da diidroxifenilalanina, convertendo-a em dopamina. Finalmente, a noradrenalina é sintetizada através da hidroxilação da dopamina, reação catalisada pela enzima dopamina- β -hidroxilase (GOODMAN; GILMAN, 2006). A noradrenalina é, então, captada do citoplasma para o interior de vesículas sinápticas por um transportador vesicular de monoaminas, através de um mecanismo de captação ativa que utiliza magnésio e o gradiente de prótons transvesicular como força impulsora (BOGDANSKI, 1988).

Após ser liberada na fenda sináptica, devido à chegada de um impulso nervoso, a noradrenalina pode atuar em receptores pré ou pós-sinápticos ou ser recaptada para o interior da célula (CUNAME, 1984). Essa captação é realizada por uma proteína transportadora presente na membrana plasmática dos neurônios noradrenérgicos, através de um processo ativo e saturável, com grande afinidade para noradrenalina e dependente de sódio e cloreto (GRAHAM; LANGER, 1992). A noradrenalina também pode ser inativada através de reações de oxidação catalisadas pela enzima monoaminoxidase (MAO) e de metilação catalisadas pela enzima catecol-O-metiltransferase (COMT) (BECKMANN, 1978).

A ação da noradrenalina se dá através da ativação de diversos tipos de receptores noradrenérgicos. Já na primeira metade do século XX, Alquist (1948) postulou, com base na ordem de potência dos agonistas adrenalina, noradrenalina e isoprenalina, a existência de dois tipos de receptores: α e β . Estudos subsequentes, a partir da década de 50, utilizando antagonistas revelaram a existência de dois subtipos principais de receptores α (α_1 e α_2) e três subtipos de receptores β (β_1 , β_2 e β_3). Posteriormente, trabalhos com técnicas de clonagem mostraram que os receptores α_1 e α_2 são constituídos, cada um, de três outras subclasses (α_{1A} , α_{1B} , α_{1D} , α_{2A} , α_{2B} e α_{2C}) (BYLUND, 1994; INSEL, 1996).

Todos os receptores noradrenérgicos são receptores típicos acoplados à proteína G. Cada uma das classes desses receptores está associada a um sistema específico de segundos mensageiros (SUMMERS; MCMartin, 1993). Os receptores α_1 estão acoplados à fosfolipase C e produzem seus efeitos

principalmente através da liberação de Ca^{2+} intracelular. Já os receptores α_2 estão negativamente acoplados à adenilato ciclase e reduzem a formação de AMPc, além de inibirem os canais de Ca^{2+} . Com relação aos receptores β , todos os três tipos atuam através da estimulação da adenilato ciclase, aumentando a formação de AMPc. (GOODMAN; GILMAN, 2006).

De forma geral, os receptores noradrenérgicos estão amplamente distribuídos no sistema nervoso central e quanto na periferia. Predominantemente, os receptores do tipo α_2 são pré-sinápticos e sua ativação promove inibição da liberação de noradrenalina (GOODMAN; GILMAN, 2006).

Existem sete grupos distintos de corpos celulares noradrenérgicos (A1 – A7) no tronco cerebral e o *locus coeruleus*, que enviam projeções neuronais para diversas partes do sistema nervoso central (DAHLSTRÖM et al., 1964). Phelix et al. (1992), localizou terminações nervosas noradrenérgicas no NLET (PHELIX, et al., 1992). Além disso, foi verificado que tais terminações têm origem nos grupos de células A1, A2 e A5 (BYRUM; GUYENET, 1987, WOULFE et al., 1988, ASTON-JONES et al., 1999) e, em menor extensão, no grupo A6 (MOORE, 1978).

1.4.2 - Noradrenalina e sua relação com estresse, depressão e NLET

Na década de sessenta, Glowinski e Axelrod (1964) observaram que a imipramina, uma droga utilizada para alívio dos sintomas da depressão, era capaz de inibir a captação de noradrenalina tritiada (noradrenalina ligada a um

átomo de trítio – H^3) no cérebro de ratos, sugerindo o envolvimento da noradrenalina no mecanismo de ação dos antidepressivos.

De fato, o sistema noradrenérgico central desempenha importante função na regulação da atenção, do aprendizado, da memória, da emoção, da reprodução e das respostas ao estresse (BERRIDGE; WATERHOUSE, 2003; SARA, 2009). Essa neurotransmissão também está envolvida nos transtornos afetivos (CHARNEY, 2003), o que pode ser evidenciado pelo fato de que drogas que inibem a recaptação ou a metabolização de noradrenalina são eficazes no tratamento desses distúrbios, como antidepressivos tricíclicos, inibidores seletivos da recaptação de noradrenalina e inibidores da MAO (BALDESSARINI, 2006). Além disso, o tratamento crônico com antidepressivos de diferentes classes pode causar alterações funcionais e plásticas no sistema noradrenérgico, tais como diminuição da frequência de disparo dos neurônios do *Locus coeruleus* e “down-regulation” de receptores β -adrenérgicos no córtex frontal (MONGEAU et al., 1997).

Observou-se que a estimulação elétrica do NLET provoca liberação de noradrenalina (PHELIX et al., 1992) e, sabe-se que os níveis extracelulares no NLET desse neurotransmissor são regulados por recaptação local e por ativação de receptores noradrenérgicos α_2 (PALIJ; STAMFORD, 1992, PALIJ; STAMFORD, 1993). Esses dados confirmam a presença de terminações noradrenérgicas no NLET.

Diversos trabalhos têm demonstrado que a noradrenalina é um dos neurotransmissores mais abundantes no NLET (BROWNSTEIN et al., 1974; PHELIX et al., 1992) e que o sistema noradrenérgico do NLET parece ser

importante para desencadear respostas ao estresse. Pacak *et al.* (1995), por exemplo, observaram que ratos submetidos ao estresse de restrição apresentam aumento nos níveis de noradrenalina no NLET. Há também evidências de que o bloqueio farmacológico de receptores noradrenérgicos nessa estrutura atenua as respostas comportamentais e neuroendócrinas em ratos expostos ao estresse de restrição (CECCHI *et al.*, 2002).

Morilak *et al.* (2003) também demonstraram que o aumento da liberação de noradrenalina no NLET, em consequência à exposição ao estresse, induz comportamentos tipo-ansiosos em modelos animais como o labirinto em cruz elevado e o modelo de interação social. Assim, o aumento de noradrenalina no NLET poderia contribuir para o desenvolvimento das consequências comportamentais do estresse.

Através de registros eletrofisiológicos e de microdiálise, alguns estudos sugeriram a presença de receptores noradrenérgicos α_1 e α_2 no NLET (SAWADA; YAMAMOTO, 1981; MATSUI; YAMAMOTO, 1984; FORRAY *et al.*, 1999). Adicionalmente, a presença de receptores noradrenérgicos β_1 e β_2 no NLET foi indicada por evidências farmacológicas (CECCHI *et al.*, 2002). Entretanto, apesar de evidências sugerindo a presença de tais receptores no NLET, não existem estudos sobre o envolvimento dos mesmos na mediação das consequências comportamentais ao estresse de nado forçado e demais testes preditivos de efeitos antidepressivos.

Dessa forma, considerando a participação do NLET, bem como a participação da noradrenalina na mediação das consequências comportamentais ao estresse e a presença de receptores noradrenérgicos α e

β no NLET, nosso trabalho testou a hipótese de que a neurotransmissão noradrenérgica existente no NLET contribui para o desenvolvimento das consequências comportamentais do estresse relacionadas à neurobiologia da depressão. Para tal, investigamos os efeitos induzidos pela administração, no NLET, de antagonistas dos receptores noradrenérgicos α_1 , α_2 , β_1 e β_2 , vinte e quatro horas após a pré-exposição ao estresse, em animais submetidos ao teste do nado forçado, um modelo animal sensível a drogas antidepressivas.

Objetivos

2 – OBJETIVOS

2.1. Objetivo geral

Testar a hipótese de que a neurotransmissão noradrenérgica presente no NLET estaria envolvida na mediação das consequências comportamentais do estresse relacionadas à depressão.

2.2. Objetivos específicos

Investigar a participação dos receptores noradrenérgicos dos tipos α_1 , α_2 , β_1 e β_2 presentes no NLET, na mediação das consequências comportamentais induzidas pela exposição ao estresse de nado forçado em ratos, através da administração local de antagonistas seletivos para tais receptores, vinte e quatro horas após a pré-exposição ao estresse (10 minutos antes do teste).

Material e métodos

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Animais

Foram utilizados ratos Wistar pesando entre 240-270g (com aproximadamente 7-8 semanas de idade) provenientes do Biotério Central do Campus da USP de Ribeirão Preto. Os animais permaneceram no biotério do próprio laboratório sob condições laboratoriais padrões, com temperatura controlada ($24 \pm 1^\circ\text{C}$), livre acesso à água e alimento e ciclo claro/escuro de 12 horas (luzes acesas das 6:00 h às 18:00 h). Todos os experimentos foram realizados de acordo com as orientações da Sociedade Brasileira de Neurociência e Comportamento (SBNeC) para o cuidado e uso de animais de laboratório. As condições de acondicionamento e os protocolos experimentais foram aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais da USP, Campus de Ribeirão Preto (protocolo nº 11.1.136.53.3).

3.2. Drogas

Foram utilizadas as seguintes drogas:

- WB4101 (Tocris, EUA): antagonista seletivo dos receptores noradrenérgicos α_1 ;
- RX821002 (Tocris, EUA): antagonista seletivo dos receptores noradrenérgicos α_2 ;
- CGP20712 (Tocris, EUA): antagonista seletivo dos receptores noradrenérgicos β_1 ;

- ICI118,551 (Tocris, EUA): antagonista seletivo dos receptores noradrenérgicos β_2 .

Todas as drogas citadas acima foram administradas localmente no NLET, nas doses de 5, 10 e 15 nmol/0,1 μ L/lado. As doses foram baseadas em trabalhos prévios da literatura investigando o efeito da microinjeção dessas drogas no NLET (CRESTANI *et al.*, 2008; 2009a; 2009b).

As drogas foram dissolvidas em salina (NaCl 0,9%) estéril e administradas através de microinjeção bilateral no NLET. As soluções foram preparadas imediatamente antes do uso e mantidas sob proteção da luz durante toda a sessão experimental.

3.3. Cirurgia estereotáxica

Os ratos foram anestesiados com 2,2,2-tribromoetanol (1 mL/100 g, i.p., Sigma-Aldrich, EUA) e, após tricotomia da cabeça, foram fixados no aparelho estereotáxico (Stoelting, EUA). Logo em seguida, receberam injeção subcutânea de lidocaína 2% (contendo epinefrina 2% para promover vasoconstrição local), como anestésico local. A calota craniana foi exposta por meio de uma incisão da pele de aproximadamente 1,5 cm de diâmetro. O periósteo foi retirado e cânulas de aço inoxidável (13 mm de comprimento e 0,6 mm de diâmetro externo) foram implantadas bilateralmente e direcionadas para o NLET. As coordenadas para implantação das cânulas (antero-posterior: +7,6 mm a partir da linha interaural; lateral: +4,0 mm a partir da sutura medial; vertical: -5,5 mm do crânio com uma inclinação de 23°) foram selecionadas do

atlas de Paxinos e Watson (1997). As cânulas foram fixadas ao crânio com resina acrílica autopolimerizável e mandris de 0,3 mm de diâmetro foram introduzidos nas mesmas para evitar que fossem obstruídas durante o período de recuperação do animal.

Como medida profilática, ao final da cirurgia, cada animal recebeu injeção de poliantibiótico veterinário (0,1 mL/100g, i.m.; Pentabiotico®, Fort Dodge, Brasil) para prevenir infecções. No pós-cirúrgico imediato, cada animal também recebeu injeção de antiinflamatório não-esteroidal (0,1 mL/100g, s.c.; Banamine®, Schering-Plough, Brasil) para analgesia pós-operatória. Após a cirurgia, os animais foram mantidos sob aquecimento fornecido por uma lâmpada de 60 W até se recuperarem da anestesia. Após esse período, os animais foram novamente acondicionados em suas caixas, onde permaneceram em repouso por 5 a 7 dias, até o início dos experimentos.

3.4. Microinjeção de drogas no NLET

Uma agulha de 14 mm foi conectada a uma microseringa de 10 µL (7001 KH, Hamilton Co., EUA) através de um tubo de polietileno PE-10 (Clay-Adams, EUA). Após a introdução da agulha na cânula-guia, as soluções foram infundidas, em volume de 0,1 µL, com uso de uma bomba de infusão (KD Scientific Inc., EUA), a uma velocidade de 0,2 µL/min. A agulha permaneceu no local por mais 45-60 segundos para evitar refluxo.

3.5. Teste do nado forçado

Foi realizado o teste do nado forçado, um modelo animal amplamente utilizado no estudo da neurobiologia da depressão para verificar os efeitos comportamentais induzidos por drogas antidepressivas. Neste caso, tais efeitos são evidenciados através da redução da imobilidade do animal durante o teste (PORSOLT, 1977).

Os animais foram colocados, individualmente, em um cilindro de plástico (com aproximadamente 30 cm de diâmetro, 90 cm de altura, contendo água até uma altura de 30 a 40 cm, com temperatura de $24\pm 1^{\circ}\text{C}$, de acordo com Joca e Guimarães, 2006), por um período de 15 minutos (pré-teste). Após esse período, foram retirados e colocados, separadamente, para secar, antes de retornarem para suas caixas de origem.

Vinte e quatro horas depois, os animais foram submetidos a uma sessão de 5 minutos de nado forçado (teste). As sessões de teste foram filmadas e através dos vídeos foi registrado, sem que o experimentador soubesse qual tratamento o animal recebeu, o tempo total de imobilidade, no qual o animal permaneceu parado realizando apenas pequenos movimentos necessários para a flutuação. A água foi trocada entre cada sessão para evitar a interferência de substâncias de alarme. Segundo Abel e Bilitzke (1990), essas substâncias são liberadas por animais expostos a situações aversivas. Animais submetidos ao nado forçado liberariam tais substâncias de alarme e estas poderiam ser detectadas por outros animais posteriormente colocados na mesma água, interferindo no comportamento (ABEL; BILITZKE, 1990).

3.6. Teste do campo aberto

Para verificar um possível efeito não-específico das drogas injetadas no NLET sobre a atividade locomotora, o que poderia interferir no comportamento do animal no teste do nado forçado, grupos independentes de animais foram submetidos ao teste do campo aberto. O campo aberto consiste em uma arena circular de acrílico com aproximadamente 60 cm de diâmetro. No momento do teste, os animais foram colocados, individualmente, no centro da arena e a distância total percorrida foi registrada durante 5 minutos utilizando o software ANY-MAZE (Stoelting, Irlanda).

3.7. Protocolos experimentais

Experimento 1: efeitos da administração de WB4101 no NLET de ratos submetidos ao teste do nado forçado e ao teste do campo aberto

Uma semana após a cirurgia estereotáxica, os animais foram submetidos ao teste comportamental. Foram, então, divididos aleatoriamente em grupos e receberam injeções intra-NLET de veículo (salina, $n=7$) ou de WB4101 (5, 10 e 15 nmol/0,1 μ L/lado; $n=7-9$ /grupo), 10 minutos antes da sessão teste do nado forçado. Grupos independentes de animais receberam injeções de veículo ou de WB4101 (5, 10 e 15 nmol/0,1 μ L/lado) e foram testados no campo aberto ($n=4-6$ /grupo), 10 minutos após o tratamento.

Experimento 2: efeitos da administração de RX821002 no NLET de ratos submetidos ao teste do nado forçado e ao teste do campo aberto

Uma semana após a cirurgia estereotáxica, os animais foram submetidos ao teste comportamental. Foram, então, divididos aleatoriamente em grupos e receberam injeções intra-NLET de veículo (salina, n= 9) ou de RX821002 (5, 10 e 15 nmol/0,1 µL/lado; n= 6-7/grupo), 10 minutos antes da sessão teste do nado forçado. Grupos independentes de animais receberam injeções de veículo ou de RX821002 (5, 10 e 15 nmol/0,1 µL/lado) e foram testados no campo aberto (n= 5-6/grupo), 10 minutos após o tratamento.

Experimento 3: efeitos da administração de CGP20712 no NLET de ratos submetidos ao teste do nado forçado e ao teste do campo aberto

Uma semana após a cirurgia estereotáxica, os animais foram submetidos ao teste comportamental. Foram, então, divididos aleatoriamente em grupos e receberam injeções intra-NLET de veículo (salina, n= 8) ou de CGP20712 (5, 10 e 15 nmol/0,1 µL/lado; n= 8-10/grupo), 10 minutos antes da sessão teste do nado forçado. Grupos independentes de animais receberam injeções de veículo ou de CGP20712 (5, 10 e 15 nmol/0,1 µL/lado) e foram testados no campo aberto (n= 4-6/grupo), 10 minutos após o tratamento.

Experimento 4: efeitos da administração de ICI118,551 no NLET de ratos submetidos ao teste do nado forçado e ao teste do campo aberto

Uma semana após a cirurgia estereotáxica, os animais foram submetidos ao teste comportamental. Foram, então, aleatoriamente divididos em grupos e receberam injeções intra-NLET de veículo (salina, n= 9) ou de ICI118,551 (5, 10 e 15 nmol/0,1 µL/lado; n= 5-9/grupo), 10 minutos antes da sessão teste do nado forçado. Grupos independentes de animais que receberam injeções de veículo ou de ICI118,551 (5, 10 e 15 nmol/0,1 µL/lado) foram testados no campo aberto (n= 5/grupo), 10 minutos após o tratamento.

Experimento 5: efeitos da administração de CGP20712 e de ICI118,551, em doses baseadas nos valores das constantes de inibição (K_i) para os receptores β_1 e β_2 , no NLET de ratos submetidos ao teste do nado forçado

Uma vez que tanto o antagonista de receptores noradrenérgicos β_1 , CGP20712, quanto o antagonista de receptores noradrenérgicos β_2 , ICI118,551, foram capazes de induzir efeito tipo-antidepressivo na dose de 5 nmol/0,1 µL/lado em nosso estudo, fizemos este experimento adicional para investigar se o efeito observado seria consequência do bloqueio de apenas um dos tipos de receptores (β_1 ou β_2). Este suposto bloqueio seletivo (de receptores noradrenérgicos β_1 ou β_2) poderia estar sendo encoberto por uma possível perda de seletividade das drogas nas doses previamente utilizadas.

Assim, utilizamos doses equipotentes dos antagonistas seletivos (0,004 nmol/0,1 µL/lado de CGP20712 e 0,015 nmol/0,1 µL/lado de ICI118,551)

obtidas com base nos valores das constantes de inibição (K_i) de cada droga para os receptores noradrenérgicos β_1 e β_2 (K_i do antagonista de receptores noradrenérgicos β_1 , CGP20712, igual a 0,6 nM e a 1500 nM para os receptores β_1 e β_2 , respectivamente; K_i do antagonista de receptores noradrenérgicos β_2 , ICI118,551, igual a 710 nM e a 4,6 nM para os receptores β_1 e β_2 , respectivamente) (BYLUND et al., 1994).

Uma semana após a cirurgia estereotáxica, os animais foram submetidos ao teste comportamental. Foram, então, divididos aleatoriamente em grupos e receberam injeções intra-NLET de veículo (salina, $n=6$), ou de CGP20712 (0,004 nmol/0,1 μ L/lado, $n=10$), ou de ICI118,551 (0,015 nmol/0,1 μ L/lado; $n=9$), 10 minutos antes da sessão teste do nado forçado.

3.8. Análise histológica dos sítios de administração de drogas

Ao término dos experimentos, os ratos foram anestesiados com uretana (0,5 mL/100g, i.p.; Sigma-Aldrich, EUA) e perfundidos através do ventrículo esquerdo do coração, com salina isotônica e, logo em seguida, solução de formalina 10%. Antes da perfusão, uma agulha de 14 mm, conectada a uma microseringa de 10 μ L (7001 KH, Hamilton Co., EUA) através de um tubo de polietileno PE-10 (Clay-Adams, EUA), foi inserida em cada cânula-guia e 0,1 μ L do corante *Evan's blue* a 1% foi injetado bilateralmente para marcar o sítio de injeção. Os cérebros foram removidos e imersos em solução de formalina 10%. Posteriormente (3-4 dias), foram seccionados, em cortes frontais, em criostato (-18°C, Cryocut 1800, Leica, Alemanha) numa espessura de 40 μ m.

Os sítios das injeções foram analisados no microscópio e identificados com o auxílio do atlas de Paxinos e Watson (1997). Como um controle histológico, animais submetidos ao teste do nado forçado que receberam doses ativas das drogas avaliadas fora do NLET foram reunidos em um grupo adicional (“Out”).

3.9. Análise estatística

O tempo de imobilidade no teste do nado forçado e a distância total percorrida no teste do campo aberto foram expressos como a média $\pm$ EPM e analisados usando ANOVA de uma via, seguido do pós-teste de Newman-Keuls. O nível de significância assumido foi de $P < 0,05$.

Resultados

4. RESULTADOS

4.1. Localização dos sítios de injeção

Os sítios das injeções das drogas e de veículo (salina) foram analisados no microscópio e identificados com o auxílio do atlas de Paxinos e Watson (1997).

A Figura 1 mostra uma fotomicrografia e representações diagramáticas do NLET (modificada do Atlas de Paxinos e Watson, 1997), indicando os sítios de injeção de drogas no NLET de todos os animais utilizados nos experimentos.

A **B**

Figura 1 - A) Fotomicrografia de uma secção coronal do cérebro de um rato mostrando o sítio de injeção no NLET. **B)** Diagramas representativos modificados do atlas de Paxinos e Watson (1997) indicando a dispersão dos sítios de injeção no cérebro dos ratos utilizados nos testes do nado forçado e do campo aberto. Os círculos representam os sítios de injeção no NLET (círculos pretos) e fora do NLET (círculos brancos) de todos os animais usados nos experimentos. IA- coordenada interaural; ac- comissura anterior; cc- corpo caloso; f- fornix; ic- capsula interna; LV- ventrículo lateral; LSV- área septal lateral ventral; st- estria terminal.

4.2. Efeitos da administração de WB4101 no NLET de ratos submetidos ao teste do nado forçado e ao teste do campo aberto

Injeções de WB4101 (10 e 15 nmol/0,1 μ L/lado) no NLET reduziram o tempo de imobilidade no teste do nado forçado quando comparado aos animais tratados com veículo ($F_{4,30} = 6,26$, $P < 0,05$, pós-teste de Newman-Keuls, $P < 0,05$; Figura 2), sem afetar a atividade locomotora no teste do campo aberto ($F_{3,15} = 0,25$, $P > 0,05$; Tabela 1). Além disso, a administração de WB4101 fora do NLET não modificou o tempo de imobilidade de animais submetidos ao teste do nado forçado (grupo *Out*, pós-teste de Newman-Keuls, $P > 0,05$ Figura 2).

Figura 2 – Efeitos da injeção bilateral de salina (Sal; 0,1 μ L/lado) ou WB4101 (5, 10 e 15 nmol/0,1 μ L/lado) no NLET de animais submetidos ao teste do nado forçado ($n = 7-9$). Animais que receberam doses efetivas de WB4101 fora do NLET foram reunidos em um grupo adicional (*Out*, $n = 4$). As colunas representam a média e as barras o EPM. * $P < 0,05$ comparado ao grupo tratado com salina (ANOVA de uma via seguido de pós-teste de Newman-Keuls).

Tabela 1 – Distância total percorrida no teste do campo aberto por animais que receberam salina ou WB4101.

Grupo	Distância percorrida (m)
Veículo	15,1 ± 5,4
WB 5 nmol/0,1 µL/lado	11,0 ± 3,2
WB 10 nmol/0,1 µL/lado	13,2 ± 2,6
WB 15 nmol/0,1 µL/lado	12,8 ± 2,0
	$F_{3,15} = 0,25$

Os valores na tabela representam a média ± EPM, ANOVA de uma via (n = 4-6/grupo; $P > 0,05$). WB, WB4101.

4.3. Efeitos da administração de RX821002 no NLET de ratos submetidos ao teste do nado forçado e ao teste do campo aberto

Injeções de RX821002 (5, 10 e 15 nmol/0,1 µL/lado) no NLET não foram capazes de reduzir o tempo de imobilidade no teste do nado forçado ($F_{3,25} = 2,2$, $P > 0,05$; Figura 3) e também não alteraram a atividade locomotora no teste do campo aberto ($F_{3,17} = 0,47$, $P > 0,05$; Tabela 2).

Figura 3 – Efeitos da injeção bilateral de salina (Sal; 0,1 µL/lado) ou RX821002 (5, 10 e 15 nmol/0,1 µL/lado) no NLET de animais submetidos ao teste do do nado forçado (n = 7-10). As colunas representam a média e as barras o EPM. $P > 0,05$ comparado ao grupo tratado com salina (ANOVA de uma via).

Tabela 2 – Distância total percorrida no teste do campo aberto por animais que receberam salina ou RX821002.

Grupo	Distância percorrida (m)
Veículo	21,58 ± 1,1
RX 5 nmol/0,1 µL/lado	22,3 ± 3,0
RX 10 nmol/0,1 µL/lado	21,4 ± 1,9
RX 15 nmol/0,1 µL/lado	19,3 ± 1,6
	$F_{3,17} = 0,47$

Os valores na tabela representam a média ± EPM, ANOVA de uma via (n = 5-6/grupo; $P > 0,05$). RX, RX821002.

4.4. Efeitos da administração de CGP20712 no NLET de ratos submetidos ao teste do nado forçado e ao teste do campo aberto

Injeções de CGP20712 (5 e 10 nmol/0,1 µL/lado) no NLET reduziram o tempo de imobilidade no teste do nado forçado, quando comparado aos animais tratados com veículo ($F_{4,35} = 3,40$, $P < 0,05$, pós-teste de Newman-Keuls, $P < 0,05$; Figura 4), sem afetar a atividade locomotora no teste do campo aberto ($F_{3,16} = 0,35$, $P > 0,05$; Tabela 3). Além disso, doses ativas de CGP20712 foram incapazes de reduzir o tempo de imobilidade quando injetado em estruturas ao redor do NLET de animais submetidos ao teste do nado forçado (grupo *Out*, pós-teste de Newman-Keuls, $P > 0,05$, Figura 4).

Figura 4 – Efeitos da injeção bilateral de salina (Sal; 0,1 μ L/lado) ou CGP20712 (5, 10 e 15 nmol/0,1 μ L/lado) no NLET de animais submetidos ao teste do nado forçado ($n = 8-10$). Animais que receberam doses ativas de CGP20712 fora do NLET foram reunidos em um grupo adicional (Out, $n = 4$). As colunas representam a média e as barras o EPM. * $P < 0,05$ comparado ao grupo tratado com salina (ANOVA de uma via seguido de pós-teste de Newman-Keuls).

Tabela 3 – Distância total percorrida no teste do campo aberto por animais que receberam salina ou CGP20712.

Grupo	Distância percorrida (m)
Veículo	$15,8 \pm 0,9$
CGP 5 nmol/0,1 μ L/lado	$16,9 \pm 1,3$
CGP 10 nmol/0,1 μ L/lado	$15,1 \pm 3,6$
CGP 15 nmol/0,1 μ L/lado	$13,3 \pm 2,9$
	$F_{3,16} = 0,35$

Os valores na tabela representam a média $\pm$ EPM, ANOVA de uma via ($n = 4-6$ /grupo; $P > 0,05$). CGP, CGP20712.

4.5. Efeitos da administração de ICI118,551 no NLET de ratos submetidos ao teste do nado forçado e ao teste do campo aberto

Injeções de ICI118,551 (5 nmol/0,1 μ L/lado) no NLET reduziram o tempo de imobilidade no teste do nado forçado quando comparado aos animais tratados com veículo ($F_{4,28} = 4,77$, $P < 0,05$, pós-teste de Newman-Keuls, $P < 0,05$; Figura 5), sem afetar a atividade locomotora no teste do campo aberto ($F_{3,16} = 0,47$, $P > 0,05$; Tabela 4). Além disso, o ICI118,551 foi incapaz de reduzir o tempo de imobilidade quando injetado em estruturas ao redor do NLET de animais submetidos ao teste do nado forçado (grupo *Out*, pós-teste de Newman-Keuls, $P > 0,05$ Figura 5).

Figura 5 – Efeitos da injeção bilateral de salina (Sal; 0,1 μ L/lado) ou ICI118,551 (5, 10 e 15 nmol/0,1 μ L/lado) no NLET de animais submetidos ao modelo do nado forçado ($n = 5-9$). Animais que receberam doses ativas de ICI118,551 fora do NLET foram reunidos em um grupo adicional (*Out*, $n = 4$). As colunas representam a média e as barras o EPM. * $P < 0.05$ comparado ao grupo tratado com salina (ANOVA de uma via seguido de pós-teste de Newman-Keuls).

Tabela 4 – Distância total percorrida no teste do campo aberto por animais que receberam salina ou ICI118,551.

Grupo	Distância percorrida (m)
Veículo	17,06 ± 1,8
ICI 5 nmol/0,1 µL/lado	15,0 ± 3,0
ICI 10 nmol/0,1 µL/lado	13,8 ± 1,2
ICI 15 nmol/0,1 µL/lado	14,7 ± 1,7
	$F_{3,16} = 0,47$

Os valores na tabela representam a média ± EPM, ANOVA de uma-via (n = 5/grupo, $P > 0,05$). ICI, ICI118,551.

4.6. Efeitos da administração de CGP20712 e de ICI118,551, em doses baseadas nas suas respectivas constantes de inibição (K_i 's) para os receptores β_1 e β_2 , no NLET de ratos submetidos ao teste do nado forçado

Injeções de CGP20712 (0,015 nmol/0,1 µL/lado) e de ICI118,551 (0,004 nmol/0,1 µL/lado) no NLET não foram capazes de reduzir o tempo de imobilidade no teste do nado forçado ($F_{2,22} = 0,75$, $P > 0,05$; Figura 6).

Figura 6 – Efeitos da injeção bilateral de salina (Sal; 0,1 µL/lado), ou CGP20712 (0,015 nmol/0,1 µL/lado), ou ICI118,551 (0,004 nmol/0,1 µL/lado) no NLET de animais submetidos à sessão teste do modelo do nado forçado (n = 6-10). As colunas representam a média e as barras o EPM. $P > 0,05$ comparado ao grupo tratado com salina (ANOVA de uma via).

Discussão

5. DISCUSSÃO

O teste do nado forçado é uma modelo animal amplamente utilizado no estudo da neurobiologia da depressão e na avaliação de substâncias com propriedades antidepressivas (CRYAN et al., 2002). Este modelo é baseado na observação de que ratos colocados dentro de um cilindro cheio de água desenvolvem um comportamento de escape por alguns minutos e, logo em seguida, se tornam imóveis. Tal postura de imobilidade é reduzida quando os animais são tratados especificamente com antidepressivos (PORSOLT et al., 1977, 1978), indicando que tal modelo possui boa preditibilidade farmacológica.

Em nosso estudo, os resultados mostraram que o WB4101 (10 e 15 nmol/0,1 µL/lado), um antagonista seletivo de receptores noradrenérgicos α_1 , o CGP20712 (5 e 10 nmol/0,1 µL/lado), um antagonista seletivo de receptores noradrenérgicos β_1 , e o ICI118,551 (5 nmol/0,1 µL/lado), um antagonista seletivo de receptores noradrenérgicos β_2 , quando injetados no NLET, antes do teste, reduziram o tempo de imobilidade no modelo do nado forçado. O efeito induzido por essas drogas parece não estar relacionado a uma alteração motora inespecífica, uma vez que injeções dessas drogas no NLET não alteraram a atividade locomotora no teste do campo aberto. Adicionalmente, nenhum efeito foi observado com o RX821002, um antagonista seletivo de receptores noradrenérgicos α_2 , nos testes do nado forçado e do campo aberto. Portanto, esses resultados sugerem um efeito tipo-antidepressivo induzido pelo bloqueio da transmissão noradrenérgica no NLET, através do antagonismo de

receptores noradrenérgicos dos tipos α_1 , β_1 e β_2 , durante as sessões teste em ratos submetidos ao nado forçado.

É interessante notar que, embora as doses de 5 e 10 nmo/l0,1 μ L/lado de CGP20712 tenham sido capazes de induzir efeito tipo-antidepressivo, nenhum efeito foi observado com a dose de 15 nmo/l0,1 μ L/lado. Da mesma forma, as doses de 10 e 15 nmol/0,1 μ L/lado do ICI118,551 não apresentaram efeito, enquanto a dose de 5 nmol/0,1 μ L/lado foi capaz de reduzir o tempo de imobilidade de animais submetidos ao teste do nado forçado. Tais resultados podem ser explicados por uma suposta perda de seletividade dessas drogas, passando a agir em outros receptores.

Uma vez que tanto o antagonista de receptores noradrenérgicos β_1 , CGP20712, quanto o antagonista receptores noradrenérgicos β_2 , ICI118,551, foram capazes de induzir efeito tipo-antidepressivo na dose de 5 nmol/0,1 μ L/lado em nosso estudo, fizemos um experimento adicional para investigar se haveria participação de apenas um dos receptores (β_1 ou β_2), que poderia estar sendo mascarada por uma possível perda de seletividade das drogas nas doses utilizadas. Assim, utilizamos doses equipotentes dos antagonistas seletivos (0,004 nmol/0,1 μ L/lado de CGP20712 e 0,0153 nmol/0,1 μ L/lado de ICI118,551) baseadas nas razões dos valores da constante de inibição (K_i) de cada droga para os receptores noradrenérgicos β_1 e β_2 (Miralles et al., 1993; Bylund et al., 1994). A nova dose do CGP20712 foi calculada a partir da razão entre o valor de K_i do CGP20712 e o valor de K_i do ICI118,551 para os receptores noradrenérgicos β_1 (0,6 nM e 710 nM, respectivamente) (IUPHAR, 2012). Já a nova dose de ICI118,551 foi calculada a partir da razão entre o

valor de K_i do ICI118,551 e o valor de K_i do CGP20712 para os receptores noradrenérgicos β_2 (4,6 nM e 1500 nM, respectivamente) (IUPHAR, 2012).

Como as doses de CGP20712 e de ICI118,551 baseadas nos valores de K_i de cada droga para os receptores noradrenérgicos β_1 e β_2 não causaram efeito tipo-antidepressivo em nosso estudo, acreditamos que os efeitos obtidos com a administração de CGP20712 e de ICI118,551 na dose de 5 nmol/0,1 μ L/lado estariam ocorrendo devido ao bloqueio seletivo de receptores β_1 e β_2 , respectivamente. Assim, com os dados do nosso trabalho, o que se pode sugerir é que o bloqueio farmacológico de receptores noradrenérgicos β_1 , bem como o bloqueio de receptores noradrenérgicos β_2 no NLET, induz efeito tipo-antidepressivo no teste do nado forçado.

O NLET é uma importante estrutura que integra e facilita respostas comportamentais, endócrinas, autonômicas, cognitivas e emocionais ao estresse (CASADA; DAFNY, 1991; FORRAY; GYSLING, 2004; HERMAN et al., 2005; CHOI et al., 2007; RESSTEL et al., 2008; DUMONT, 2009). Quando a função desta estrutura é bloqueada, principalmente através de lesões químicas, as respostas ao estresse ficam reduzidas (CECCHI et al., 2002; GREENWOOD et al., 2005; RESSTEL et al., 2008; CRESTANI et al., 2009).

Nosso grupo de pesquisa, por exemplo, observou que a inativação reversível do NLET com a administração local de cloreto de cobalto (CoCl_2), um bloqueador sináptico não seletivo, reduziu o tempo de imobilidade de ratos submetidos ao teste do nado forçado (CRESTANI et al., 2010). De maneira semelhante, a lesão neuroquímica do NLET promoveu redução no desenvolvimento de déficits comportamentais que caracterizam o “desamparo

aprendido”, um efeito tipo-antidepressivo (HAMMACK et al., 2004). Dessa forma, sugere-se que a ativação do NLET durante situações de estresse facilita o desenvolvimento de suas consequências comportamentais, prejudicando a adaptação numa situação estressante subsequente. Nesse contexto, nossos dados sugerem que a noradrenalina presente no NLET desempenha um papel importante na mediação das respostas comportamentais ao estresse.

Sabe-se que a noradrenalina é um dos neurotransmissores mais abundantes no NLET (PHELIX et al., 1992), onde é liberada em resposta à exposição ao estresse, sendo importante para regular alterações autonômicas, comportamentais e endócrinas induzidas pela situação aversiva (CECCHI et al., 2002; CRESTANI et al., 2009). Hott et al. (2012), por exemplo, observaram que a administração dos antagonistas WB4101 e CGP20712 (antagonistas α_1 e β_1 , respectivamente) reduziu o “freezing” e as respostas autonômicas induzidas pelo contexto aversivo, em animais que receberam choques nas patas, sugerindo que a neurotransmissão noradrenérgica no NLET, via receptores α_1 e β_1 , está envolvida na mediação das consequências ao estímulo aversivo de choque nas patas. Isso foi sustentado pela observação de que a administração de inibidor da recaptação de noradrenalina no NLET promoveu aumento da resposta emocional e autonômica condicionada ao estímulo aversivo (HOTT et al., 2012; comunicação pessoal).

Esses dados corroboram evidências de que estímulos aversivos, como a exposição ao estresse ou a administração de FG7142, uma droga ansiogênica, promove aumento dos níveis de noradrenalina em estruturas importantes para a resposta emocional ao estresse (DAZZI et al., 2002).

Estudos revelam que o NLET recebe informações relacionadas ao aprendizado e à memória e as integra ao circuito de motivação e recompensa (JALABERT et al., 2009). Park et al. (2011) observaram que a administração oral de quinina, um estímulo gustativo aversivo, causa aumento na transmissão noradrenérgica e uma diminuição na transmissão dopaminérgica no NLET; enquanto a administração oral de sacarose, um estímulo agradável, causa uma redução na transmissão noradrenérgica e um aumento na transmissão dopaminérgica. Assim, o aumento da neurotransmissão noradrenérgica no NLET facilita a resposta ao sabor desagradável da quinina, um estímulo aversivo. Esses dados indicam a importância do NLET na percepção e na modulação de comportamentos de motivação e de recompensa, através da integração das várias neurotransmissões existentes na estrutura e indicam, ainda, a participação da noradrenalina na mediação das consequências a estímulos aversivos.

Ainda corroborando nossos resultados, dados da literatura mostram a relação entre o estresse, a noradrenalina e a ativação de receptores noradrenérgicos α_1 , β_1 , e β_2 . Ferry e colaboradores (1999), por exemplo, observaram, através da técnica de microdiálise *in vivo*, um aumento nos níveis basais de noradrenalina na amígdala de ratos que receberam choque nas patas (FERRY et al., 1999).

Evidenciando a relação dos adrenoreceptores α_1 na mediação das respostas ao estresse, alguns trabalhos mostram que a ativação de receptores noradrenérgicos α_1 ocorre em consequência à exposição ao estresse. (YANG; GORMAN; DUNN, 1990; BERRIDGE; WATERHOUSE, 2003). Yang, Gorman

e Dunn (1990) observaram que a administração central de prazosin, um antagonista de receptores noradrenérgicos α_1 , diminuiu o caráter aversivo da novidade em ratos expostos a um novo ambiente, enquanto a administração de fenilefrina, um agonista de receptores noradrenérgicos α_1 , reverteu esse efeito. Sendo assim, os pesquisadores sugeriram que a exposição ao novo ambiente, um estímulo estressante, facilitava a transmissão noradrenérgica central por meio da ativação de receptores noradrenérgicos α_1 . Vale lembrar que o NLET e o núcleo central da amígdala são as principais regiões cerebrais onde se localizam receptores noradrenérgicos α_1 mediadores de respostas a estímulos aversivos (STONE et al., 2007).

Com relação aos receptores noradrenérgicos β_1 , dados da literatura mostram que o tratamento do NLET com betaxolol, um antagonista de receptores noradrenérgicos β_1 , atenua a aversão condicionada pelo lugar induzida pela retirada de morfina (ASTON-JONES et al., 1999; DELFS et al., 2000; CECCHI et al., 2007), indicando prejuízos no processo cognitivo. No caso do nosso estudo, o bloqueio dos receptores β_1 poderia estar causando um efeito antiaversivo que facilitaria a adaptação perante a situação estressante.

Por fim, com relação aos receptores noradrenérgicos β_2 , há também evidências de participação no desenvolvimento das consequências comportamentais do estresse. Observou-se que o estresse de restrição agudo induz ativação de receptores noradrenérgicos β_2 (YU et al., 2010) e consequentes prejuízos no processo cognitivo. Existem ainda dados da literatura mostrando que a microinjeção do antagonista β_2 , ICI118,551, no NLET, foi capaz de reduzir aversão induzida por dor (DEYAMA et al., 2008),

sugerindo a participação de tais receptores no componente afetivo negativo da dor.

Deve-se também ressaltar que o efeito tipo-antidepressivo decorrente do bloqueio da transmissão noradrenérgica, através do bloqueio dos receptores noradrenérgicos dos tipos α_1 , β_1 e β_2 , pode ser consequência do controle da ativação exacerbada do eixo hipotálamo-hipófise-adrenal (HPA), que muitas vezes ocorre durante a exposição ao estresse.

Diversos trabalhos mostram que a exposição ao estresse aumenta a liberação de noradrenalina e a ativação do eixo HPA. Algumas pesquisas mostram, através de microdiálise e dosagem sanguínea, que a exposição de ratos ao estresse de restrição aumenta a liberação de noradrenalina no NLET e em outras estruturas do tronco cerebral envolvidas na mediação das consequências do estresse e também aumenta a secreção de hormônio adrenocorticotrópico (ACTH), um indicador da ativação do eixo HPA, na corrente sanguínea (MORILAK et al., 2005; CHOI et al., 2007).

Sabe-se também que o NLET, através de seus diferentes subnúcleos anatômicos e dependendo do tipo de estresse apresentado, agudo ou crônico, exerce um papel fundamental sobre a atividade do eixo HPA, inibindo ou estimulando-a como um resultado final (CHOI et al., 2007, 2008). Essa regulação da atividade do eixo HPA é essencial para manter a homeostase em resposta ao estresse.

Pode-se sugerir, então, que durante a exposição ao estresse de nado forçado, ocorre um aumento na liberação de noradrenalina no NLET e um

aumento na ativação do eixo HPA. O eixo HPA torna-se hiperresponsivo, aumentando a liberação de CRF pelo PNV, levando ao aumento da secreção de ACTH pela hipófise anterior. O ACTH, em excesso, estimula a produção aumentada de glicocorticoides pelas glândulas adrenais (HERMAN et al., 2005), o que promove aumento da imobilidade no nado forçado em ratos, de maneira dose-dependente (JOHNSON et al., 2006). Comparativamente, é muito comum o excesso de glicocorticoides durante a doença depressiva em humanos (NESTLER et al., 2002; MCEWEN; WINGFIELD, 2003; PARIANTE; LIGHTMAN, 2008).

É possível, então, que a inativação da transmissão noradrenérgica no NLET, através do bloqueio dos receptores noradrenérgicos α_1 , β_1 e β_2 , atenua a ativação exacerbada do eixo HPA em resposta ao estresse, reduzindo os níveis de glicocorticoides a que o organismo está exposto e, consequentemente, o tempo de imobilidade no teste do nado forçado, resultando em um efeito tipo-antidepressivo.

A neurotransmissão noradrenérgica no NLET seria capaz de modular a atividade dessa estrutura durante o estresse por meio da regulação de diferentes sistemas de neurotransmissão. Dados da literatura sugerem que a neurotransmissão noradrenérgica do NLET inibe a liberação de glutamato através ativação de receptores noradrenérgicos α_1 e α_2 (FORRAY et al., 1997; EGLI et al., 2005; MCELLIGOTT et al., 2008). Em contrapartida, recentemente, foi observado que a ativação de receptores noradrenérgicos β_1 aumenta a liberação de glutamato no NLET, de maneira dependente de CRF e do receptor 1 do fator de liberação de corticotropina (CRF₁) (NOBIS et al., 2011), sugerindo

efeitos opostos sobre o NLET, causados pelos receptores noradrenérgicos anteriormente citados. McElligott et al. (2010) também observaram que a ativação de receptores noradrenérgicos α_1 causa um aumento espontâneo na frequência das correntes excitatórias pós-sinápticas, possivelmente via liberação de CRF, que passa agir em receptores CRF₁. Nesse contexto, os terminais nervosos noradrenérgicos fazem contato sináptico com dendritos de neurônios que contêm CRF no NLET e podem afetar a contribuição de tais neurônios na resposta ao estresse (PHELIX et al., 1994).

Dados da literatura sugerem o envolvimento do NLET nas respostas ao estresse mediadas por CRF (NIJSEN et al., 2001; SAHUQUE *et al.*, 2006). Sahuque et al. (2006), por exemplo, observaram que a administração de CRF no NLET de ratos submetidos ao labirinto em cruz elevado reduz de maneira dose-dependente o número de entradas e o tempo de permanência dos animais no braço do aberto do labirinto, causando um efeito tipo-ansiolítico e sugerindo o envolvimento do CRF no NLET na mediação das respostas ao estresse. O efeito observado foi inibido pela administração concomitante de antagonista dos receptores CRF₁ no NLET, indicando a participação de tais receptores nas respostas ao estresse mediadas por CRF no NLET. Adicionalmente, estudos clínicos mostram que a administração oral de antagonistas dos receptores CRF₁ que atravessam a barreira hematoencefálica melhora os sintomas de depressão com um perfil clínico semelhante ao da paroxetina, um antidepressivo inibidor da recaptação de serotonina (ZOBEL et al., 2000; KÜNZEL et al., 2003; HELD et al., 2004). Esses antagonistas também são capazes de reduzir a secreção de cortisol estimulada pela

exposição ao estresse psicossocial de falar em público (INSING et al., 2007), substância com níveis plasmáticos frequentemente aumentados em pacientes deprimidos. Esses dados sugerem o envolvimento do CRF e dos receptores CRF_1 na neurobiologia da depressão.

Há também evidências de que a noradrenalina modula a neurotransmissão GABAérgica no NLET através dos receptores noradrenérgicos α_1 e β (DUMONT; WILLIAMS, 2004). Portanto, pode-se sugerir uma interação entre a neurotransmissão noradrenérgica no NLET e outros neurotransmissores na mediação das consequências comportamentais ao estresse de nado forçado. Entretanto, essas possibilidades devem ser testadas e avaliadas.

Diante do exposto, considerando que níveis aumentados de noradrenalina no NLET estariam relacionados às consequências do estresse de nado forçado, não é de se surpreender que o bloqueio da neurotransmissão noradrenérgica através do antagonismo dos receptores α_2 , em nosso estudo, não tenha causado efeito tipo antidepressivo. De fato, alguns estudos mostram que a ativação (e não o bloqueio) de receptores α_2 está relacionada com o efeito de antidepressivos tricíclicos em roedores submetidos ao teste do nado forçado (CERVO et al., 1990; RENERIC et al., 2001; ZHANG et al., 2009). Além disso, há evidências de que a administração de clonidina, um agonista α_2 , seria capaz de promover efeito tipo-antidepressivo por diminuir a liberação de noradrenalina em estruturas límbicas, uma vez que esses receptores são responsáveis por controlar negativamente a liberação de noradrenalina (COTTINGHAM; WANG, 2012). Portanto, nossos dados corroboram tais

evidências e sugerem que a ativação e não o bloqueio de α_2 no NLET deveria promover efeito tipo-antidepressivo.

Assim, a neurotransmissão noradrenérgica existente no NLET, através da ativação dos receptores noradrenérgicos α_1 , β_1 e β_2 , parece contribuir para o desenvolvimento das consequências comportamentais do estresse relacionadas à neurobiologia da depressão no teste do nado forçado.

Diante desse contexto, deveríamos esperar que o efeito terapêutico de drogas antidepressivas noradrenérgicas (inibidores da recaptação do neurotransmissor ou da MAO), que aparece após o tratamento crônico, poderia estar associado a alterações plásticas no NLET capazes de atenuar a eficiência da neurotransmissão noradrenérgica local. Dando sustentação a essa hipótese, há dados evidenciando que o tratamento crônico com drogas antidepressivas promove diminuição da frequência de disparo de neurônios noradrenérgicos do *locus coeruleus* (MONGEAU et al., 1997); diminuição da liberação de noradrenalina induzida por estresse no córtex pré-frontal (DAZZI et al., 2002); e diminuição da expressão de receptores β -adrenérgicos nessa mesma estrutura (MONGEAU et al., 1997). No entanto, o efeito do tratamento crônico com drogas antidepressivas sobre a neurotransmissão noradrenérgica presente no NLET permanece não investigado.

Além disso, devido à diversidade de mecanismos neurobiológicos envolvidos nos diferentes procedimentos experimentais existentes para estudar a depressão, novos estudos utilizando outros modelos animais sensíveis a drogas antidepressivas, com maior validade de face que o modelo do nado forçado, devem ser realizados para avaliar, com maior clareza, a participação da neurotransmissão noradrenérgica presente no NLET neste processo.

Conclusão

6. CONCLUSÃO

Os resultados apresentados no presente trabalho permitem concluir que:

- . o bloqueio da neurotransmissão noradrenérgica no NLET induz efeito tipo-antidepressivo no modelo animal do nado forçado;
- . o efeito tipo-antidepressivo induzido pelo bloqueio da neurotransmissão noradrenérgica no NLET se dá através do bloqueio dos receptores α_1 , β_1 e β_2 .

Referências Bibliográficas

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABEL E.L., BILITZKE P.J. A possible alarm substance in the forced swimming test. **Physiology and Behavior**, v. 48, n. 2, p. 233-239, 1990.

AHLQUIST R.P. A study of the adrenotropic receptors. **The American Journal of Physiology**, v. 153, n. 3, p. 586-600, 1948.

ALHEID G., J. S. DE OLMOS. Amygdala and extended amygdala In: The Rat Nervous System. G. Paxinos, Ed. New York. **Academic Press**, p. 495-578, 1995.

ALHEID G. F. Extended amygdala and basal forebrain. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 985, p. 185-205, 2003.

ASTON-JONES G., DELFS, J.M., DRUHAN J., ZHU, Y. The bed nucleus of the stria terminalis: a target site for noradrenergic actions in opiate withdrawal. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 877, p. 486-98, 1999.

ASTON-JONES G., RAJKOWSKI J., COHEN J. Role of locus coeruleus in attention and behavioral flexibility. **Biological Psychiatry**, v. 46, n. 9, p. 1309-1320, 1999.

AUSTIN M.P., MITCHELL P., GOODWIN G.M. Cognitive deficits in depression. **The British Journal of Psychiatry: The Journal Mental Science**, v. 178, p. 200-206, 2001.

BACQ Z. M. La pharmacologie du système nerveux autonome, et particulièrement du sympathique, d'après la théorie neurohumorale. **Annales de Physiologie et de Physicochimie Biologique**, v. 10, p. 467-528, 1934.

BALDESSARINI R.J., BRUNTON L.L., LAZO J.S., PARKER K.L. Drug therapy of depression and anxiety disorders. In: The Pharmacological Basis of Therapeutics, 11th ed. New York. **McGraw Hill**, p. 429-459, 2006.

BARGER G., DALE, H. H. Chemical structure and sympathomimetic action of amines. **Journal of Physiology**, v. 41, p. 19-59, 1910.

BAUMGARTEN H.G., GRAF K-J., KURTEN I. The dexamethasone suppression test in depression, in schizophrenia, and during experimental stress. **Biological Psychiatry**, v. 20, p. 675-679, 1985.

BECKMANN H. Noradrenaline metabolism in the CNS. **Fortschritte der Medizin**, v. 96, n. 5, p. 219-220, 1978.

BEIJAMINI V., GUIMARAES F.S. c-Fos expression increase in NADPH-diaphorase positive neurons after exposure to a live cat. **Behavioural Brain Research**, v. 170, n. 1, p. 52-61, 2006.

BERRIDGE C.W., WATERHOUSE B.D. The locus coeruleus-noradrenergic system: modulation of behavioral state and state-dependent cognitive processes. **Brain Research Reviews**, v. 42, p. 33-84, 2003.

BOGDANSK D.F. Norepinephrine uptake dependent upon apparent Mg^{++} -ATPase activity and proton transport in storage vesicles in axoplasm. **Synapse**, v. 2, n. 4, p. 424-31, 1988.

BROWNSTEIN M., SAAVEDRA J.M., PALKOVITS M. Norepinephrine and dopamine in the limbic system of the rat. **Brain Research**, v. 79, p. 431-436, 1974.

BURT D.B., ZEMBAR M.J., NIEDEREHE G. Depression and memory impairment: a meta-analysis of the association, its pattern, and specificity. **Psychological Bulletin**, v. 117, p. 285-305, 1995.

BYLUND D.B., EIKENBERG D.C., HIEBLE J.P., LANGER S.Z., LEFKOWITZ R.J., MINNEMAN K.P. International Union of Pharmacology nomenclature of adrenoceptors. **Pharmacological Reviews**, v. 46(2), p. 121-136, 1994.

BYRUM C.E., GUYENET P.G. Afferent and efferent connections of the A5 noradrenergic cell group in the rat. **The Journal of Comparative Neurology**, v. 261, n. 4, p. 529-42, 1987.

CAMPOS-MELO D., QUIROZ G., NOCHES V., GYSLING K., FORRAY M.I., ANDRÉS M. E. Repeated immobilization stress increases *nur77* expression in the bed nucleus of the stria terminalis. **Neurotoxicity Research**, v. 20, n. 3, p. 89-300, 2011.

CANNON W. B., URIDIL, J. E. Studies on conditions of activity in endocrine glands. VIII. Some effects on the denervated heart of stimulating the nerves of the liver. **American Journal of Physiology**, v. 58, p. 353-354, 1921.

CASADA J.H., DAFNY N. Restraint and stimulation of bed nucleus of the stria terminalis produce similar stress-like behaviors. **Brain Research Bulletin**, v. 27, n.2, p. 207-212, 1991.

CASPI A, SUGDEN K, MOFFITT TE, TAYLOR A, CRAIG IW, HARRINGTON H, MCCLAY J, MILL J, MARTIN J, BRAITHWAITE A, POULTON R. Influence of life stress on depression: moderation by a polymorphism in the 5-HTT gene. **Science**, v. 301, p. 386-389, 2003.

CASTREN E. Is mood chemistry? **Nature Reviews Neuroscience**, v. 6, p. 241-246, 2005.

CECCHI M., CAPRILES N., WATSON S.J., AKIL H. Beta1 adrenergic receptors in the bed nucleus of stria terminalis mediate differential responses to opiate withdrawal. **Neuropsychopharmacology**, v. 32, n. 3, p. 589-599, 2007.

CECCHI M., KHOSHBOUEI H., JAVORS M., MORILAK D.A. Modulatory effects of norepinephrine in the lateral bed nucleus of the stria terminalis on behavioral

and neuroendocrine responses to acute stress. **Neuroscience**, v. 112, n. 1, p. 13-21, 2002.

CERVO, L., GRIGNASCHI, G., SAMANIN, R. Alpha 2-adrenoceptor blockade pre- 855 vents the effect of desipramine in the forced swimming test. **European Journal of Pharmacology**, v. 175, p. 301–307, 1990.

CHARNEY D.S. Neuroanatomical circuits modulating fear and anxiety behaviors. **Acta Psychiatrica Scandinavica**, v. 108, suppl. 417, p. 38–50, 2003.

CHOI D.C., FURAY A.R., EVANSON N.K., OSTRANDER M.M., ULRICH-LAI Y.M., HERMAN J.P. Bed nucleus of the stria terminalis subregions differentially regulate hypothalamic-pituitary-adrenal axis activity: implications for the integration of limbic inputs. **Journal of Neuroscience**, v. 27, n. 8, p. 2025-2034, 2007.

CHOI D.C., FURAY A.R., EVANSON N.K., ULRICH-LAI Y.M., NGUYEN M.M., OSTRANDER M.M., HERMAN J.P. The role of the posterior medial bed nucleus of the stria terminalis in modulating hypothalamic-pituitary-adrenocortical axis responsiveness to acute and chronic stress. **Psychoneuroendocrinology**, v. 33, n. 5, p. 659-669, 2008.

COTTINGHAM C., WANG Q. α_2 -adrenergic receptor dysregulation in depressive disorders: Implications for the neurobiology of depression and antidepressant therapy. **Neuroscience and Biobehavioral Reviews**, article in press, 2012.

CRANE, J.W., BULLER, K.M., DAY, T.A. Evidence that the bed nucleus of the stria terminalis contributes to the modulation of hypophysiotropic corticotropin-releasing factor cell responses to systemic interleukin-1beta. **The Journal of Comparative Neurology**, v. 467, p. 232– 242, 2003a.

CRANE, J.W., EBNER, K., DAY, T.A. Medial prefrontal cortex suppression of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis response to a physical stressor, systemic delivery of interleukin-1beta. **The European Journal of Neuroscience**, v. 17, p. 1473– 1481, 2003b.

CRESTANI C.C., ALVES F.H., RESSTEL L.B., CORREA F.M. Cardiovascular effects of noradrenaline microinjection in the bed nucleus of the stria terminalis of the rat brain. **Journal of Neuroscience Research**, v. 85, n. 7, p. 1592-1599, 2007.

CRESTANI C.C., ALVES F.H., RESSTEL L.B., CORREA F.M. Both alpha1 and alpha2-adrenoceptors mediate the cardiovascular responses to noradrenaline microinjected into the bed nucleus of the stria terminal of rats. **British Journal of Pharmacology**, v. 153, n. 3, p. 583-590, 2008.

CRESTANI, C.C. Envolvimento da neurotransmissão noradrenérgica do núcleo leito da estria terminal na modulação do sistema cardiovascular em ratos. Ribeirão Preto. Tese (Doutorado) – Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Departamento de Farmacologia, Universidade de São Paulo. 126p. 2009a.

CRESTANI C.C., ALVES F.H., TAVARES R.F., CORREA F.M. Role of the bed nucleus of the stria terminalis in the cardiovascular responses to acute restraint stress in rats. **Stress** v. 12, n. 3, p. 268-278, 2009b.

CRESTANI C.C., ALVES, F.H., CORREA, F.M, GUIMARÃES F.S., JOCA S.R. Acute reversible inactivation of the bed nucleus of stria terminalis induces antidepressant-like effect in the rat forced swimming test. **Behavioural and Brain Functions**, v. 6, n. 30.

CRYAN J.F., MARKOU A., LUCKI I. Assessing antidepressant activity in rodents: recent developments and future needs. **Trends in Pharmacological Sciences**, v. 23, n. 5, p. 238-245, 2002.

CUNAME T.C., 1984. The mechanism of neurotransmitter release from sympathetic nerves. *Trends Neurosci* 7: 248-253.

DAHLSTRÖM A., FUXE K. Evidence for the existence of monoamine-containing neurons in the central nervous system. I. Demonstration of monoamine in the cell bodies of brain stem neurons. **Acta Physiologica Scandinavica**, v. 62, n. 232, p. 1–55, 1964.

DAZZI L., VIGNONE V., SEU E., LADU S., VACCA G., BIGGIO G. Inhibition by venlafaxine of the increase in norepinephrine output in rat prefrontal cortex elicited by acute stress or by the anxiogenic drug FG 7142. **Journal of Psychopharmacology**, v. 16, n. 2, p. 125-31, 2002.

DE KLOET E.R., 2000. Stress in the brain. **European Journal of Pharmacology**, v. 405, p. 187-198, 2000.

DELFS J.M., ZHU Y., DRUHAN J.P., ASTON-JONES G. Noradrenaline in the ventral forebrain is critical for opiate withdrawal-induced aversion. **Nature**, v. 403, n. 6768, p. 430-434, 2000.

DE OLMOS J., ALHEID G.F., BELTRAMINO C.A. Amygdala. In *The Rat Nervous System*, Vol. 1: Forebrain and Midbrain. G. Paxinos, Ed. New York. **Academic Press**, p. 223–334, 1985.

DEYAMA S., KATAYAMA T., OHNO A., NAKAGAWA T., KANENO S., YAMAGUCHI T., YOSHIOKA M., MINAMI M. Activation of the beta-adrenoceptor-protein kinase A signaling pathway within the ventral bed nucleus of the stria terminalis mediates the negative affective component of pain in rats. **Journal of Neuroscience**, v. 28, n.31, p. 7728-7736, 2008.

DONG H.W., PETROVICH G.D., WATTS A.G., SWANSON L.W. Basic organization of projections from the oval and fusiform nuclei of the bed nuclei of the stria terminalis in adult rat brain. **Journal of Comparative Neurology**, v. 436, n. 4, p. 430-455, 2001.

DONG H.W., PETROVICH G.D., SWANSON L.W. Topography of projections from amygdala to bed nuclei of the stria terminalis. **Brain Research Reviews**, v. 38, p. 192–246, 2001a.

DONG H.W., SWANSON L.W. Organization of axonal projections from the anterolateral area of the bed nucleus of the stria terminalis. **Journal of Comparative Neurology**, v. 468, p. 277–298, 2004.

DONG H.W., SWANSON L.W. Projections from bed nuclei of the stria terminalis, posterior division: implications for cerebral hemisphere regulation of defensive and reproductive behaviors. **Journal of Comparative Neurology**, v. 471, p. 396–433, 2004.

DONG H.W., SWANSON L.W. Projections from bed nuclei of the stria terminalis, dorsomedial nucleus: implications for cerebral hemisphere integration of neuroendocrine, autonomic, and drinking responses. **Journal of Comparative Neurology**, v. 494, p. 75–107, 2006.

DUMAN R.S., MONTEGGIA L.M. A neurotrophic model for stress-related mood disorders. **Biological Psychiatry**, v. 59, p. 1116–1127, 2006.

DUMONT E.C. What is the bed nucleus of the stria terminalis? **Progress in Neuropsychopharmacology and Biological Psychiatry**, v. 33, n. 8, p. 1289–1290, 2009.

DUNN, J.D. Plasma corticosterone responses to electrical stimulation of the bed nucleus of the stria terminalis. **Brain Research**, v. 407, p. 327–331, 1987.

EGLI R.E., KASH T.L., CHOO K., SAVCHENKO V., MATTHEWS R.T., BLAKELY R.D., WINDLER D.G. Norepinephrine modulates glutamatergic transmission in the bed nucleus of the stria terminalis. **Neuropsychopharmacology**, v. 30, n.4, p. 657–668, 2005.

FORRAY M.I., BUSTOS G., GYSLING K. Noradrenaline inhibits glutamate release in the rat bed nucleus of the stria terminalis: in vivo microdialysis studies. **Journal of Neuroscience Research**, v. 55, n. 3, p. 311–20, 1999.

FERRY B., ROOZENDAAL B., MCGAUGH J.L. Role of norepinephrine in mediating stress hormone regulation of long-term memory storage: a critical involvement of amygdale. **Biological Psychiatry**, v. 46, p. 1140–1152, 1999.

FORRAY M.I., BUSTOS G., GYSLING K. Regulation of norepinephrine release from the rat bed nucleus of the stria terminalis: in vivo microdialysis studies. **Journal of Neuroscience Research**, v. 50, n. 6, p. 1040–1046, 1997.

FORRAY M.I., GYSLING K. Role of noradrenergic projections to the bed nucleus of the stria terminalis in the regulation of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis. **Brain Research Reviews**, v. 47, n. 1–3, p. 145–160, 2004.

GLOWINSKI J., AXELROD J. Inhibition of uptake of tritiated-noradrenaline in the intact rat brain by imiprimanine and structurally related compounds. **Nature**, v. 204, n. 4965, p. 1318-19, 1964.

GOODMAN, GILMAN, 2006. **The Pharmacological Basis of Therapeutics, 11th ed.** McGraw Hill Ed. New York, 2006.

GRAEFF F.G., GUIMARAES F.S., DE ANDRADE T.G., DEAKIN J.F. Role of 5-HT in stress, anxiety, and depression. **Pharmacology, Biochemistry and Behavior**, v. 54, n. 1, p. 129-141, 1996.

GRAHAM D., LANGER S.Z. Advances in sodium-ion coupled biogenic amine transporters. **Life Sciences**, v. 51, p. 631-645, 1992.

GREENWOOD B.N., FOLEY T.E., BURHANS D., MAIER S.F., FLESHNER M. The consequences of uncontrollable stress are sensitive to duration of prior wheel running. **Brain Research**, v. 1033, n. 2, p. 164-178, 2005.

GREER C.M., PINKSTON J.O., BAXTER J.H., BRANNON E.S. Norepinephrine (3, 4-dihydroxyphenyl-hydroxyethylamine) as a possible mediator in the sympathetic division of the autonomic nervous system. **Journal of Pharmacology**, v. 62, p. 189-227, 1938.

HAMMACK S.E., RICHEY K.J., WATKINS L.R., MAIER S.F. Chemical lesion of the bed nucleus of the stria terminalis blocks the behavioral consequences of uncontrollable stress. **Behavioural Neuroscience**, v. 118, n. 2, p. 443-448, 2004.

HELD K., KÜNZEL H., ISING M., SCHMID D.A., ZOBEL A., MURCK H., HOLSBOER F., STEIGER A. Treatment with the CRH1-receptor-antagonist R121919 improves sleep-EEG in patients with depression. **Journal of Psychiatric Research**, v. 38, p. 129–136, 2004.

HERMAN, J.P., CULLINAN, W.E., WATSON, S.J. Involvement of the bed nucleus of the stria terminalis in tonic regulation of paraventricular hypothalamic CRH and AVP mRNA expression. **Journal of Neuroendocrinology**, v. 6, p. 433– 442, 1994.

HERMAN J.P., OSTRANDER M.M., MUELLER N.K., FIGUEIREDO H. Limbic system mechanisms of stress regulation: hypothalamo-pituitary-adrenocortical axis. **Progress in Neuropsychopharmacology and Biological Psychiatry**, v. 29, n. 8, p. 1201-1213, 2005.

HOLMANS P., WEISSMAN M.M., ZUBENKO G.S., SCHEFTNER W.A., CROWE R.R., DEPAULO J.R., KNOWLES J.A., ZUBENKO W.N., MURPHY-EBERENZ K., MARTA D.H., BOUTELLE S., MCINNIS M.G., ADAMS P., GLADIS M., STEELE J., MILLER E.B., POTASH J.B., MACKINNON D.F., LEVINSON D.F. Genetics of recurrent early-onset major depression (GenRED): final genome scan report. **The American Journal of Psychiatry**, v. 164, p. 248-258, 2007.

HOTT S.C., GOMES F.V., FABRI D.R., REIS D.G., CRESTANI C.C., CORREA F.M., RESSEL L.B. Both α_1 and β_1 -adrenoceptors in the bed nucleus of the stria terminalis are involved in the expression of conditioned contextual fear. **British Journal of Pharmacology**, v. 167, p. 207-221, 2012.

INSEL P.A. Adrenergic receptors – involving concepts and clinical implications. **The New England Journal of Medicine**, v. 334, p. 580-585, 1996.

ISING M., ZIMMERMANN U.S., KÜNZEL H.E., UHR M., FOSTER A.C., LEARNED-CAUGHLIN S.M., HOLSBOER F., GRIGORIADIS D.E. High-affinity CRF (1) receptor antagonist NBI-34041: preclinical and clinical data suggest safety and efficacy in attenuating elevated stress response. **Neuropsychopharmacology**, v. 32, p. 1941–1949, 2007.

JALABERT M., ASTON-JONES G., HERZOG E., MANZONI O., GEORGES F. Role of the bed nucleus of the stria terminalis in the control of ventral tegmental area dopamine neurons. **Progress in Neuropsychopharmacology and Biological Psychiatry**, v. 33, n. 8, p. 1336-1346, 2009.

JANKORD R., HERMAN J.P. Limbic regulation of hypothalamo-pituitary-adrenocortical function during acute and chronic stress. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 1148, p. 64-73, 2008.

JOHNSON S.A., FOURNIER N.M., KALYNCHUK L.E. Effect of different doses of corticosterone on depression-like behavior and HPA axis responses to a novel stressor. **Behavioural Brain Research**, v. 168, n. 2, p. 280-288, 2006.

KALSKA H., PUNAMAKI R.L., MAKINEN-PELLI T., SAARINEN M. Memory and metamemory functioning among depressed patients. **Applied Neuropsychology**, v. 6, p. 96-107, 1999.

KENDLER K.S., KARKOWSKI L.M., PRESCOTT C.A. Causal relationship between stressful life events and the onset of major depression. **The American Journal of Psychiatry**, v. 156, p. 837-841, 1999.

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

KHOSHBOUEI H., CECCHI M., MORILAK D.A. Modulatory effects of galanin in the lateral bed nucleus of the stria terminalis on behavioral and neuroendocrine responses to acute stress. **Neuropsychopharmacology**, v. 27, n. 1, p. 25-34, 2002.

KÜNZEL H.E., ZOBEL A.W., NICKEL T., ACKL N., UHR M., SONNTAG A., ISING M., HOLSBOER F. Treatment of depression with the CRH-1-receptor antagonist R121919: endocrine changes and side effects. **Journal of Psychiatric Research**, v. 37, p. 525–533, 2003.

LAPIN I.P., OXENKRUG G.F. Intensification of the central serotonergic processes as a possible determinant of the thymoleptic effect. **Lancet** v. 1, p. 132-136, 1969.

LISTON C., GAN W.B. Glucocorticoids are critical regulators of dendritic spine development and plasticity in vivo. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 108, n. 38, p. 16074-16079, 2011.

LOEWY A.D. Forebrain nuclei involved in autonomic control. **Progress in Brain Research**, v. 87, p. 253-268, 1991.

MA S., MORILAK D.A. Induction of FOS expression by acute immobilization stress is reduced in locus coeruleus and medial amygdala of Wistar-Kyoto rats compared to Sprague-Dawley rats. **Neuroscience** v. 124, n. 4, p. 963-972, 2004.

MARTIN L.J., POWERS R.E., DELLOVADE T.L., PRICE D.L. The bed nucleus-amygdala continuum in human and monkey. **Journal of Comparative Neurology**, v. 309, n. 4, p. 445-485, 1991.

MATSUI H., YAMAMOTO C. The possible involvement of adenylate cyclase inhibition in the field potential suppression through alpha-2 adrenergic receptors in the bed nucleus of the stria terminalis. **Brain Research**, v. 293, n. 1, p. 187-90, 1984.

MCELLIGOTT Z.A., WINDER D.G. Alpha1-adrenergic receptor-induced heterosynaptic long-term depression in the bed nucleus of the stria terminalis is disrupted in mouse models of affective disorders. **Neuropsychopharmacology**, v. 33, n. 10, p. 2313-2323, 2008.

MCELLIGOTT Z.A., LUG J.R., NOBIS W.P., PATEL S., GRUETER B.A., KASH T.L., WINDER D.G. Distinct forms of Gq-receptor-dependent plasticity of excitatory transmission in the BNST are differentially affected by stress. **Proceedings of National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 107, n. 5, p. 2271-6, 2010.

MCEWEN B.S. Effects of adverse experiences for brain structure and function. **Biological Psychiatry**, v. 48, p. 721-731, 2000.

MIRALLES A., OLMOS G., SASTRE M., BARTUREN F., MARTIN I., GARCIA-SEVILLA J.A. Discrimination and pharmacological characterization of I2-imidazoline sites with [3H]idazoxan and alpha-2 adrenoceptors with [3H]RX821002 (2-methoxy idazoxan) in the human and rat brains. **The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 264, n. 3, p. 1187-1197, 1993.

MOGA M.M., SAPER C.B., GRAY T.S. Bed nucleus of the striaterminalis: cytoarchitecture, immunohistochemistry, and projection to the parabrachial nucleus in the rat. **Journal of Comparative Neurology**, v. 293, p. 315-332, 1989.

MOORE R.Y. Catecholamin innervations of the basal forebrain. I. The septal area. **Journal of Comparative Neurology**, v. 177, n. 4, p. 665-684, 1978.

MONGEAU R., BLIER P., DE MONTIGNY C. The serotonergic and noradrenergic systems of the hippocampus: their interactions and the effects of antidepressant treatments. **Brain Research Reviews**, v. 23, p. 145-195, 1997.

MORILAK D.A., CECCHI M., KHOSHBOUEI H. Interactions of norepinephrine and galanin in the central amygdala and lateral bed nucleus of the stria terminalis modulate the behavioral response to acute stress. **Life Sciences**, v. 73, n. 6, p. 715-726, 2003.

MORILAK D.A., BARRERA G., ECHEVARRIA D.J., GARCIA A.S., HERNANDEZ A., MA S., PETRE C.O. Role of brain norepinephrine in the behavioral response to stress. **Progress in Neuropsychopharmacology and Biological Psychiatry**, v. 29, n. 8, p. 1214-1224, 2005.

MUIGG P., HOELZL U., PALFRADER K., NEUMANN I., WIGGER A., LANDGRAF R., SINGEWALD N. Altered brain activation pattern associated with drug-induced attenuation of enhanced depression-like behavior in rats bred for high anxiety. **Biological Psychiatry**, v. 61, n. 6, p. 782-796, 2007.

NESTLER E.J. Antidepressant treatments in the 21st century. **Biological Psychiatry**, v. 44, p. 526-533, 1988.

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

NICHOLAS A.P., HÖKFELT T., PIERIBONE V. A. The distribution and significance of CNS adrenoceptors examined with in situ hybridization. **Trends in Pharmacological Sciences**, v. 17, n. 7, p. 245-55, 1996.

NIJSEN M.J., CROSET G., DIAMANT M., DE WIED D., WIEGANT V.M. CRH signaling in the bed nucleus of stria terminalis is involved in stress-induced cardiac vagal activation in conscious rats. **Neuropsychopharmacology**, v. 24 n. 1, p. 1-10, 2011.

NOBIS W.P., KASH T.L., SILBERMAN Y., WINDER D.G. beta-Adrenergic receptors enhance excitatory transmission in the bed nucleus of the stria terminalis through a corticotrophin-releasing factor receptor-dependent and cocaine-regulated mechanism. **Biological Psychiatry**, v. 69, n. 11, p. 1083-1090, 2011.

PACAK, K., MCCARTY R., PALKOVITS M., KOPIN I. J., GOLDSTEIN D. S. Effects of immobilization on in vivo release of norepinephrine in the bed nucleus of the stria terminalis in conscious rats. **Brain Research**, v. 688, p. 242-246, 1995.

SAWADA S., YAMAMOTO C. Postsynaptic inhibitory actions of catecholamines and opioid peptides in the bed nucleus of stria terminalis. **Experimental Brain Research**, v. 41, n. 3-4, p. 264-70, 1981.

SUMMERS R.J., MCMARTIN L. R. Adrenoceptors and their second messenger systems. **Journal of Neurochemistry**, v. 60, p. 10-23, 1993.

PALIJ P., STAMFORD J.A. Real-time monitoring of noradrenaline release in rat brain slices using fast cyclic voltammetry: 1. Characterisation of evoked noradrenaline efflux and uptake from nerve terminalis in the bed nucleus of stria terminalis, pars ventralis. **Brain Research**, v. 587, n. 1, p. 137-46, 1992.

PALIJ P., STAMFORD J.A. Real-time monitoring of endogenous noradrenaline release in rat brain slices using fast cyclic voltammetry. 2. Operational pars ventralis. **Brain Research**, v. 607, p. 134-40, 1993.

PARIANTE C.M., LIGHTMAN S.L., 2008. The HPA axis in major depression: classical theories and new developments. **Trends in Neurosciences**, v. 31, n. 9, p. 464-468, 2008.

PARK J., WHEELER R.A., FONTILLAS K., KEITHLEY R.B., CARELLI R.M., WIGHTMAN R.M., 2011. Catecholamines in bed nucleus of stria terminalis reciprocally respond to reward and aversion. **Biological Psychiatry**, v. 71, n. 4, p. 327-334, 2011.

PAXINOS G., WATSON C. The rat brain in stereotaxic coordinates 3rd edition. Sidney. **Academic Press**, 1997.

PEETERS B.W., BROEKKAMP C.L. Involvement of corticosteroids in the processing of stressful-life events. A possible implication for the development of depression. **The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology**, n. 49, p. 417-427, 1994.

PEZUK P., AYDIN E., AKSOY A., CANBEYLI R. Effects of BNST lesions in female rats on forced swimming and navigational learning. **Brain Research**, v. 1228, p. 199-207, 2008.

PHLIX C.F., LIPOSITS Z., PAULL W.K. Monoamine innervation of bed nucleus of stria terminalis: an electron microscopic investigation. **Brain Research Bulletin**, v. 28, p. 949-965, 1992.

PHLIX C.F., LIPOSITS Z., PAULL W.K. Catecholamine-CRF synaptic interaction in a septal bed nucleus: afferent neurons in the bed nucleus of stria terminalis. **Brain Res Bulletin**, v. 33, n. 1, p. 109-19, 1994.

PORSOLT R.D., LE PICHON M., JALFRE M. Depression: a new animal model sensitive to antidepressant treatments. **Nature**, v. 266, n. 5604, p. 730-732, 1977.

PORSOLT R.D., ANTON G., BLAVET N., JALFRE M. Behavioural despair in rats: a new model sensitive to antidepressant treatments. **European Journal of Pharmacology**, v. 47, n. 4, p. 379-391, 1978.

POST R.M. Transduction of psychosocial stress into the neurobiology of recurrent affective disorder. **The American Journal of Psychiatry**, v. 149, p. 999-1010, 1992.

PRICE J.L., DREVETS W.C. Neurocircuitry of mood disorders **Neuropsychopharmacology**, v. 35, n. 1, p. 192-216, 2010.

RANGEL A., GONZALEZ L.E., VILLARROEL V., HERNANDEZ L. Anxiolysis followed by anxiogenesis relates to coping and corticosterone after medial prefrontal cortical damage in rats. **Brain Research**, v. 992, n. 1, p. 96-103, 2003.

RENERIC, J.P., BOUVARD, M., STINUS, L. Idazoxan and 8-OH-DPAT modify the 1171 behavioral effects induced by either NA, or 5-HT, or dual NA/5-HT reuptake inhibition in the rat forced swimming test. **Neuropsychopharmacology**, v. 24, p. 379–390, 2001.

RESSTEL L.B., ALVES F.H., REIS D.G., CRESTANI C.C., CORREA F.M., GUIMARAES F.S. Anxiolytic-like effects induced by acute reversible inactivation of the bed nucleus of stria terminalis. **Neuroscience**, v. 154, n. 3, p. 869-876, 2008.

SAHUQUE L.L., KULLBERG E.F., MCGEEHAN A.J., KINDER J.R., HICKS M.P., BLANTON M.G., JANAK P.H., OLIVE M.F. Anxiogenic and aversive effects of corticotrophin-releasing-factor (CRF) in the bed nucleus of stria terminalis in the rat: role of CRF receptor subtypes. **Psychopharmacology**, v. 186, n. 1, p. 122-32, 2006.

SAPOLSKY R.M. Stress, glucocorticoids and damage to the nervous system: the current state of confusion. **Stress**, v. 1, n. 1, p. 1-19, 1999.

SARA S.J. The locus coeruleus and noradrenergic modulation of cognition. **Nature Reviews Neuroscience**, v. 10, p. 211–223, 2009.

SCHECHTER L.E., RING R.H., BEYER C.E., HUGHES Z.A., KAWHAJA X., MALBERG J.E., ROSENZWEIG-LIPSON S. Innovative approaches for development of antidepressant drugs: current and future strategies. **The American Society for Experimental Neuro Therapeutics**, v. 2, p. 590-611, 2005.

SELYE H. A syndrome produced by diverse nocuous agents. **Nature**, v. 138, n. 4, p. 32, 1936.

SCHILDKRAUT J.J. The catecholamine hypothesis of affective disorders: a review of supporting evidence. **The American Journal of Psychiatry**, v. 122, p. 509-522, 1965.

SHIN J.W., GEERLING J.C., LOEWY A.D. Inputs to the ventrolateral bed nucleus of the stria terminalis. **Journal of Comparative Neurology**, v. 511, n. 5, p. 628-657, 2008.

SCHULZ D., CANBEYLI R.S. Lesion of the bed nucleus of the stria terminalis enhances learned despair. **Brain Research Bulletin**, v. 52, n. 2, p. 83-87, 2000.

SILVA M., AGUIAR D.C., DINIZ C.R., GUIMARÃES F.S.; JOCA S.R. Neuronal NOS inhibitor and conventional antidepressant drugs attenuate stress-induced fos expression in overlapping brain regions. **Cellular and Molecular Neurobiology**, v. 32, n. 3, p. 443-453, 2012.

STONE E.A., LEHMANN M.L., LIN Y., QUARTERMAIN D. Depressive behavior in mice due to immune stimulation is accompanied by reduced neural activity in brain regions involved in positively motivated behavior. **Biological Psychiatry**, v. 60, n. 8, p. 803-811, 2006.

STONE E.A., QUARTERMAIN D., LIN Y., LEHMAN M.L. Central α_1 -adrenergic system in behavioral activity and depression. **Biochemical Pharmacology**, v. 73, p. 1063-1075, 2007.

VALLES A., MARTI O., ARMARIO A. Long-term effects of a single exposure to immobilization: a c-fos mRNA study of the response to the homotypic stressor in the rat brain. **Journal of Neurobiology**, v. 66, n. 6, p. 591-602, 2006.

WALKER D.L., TOUFEXIS D.J., DAVIS M. Role of the bed nucleus of the stria terminalis versus the amygdala in fear, stress, and anxiety. **European Journal of Pharmacology**, v. 463, p. 199-216, 2003.

WHITEFORD H.A., PEABODY, C.A., CSERNANSKI J.G., WARNER M.D., BERGER P.A. Elevated baseline and postdexamethasone cortisol levels. A reflexion of severity or endogeneity? **Journal of Affective Disorders**, v. 12, n. 3, p. 199-202, 1987.

WOULFE J.M., HRYCYSHYN A.W., FLUMERFELT B.A. Collateral axonal projections from the A1 noradrenergic cell group to the paraventricular nucleus and bed nucleus of the stria terminalis in the rat. **Experimental Neurology**, v. 102, n. 1, p. 121-124, 1988.

YANG X-M, GORMAN A.L., DUNN A.J. The involvement of central noradrenergic systems and corticotrophin-releasing factor in defensive – withdrawal in rats. **The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 255, p. 1064-1070, 1990.

YU N.N, WANG X.X., YU J.T., WANG N.D., LU R.C., MIAO D., TIAN Y., TAN L. Blocking β_2 -adrenergic receptor attenuates acute stress-induced amyloid β peptides production. **Brain Research**, v. 1317, p. 305-310, 2010.

ZHANG, H.T., WHISLER, L.R., HUANG, Y., XIANG, Y., O'DONNELL, J.M. Postsynaptic 1317 α_2 adrenergic receptors are critical for the antidepressant-like effects of 1318 desipramine on behavior. **Neuropsychopharmacology**, v. 34, p.1067–1077, 2009.

ZOBEL A.W., NICKEL T., KÜNZEL H.E., ACKL N., SONNTAG A., ISING M., HOLSBOER F. Effects of the high-affinity corticotropin-releasing hormone receptor 1 antagonist R121919 in major depression: the first 20 patients treated. **Journal of Psychiatric Research**, v. 34, p. 171–181, 2000.