



**UFBA**

**UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA  
FACULDADE DE MEDICINA  
FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ - FIOCRUZ  
CENTRO DE PESQUISAS GONÇALO MONIZ**



**FIOCRUZ**

**Curso de Pós-Graduação em Patologia Humana**

**TESE DE DOUTORADO**

**ESTUDO DO TRATAMENTO AGUDO E CRÔNICO COM OS  
ANTIDEPRESSIVOS NORTRIPTILINA E DESIPRAMINA NA  
EXPRESSÃO CEREBRAL DE C-FOS E NAS RESPOSTAS  
COMPORTAMENTAIS NO NADO FORÇADO EM RATOS**

**REJANE CONCEIÇÃO SANTANA**

Salvador - Bahia - Brasil  
2009

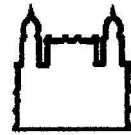


004469



UFBA

UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA  
FACULDADE DE MEDICINA  
FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ - FIOCRUZ  
CENTRO DE PESQUISAS GONÇALO MONIZ



FIOCRUZ

**Curso de Pós-Graduação em Patologia Humana**

**REJANE CONCEIÇÃO SANTANA**

**ESTUDO DO TRATAMENTO AGUDO E CRÔNICO COM OS  
ANTIDEPRESSIVOS NORTRIPTILINA E DESIPRAMINA NA  
EXPRESSÃO CEREBRAL DE C-FOS E NAS RESPOSTAS  
COMPORTAMENTAIS NO NADO FORÇADO EM RATOS**

Tese apresentada ao Colegiado do curso de Pós-graduação em Patologia Humana, da Faculdade de Medicina da Universidade Federal da Bahia, como pré-requisito obrigatório para obtenção do título de Doutor.

Orientadora: Prof<sup>a</sup> Dra. Josmara Bartolomei Fregoneze

Salvador – Bahia – Brasil

2009



Ficha Catalográfica elaborada pela Biblioteca do  
Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz / FIOCRUZ - Salvador - Bahia.

S231e Santana, Rejane Conceição  
Estudo do tratamento agudo e crônico com os antidepressivos nortriptilina e desipramina na expressão cerebral de c-fos e nas respostas comportamentais no nado forçado em ratos [manuscrito] / Rejane Conceição Santana. - 2009.  
94 f. : il. ; 30 cm.

Datilografado (fotocópia).

**Tese (doutorado) – Universidade Federal da Bahia. Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz, 2009.**

Orientador: Prof. Dra. Josmara Bartolomei Fregoneze. Laboratório de Neurociências, ICS.

1. Antidepressivos tricíclicos. 2. Terapêutica. 3. Depressão. 4. Ratos. I.Título.


CDU 613.86:599.323.4

"EFEITO DO TRATAMENTO AGUDO E CRÔNICO COM OS ANTIDEPRESSIVOS  
NORTRIPTILINA E DESIPRAMINA NA EXPRESSÃO CEBRAL DE C-FOS E NAS RESPOSTAS  
COMPORTAMENTAIS NO NADO FORÇADO EM RATOS"

REJANE CONCEIÇÃO SANTANA

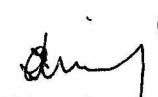
FOLHA DE APROVAÇÃO

COMISSÃO EXAMINADORA



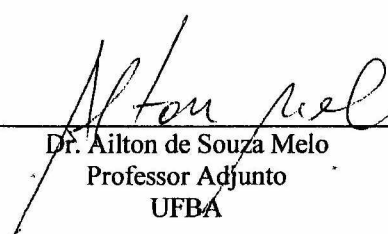
---

Dr. Ramon dos Santos El-Bachá  
Professor Associado  
UFBA



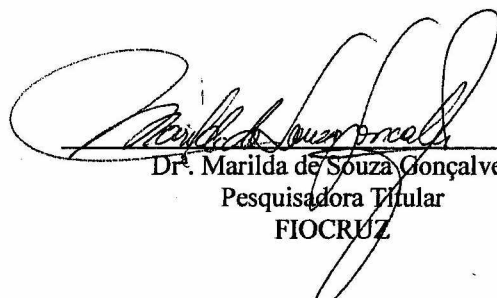
---

Dr. Irismar Reis de Oliveira  
Professor Titular  
UFBA



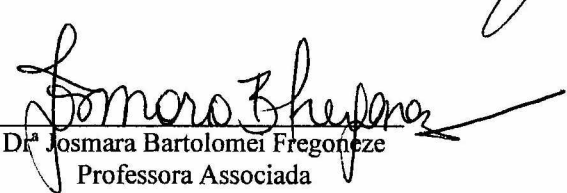
---

Dr. Ailton de Souza Melo  
Professor Adjunto  
UFBA



---

Dr. Marilda de Souza Gonçalves  
Pesquisadora Titular  
FIOCRUZ



---

Dr.ª Josmara Bartolomei Fregoneze  
Professora Associada  
FIOCRUZ

## AGRADECIMENTOS

À professora Josmara Bartolomei Fregoneze, por me guiar na vida acadêmica, profissional e no campo pessoal, meus sinceros agradecimentos.

Ao doutor Irismar Reis de Oliveira, por colaborar e estar presente nos momentos mais decisivos desta tese, obrigada por tudo.

Ao professor Emílio de Castro-e-Silva, por colaborar com a elaboração dos artigos científicos que compõem este trabalho.

Aos estudantes de iniciação científica: Átila Batista, Diana Rodrigues, Lívia Pinheiro, Marcelo Cunha e Tássia Faustino.

Aos srs. Vanilson Silva e José de Souza pelo apoio técnico e amizade.

Aos meus pais, irmãos e amigos que tiveram paciência para me ouvir e pelas palavras, ombros bem vindos em momento oportuno.

Agradeço a Paulo Roberto, pelo companheirismo, paciência e dedicação.

Aos pós-graduandos: Anderson Souza, Carla Patrícia, Elenilda, Fernando Carvalho, Hilda Ferreira, Janeide Magrani, Lília e Patrícia pelo exemplo e colaboração.

Ao setor de Psicoterapia Cognitivo-Comportamental da UFBA, em especial às psicólogas Vânia Powell e Milke Caldas.

À coordenadora Landislei e ao vice-diretor Antônio Barreto do Colégio da Polícia Militar, agradeço pela compreensão e apoio.

À bibliotecária Ana Maria Fiscina Vaz Sampaio, pela normatização desta tese e das referências bibliográficas.

AO CPqGM/ FIOCRUZ, pelo apoio, infra-estrutura, qualidade e simpatia dos seus professores, pesquisadores e funcionários.

“Perguntaram-lhe o que é a esperança, e sua resposta foi: ‘o sonho de um homem acordado’,”

**Laércio Diógenes (ca. 320 a.C.).**

## RESUMO

**SANTANA, R. C. ESTUDO DO TRATAMENTO AGUDO E CRÔNICO COM OS ANTIDEPRESSIVOS NORTRIPTILINA E DESIPRAMINA NA EXPRESSÃO CEREBRAL DE C-FOS E NAS RESPOSTAS COMPORTAMENTAIS NO NADO FORÇADO EM RATOS.** Tese (Doutorado) – Universidade Federal da Bahia/FIOCRUZ, Salvador, 2009.

Muitos estudos têm sido realizados com o objetivo de esclarecer os mecanismos fisiopatogênicos da depressão, no entanto, o processo neurobiológico exato que leva a depressão e os mecanismos responsáveis pelo efeito terapêutico de drogas antidepressivas não foram completamente elucidados. Dessa forma, os objetivos do presente trabalho foram: 1) Comparar o perfil da expressão de c-Fos no cérebro de ratos sob tratamento agudo e crônico com antidepressivos tricíclicos, especialmente no que diz respeito ao fenômeno da janela terapêutica; 2) Comparar as respostas comportamentais (imobilidade, nado e escalada) no teste do nado forçado em ratos sob tratamento agudo com nortriptilina e desipramina; 3) Investigar se o padrão de resposta comportamental observado em ratos submetidos ao teste do nado forçado pode confirmar a ocorrência de janela terapêutica para o antidepressivo nortriptilina. Foram utilizados ratos adultos Wistar com 8 semanas de idade. Para o estudo do efeito da administração aguda na expressão de c-Fos e teste do nado forçado, foram utilizados desipramina e (5, 10, 25 e 50 mg/kg), nortriptilina (5, 10, 25 e 50 mg/kg) ou soro fisiológico 0,9% (controles) via intraperitoneal. No estudo do efeito da administração crônica de nortriptilina e desipramina, foram utilizadas as doses de 5, 10, 15 e 20 mg/kg de desipramina e nortriptilina via intraperitoneal durante 14 dias. O grupo controle recebeu soro fisiológico 0,9% nas mesmas condições. O presente estudo mostra que, no tratamento agudo com os antidepressivos tricíclicos nortriptilina e desipramina, em diferentes doses, há aumento da expressão de c-Fos de forma dose-dependente nas seguintes áreas: MPOL, PVN, SCh, hipocampo (CA1), CeA e MeA. Enquanto a desipramina apresentou uma curva linear crescente, a nortriptilina mostrou curva em forma de U invertido, sendo que tanto a menor quanto a maior dose se diferenciam do grupo controle. O mesmo padrão de resposta foi observado com a administração crônica destes antidepressivos. Além disso, verificou-se no teste do nado forçado que a desipramina diminui o tempo de imobilidade de forma dose-dependente linear crescente, enquanto a nortriptilina reduziu o tempo de imobilidade de forma dose-dependente em forma de U, sendo que a menor e a maior dose apresentaram menor efeito no tempo de imobilidade. Em suma, nossos dados mostram que as áreas estudadas podem estar implicadas na atividade dos antidepressivos nortriptilina e desipramina.

Palavras-chave: 1. Antidepressivos tricíclicos; 2. Terapêutica; 3. Depressão; 4. Ratos

## ABSTRACT

**SANTANA, R. C. STUDY OF THE ACUTE AND CHRONIC TREATMENT WITH ANTIDEPRESSANTS, NORTRIPTYLINE AND DESIPRAMINE ON C-FOS EXPRESSION IN THE BRAIN AND BEHAVIORAL RESPONSES IN THE FORCED SWIM TEST IN RATS. Tese (Doutorado) – Universidade Federal da Bahia/FIOCRUZ, Salvador, 2009.**

Many studies have been accomplished to clarify the physiopathogenesis of depression, however, the exact neurobiological process that leads to depression and the mechanisms responsible for the therapeutic effect of antidepressant drugs have not been fully elucidated. Thus the goals of this study were: 1) compare the profile of c-Fos expression in the brain of rats under acute and chronic treatment with tricyclic antidepressants, nortriptyline and desipramine especially as regards the phenomenon of the therapeutic window; 2) to analyze the behavioral responses (immobility, swimming and climbing) in the forced swim test in rats under acute treatment with nortriptyline and desipramine, 3) to verify whether the behavioral pattern of rats submitted to forced swim test confirm the phenomenon of therapeutic window for the antidepressant nortriptyline. Adult, male, Wistar rats ( $250 \pm 30$ g) were received acute administration of nortriptyline or desipramine in the doses used of 5, 10, 25 and 50mg/kg, i.p. In the first experimental group the animals were sacrificed 1 hour later. The brains were removed after transcardiac perfusion with phosphate buffered saline followed by paraformaldehyde, and were then processed for immunohistochemistry. Fos-like immunoreactivity was quantified by a computerized system. In the second experimental group the animals were submitted to forced swim test. In the third experimental group the animals received a chronic administration of nortriptyline or desipramine (5, 10, 15 and 20mg/kg, i.p.) for 14 days. Control groups of acute and chronic treatment received saline 0.9% in the same conditions. In the acute treatment with tricyclic antidepressants, nortriptyline and desipramine there is increased expression of c-Fos in the following areas: MPOL, PVN, SCH, hippocampus (CA1), CEA and MEA. While the acute treatment desipramine, according to the dose, induced a linear increase in the number of c-Fos positive nuclei, the acute treatment with nortriptyline produced a U-inverted curve with the lowest and the highest doses ineffective. The same pattern of response was observed with chronic administration of antidepressants. Moreover, in the forced swim test desipramine decreases the time of immobility in a dose-dependent linear way, while the nortriptyline reduced the time of immobility, according to the dose, in a U-inverted curve manner. The data suggest that the brain areas MPOL, PVN, SCH, CA1, MEA may be involved in therapeutic responses to tricyclic antidepressants and confirm the occurrence of a therapeutic window for the antidepressant nortriptyline.

**Keywords:** 1. Tricyclic antidepressants; 2. Therapeutic; 3. Depression; 4 Rats.



## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

Para as abreviaturas das áreas cerebrais, foram utilizadas as denominações adotadas no atlas estereotático de Paxinos e Watson (1998).

ADT	Antidepressivos tricíclicos
AHiPM	Amígdala hipocampal
AMPC	Adenosina monofosfato cíclico
AP	Área postrema
Arc	Núcleo arqueado
AVP	Vasopressina
BDNF	Fator neurotrófico derivado do cérebro
BST	Leito da estria terminalis
CA1	Área hipocampal 1
CA3	Área hipocampal 3
CeA	Núcleo central da amígdala
<i>c-fos</i>	Proto-oncogene envolvido na regulação da transcrição gênica
c-Fos	Produto do gene <i>c-fos</i>
Cg	Giro do cíngulo
CRF	Fator liberador de corticotrofinas
CRH	Hormônio liberador de corticotrofinas
CREB	Proteína de resposta ao AMPc (fator de transcrição no cérebro).
DMI	Desipramina
i.p.	Via intraperitoneal
ISRS	Inibidores seletivos da recaptção de serotonina
LSV	Núcleo septal lateral, parte ventral
MAO	Enzima monoaminoxidase
MeA	Amígdala medial
MPOL	Núcleo preóptico medial lateral
MnPO	Núcleo preóptico mediano
NOR	Nortriptilina
PAG	Substância cinzenta periaquedutal
PaLM	Núcleo paraventricular magnocelular
PaMP	Núcleo paraventricular parvocelular

PB	Tampão fosfato
PBS	Tampão salina fosfato
PVN	Núcleo paraventricular
SCh	Núcleo supraquiasmático
SNC	Sistema nervoso central
SON	Núcleo supraóptico
5-HT	Serotonina; 5- hidroxitriptamina

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1:	Circuitos neurais da emoção	17
Figura 2:	Protocolos para estudo do perfil da expressão de c-Fos no cérebro de ratos sob tratamento agudo e crônico com nortriptilina e desipramina.	32
Figura 3:	Protocolo para estudo do comportamento de ratos sob tratamento agudo com nortriptilina e desipramina no teste do nado forçado	33
Figura 4:	Fotografias do cilindro utilizado para o nado forçado e dos ratos em cada comportamento típico analisado. (A) cilindro com as medidas utilizadas (B) imobilidade, (C) escalada, (D) nado.	36
Figura 5:	Efeito do tratamento agudo com nortriptilina e desipramina (5, 10, 25 e 50 mg/kg) ou salina (dose 0) na expressão c-Fos na CA1 (painel A) e AHIPM (painel B).	39
Figura 6:	Fotomicrografia típica da área CA1 do hipocampo (CA1) e na amígdala hipocampal (AHIPM) com núcleos imunorreativos a c-Fos em ratos submetidos a administração aguda de nortriptilina e desipramina.	40
Figura 7:	Efeito do tratamento agudo com nortriptilina e desipramina (5, 10, 25 e 50 mg/kg) ou salina (dose 0) na expressão c-Fos no MPOL (painel C) e MnPO (painel D).	42
Figura 8:	Fotomicrografia típica do MPOL e do MnPO com núcleos imunorreativos c-Fos em ratos submetidos a administração aguda de nortriptilina e desipramina.	43
Figura 9:	Efeito do tratamento agudo com nortriptilina e desipramina (5, 10, 25 e 50 mg/kg) ou salina (dose 0) na expressão c-Fos no PVN (painel E) e SCh (painel F).	45
Figura 10:	Fotomicrografia típica do PVN e do SCh com núcleos imunorreativos c-Fos em ratos submetidos a administração aguda de nortriptilina e desipramina	46
Figura 11:	Diagrama esquemático, adaptado do atlas estereotático de Paxinos & Watson (1998), bregma -0.30mm a -4.30mm, ilustrando as sete áreas nas quais o número de núcleos imunoreativos a c-Fos foi quantificado no presente estudo.	47
Figura 12:	Efeito da nortriptilina (Painel A) e desipramina (Painel B) em diferentes doses (5, 10, 25 e 50 mg/kg) no tempo de imobilidade durante o teste do nado forçado.	50
Figura 13:	Efeito da nortriptilina (Painel A) e desipramina (Painel B) em diferentes doses (5, 10, 25 e 50 mg/kg) no tempo de escalada durante o teste do nado forçado.	51
Figura 14:	Efeito da nortriptilina (Painel A) e desipramina (Painel B) em diferentes doses (5, 10, 25 e 50 mg/kg) no tempo de nado durante o teste do nado forçado	52
Figura 15:	Expressão de c-Fos na CA1 –área hipocampal, no CeA – núcleo da amígdala central (C, D) e AHIPM- amígdala	55

	hipocampal (E, F) nas diferentes doses de nortriptilina e desipramina (5, 10, 15 e 20 mg/kg).	
Figura 16:	Fotomicrografia típica que mostra a distribuição de núcleos neuronais imunorreativos a c-Fos em secções coronais de cérebro de ratos das estruturas CA1	56
Figura 17:	Fotomicrografia típica que mostra a distribuição de núcleos neuronais imunorreativos a c-Fos em secções coronais de cérebro de ratos das estruturas CeA.	57
Figura 18:	Fotomicrografia típica que mostra a distribuição de núcleos neuronais imunorreativos a c-Fos em secções coronais de cérebro de ratos das estruturas AHIPM.	58
Figura 19:	Expressão de c-Fos no PaLM – núcleo paraventricular magnocelular (A, B) e no PaMP- núcleo paraventricular parvocelular (C, D) nas diferentes doses de nortriptilina e desipramina	60
Figura 20:	Fotomicrografia típica que mostra a distribuição de núcleos neuronais imunorreativos a c-Fos em secções coronais de cérebro de ratos das estruturas PaLM e PaMP.	61
Figura 21:	Expressão de c-Fos no SCh – núcleo supraquiasmático (A, B) e no MPOL- núcleo preóptico medial lateral (C, D) nas diferentes doses de nortriptilina e desipramina	63
Figura 22:	Fotomicrografia típica que mostra a distribuição de núcleos neuronais imunorreativos a c-Fos em secções coronais de cérebro de ratos das estruturas SCh	64
Figura 23:	Fotomicrografia típica que mostra a distribuição de núcleos neuronais imunorreativos a c-Fos em secções coronais de cérebro de ratos das estruturas MPOL	65

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO .....</b>	<b>13</b>
<b>Revisão da Literatura .....</b>	<b>15</b>
<b>1.1 Base neural do comportamento emocional normal .....</b>	<b>15</b>
<b>1.2 Mudanças estruturais e funcionais no SNC durante a depressão .....</b>	<b>17</b>
<b>1.3 Processos que medeiam as mudanças neurobiológicas na depressão .....</b>	<b>19</b>
<b>1.4 Antidepressivos tricíclicos .....</b>	<b>22</b>
<b>1.5 Expressão de c-Fos e Depressão .....</b>	<b>24</b>
<b>1.6 Teste do Nado Forçado Modificado - Um modelo de identificação de drogas com ação antidepressiva .....</b>	<b>26</b>
<b>2 HIPÓTESES .....</b>	<b>29</b>
<b>3 OBJETIVOS .....</b>	<b>30</b>
<b>4 MATERIAL E MÉTODOS .....</b>	<b>31</b>
<b>4.1 Animais .....</b>	<b>31</b>
<b>4.2 Drogas utilizadas .....</b>	<b>31</b>
<b>4.3 Grupos experimentais .....</b>	<b>31</b>
<b>4.4 Procedimentos para remoção do cérebro e preparo dos mesmos para processamento imuno-histoquímico .....</b>	<b>33</b>
<b>4.5 Processamento imuno-histoquímico .....</b>	<b>33</b>
<b>4.6 Análise histológica .....</b>	<b>34</b>
<b>4.7 Teste do nado forçado modificado .....</b>	<b>35</b>
<b>4.8 Análise Estatística .....</b>	<b>37</b>
<b>5 RESULTADOS .....</b>	<b>38</b>
<b>6 DISCUSSÃO .....</b>	<b>66</b>
<b>7 CONCLUSÕES .....</b>	<b>74</b>
<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....</b>	<b>75</b>
<b>APÊNDICES .....</b>	<b>91</b>

## I. INTRODUÇÃO

A melancolia já era conhecida como doença desde o século V a.C e é uma forma de depressão, síndrome clínica de alta ocorrência e de etiologia desconhecida (JACKSON, 1986). Muitos estudos têm sido realizados com o objetivo de esclarecer os mecanismos fisiopatogênicos da depressão. Desde o desenvolvimento da hipótese monoaminérgica para explicar as possíveis causas da depressão, houve um crescente fortalecimento da importância atribuída ao papel da neurotransmissão cerebral na fisiopatologia dos estados de humor. Inicialmente se acreditava que a causa da depressão era por simples alteração dos níveis endógenos de neurotransmissores cerebrais, mas isso foi sendo modificado e hoje os modelos propostos são muito mais complexos e abrangentes. Com a identificação de neurotransmissores e neuromoduladores cerebrais, passou-se a considerar o modelo de interação entre os diversos sistemas de neurotransmissão e a existência de diferentes níveis de transformações neurobiológicas como possíveis causas da depressão. Entre os fatores neurobiológicos sugeridos como participantes deste processo pode-se citar: a cascata de reações intracelulares, incluindo a proteína CREB; polimorfismo específico do gene do transportador da serotonina e especialmente o fenômeno da neurogênese (LICINIO & WONG, 2001). De fato, verificou-se uma proliferação de células progenitoras no hipocampo de animais tratados com antidepressivos, ocorrendo maior expressão de BDNF (fator neurotrófico derivado do cérebro) (NIBUYA et al., 1996; IVY et al., 2003; KALIA, 2005; SCORZA et al., 2005; DUMAN, 2004). O BDNF é importante nas adaptações neurais ao estresse e tem propriedade antidepressiva em modelos animais de depressão (HASHIMOTO et al., 2004).

Apesar das extensas investigações, o exato processo neurobiológico que leva à depressão e os mecanismos responsáveis pelo efeito terapêutico de drogas antidepressivas não foram completamente elucidados. Dessa forma, no presente trabalho decidiu-se: 1) Comparar o perfil da expressão de c-Fos no cérebro de ratos sob tratamento agudo com antidepressivos tricíclicos, especialmente no que diz respeito ao fenômeno da “janela terapêutica”; 2) Comparar as respostas comportamentais (imobilidade, nado e escalada) no teste do nado forçado em ratos sob tratamento agudo com nortriptilina e desipramina; 3) Investigar se o padrão de resposta comportamental observado em ratos submetidos ao teste do nado forçado pode confirmar a ocorrência de janela terapêutica para o antidepressivo nortriptilina e 4) Comparar o perfil da

expressão de c-Fos no cérebro de ratos sob tratamento crônico com nortriptilina e desipramina, especialmente no que diz respeito ao fenômeno da “janela terapêutica”.

Espera-se que os dados deste trabalho possam se constituir em importante passo para a localização de áreas relevantes para a ação destas drogas antidepressivas e, talvez, contribuir com dados adicionais para a compreensão dos seus mecanismos de ação.

## Revisão da Literatura

### 1.1 Base neural do comportamento emocional normal

As sensações subjetivas e os estados fisiológicos associados conhecidos como emoções são características essenciais da experiência humana normal. Embora as emoções diárias possam ser tão variadas como felicidade, surpresa, raiva, medo e tristeza, elas compartilham de algumas características comuns: as emoções são expressas, tanto através de mudanças viscerais motoras como de respostas motoras somáticas estereotipadas, especialmente movimentos dos músculos faciais (CLORE & ORTONY, 2000). A expressão emocional está fortemente ligada ao sistema motor visceral e, dessa forma, requer a atividade das estruturas encefálicas centrais que governam os neurônios pré-ganglionares no tronco encefálico e na medula espinhal. Papez (1937) mostrou que o córtex cingulado e o hipotálamo estão interconectados via projeções dos corpos mamilares para o núcleo anterior do tálamo dorsal, que projeta conexões, por sua vez, para o giro cingulado. O giro cingulado envia projeções para o hipocampo e deste para o fórnix de volta para o hipotálamo. Papez sugeriu que essas vias fornecem as conexões necessárias para o controle cortical da expressão emocional, tomando-se estas conhecidas como “circuito de Papez”.

No entanto, o circuito inicialmente descrito por Papez foi revisado para incluir partes do córtex pré-frontal orbital e medial, parte ventral dos gânglios da base, o núcleo mediodorsal do tálamo e uma grande massa nuclear no lobo temporal, anterior ao hipocampo, denominada amígdala ou complexo amigdalóide (figura 1) (ONGUR & PRINCE, 2000). Esse conjunto de estruturas, juntamente com o hipocampo e o córtex cingulado, é denominado de sistema límbico. Efetivamente, a ação orquestrada dessas regiões encefálicas se constitui no sistema motor emocional.

O corpo amigdalóide é uma estrutura essencial na formulação de respostas emocionais, particularmente o medo. O condicionamento clássico, pelo qual o indivíduo reage com medo a um estímulo inofensivo que foi combinado de forma repetida a um estímulo nocivo, não ocorre se o corpo amigdalóide sofre danos previamente (LeDOUX, 1987). Estudos envolvendo lesão bilateral do lobo temporal (KLUVER & BUCY, 1939) e, particularmente da amígdala (ZOLA-MORGAN et al., 1991), mostraram mudança significativa do comportamento de macacos. Os animais apresentavam agnosia visual parecendo incapazes de reconhecer objetos, embora não



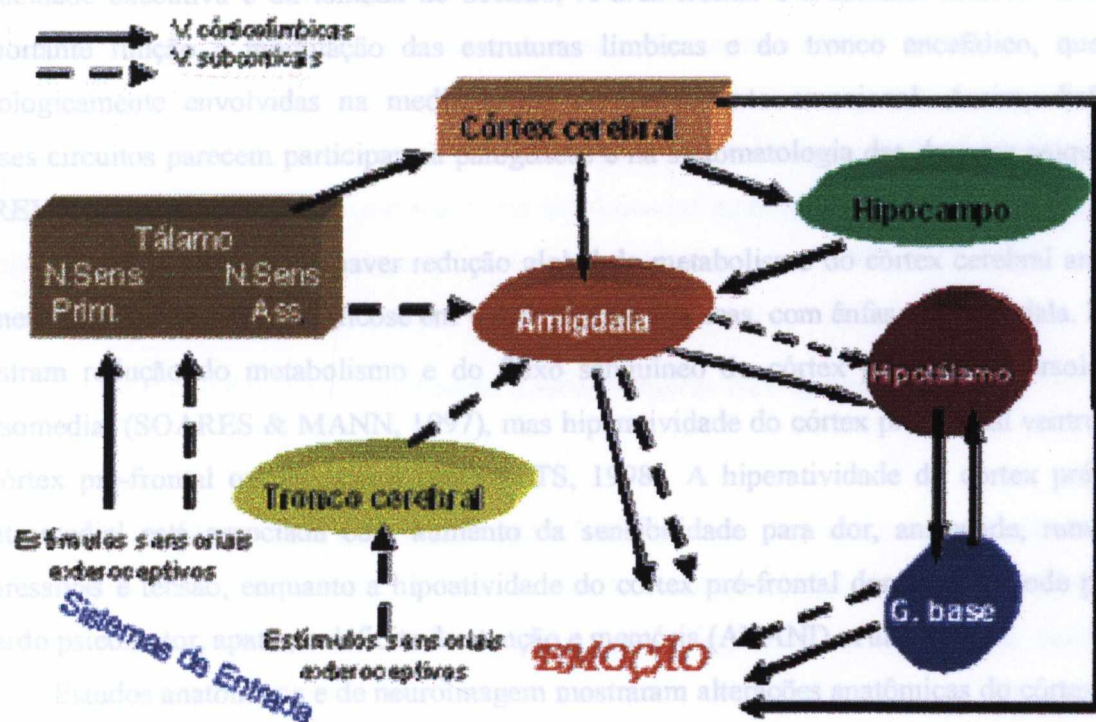
estivessem cegos. Além disso, os macacos apresentavam comportamentos orais estranhos (colocando objetos na boca que normalmente não colocariam), hiperatividade, hipersexualidade e ausência de reações vocais e motoras emocionais usualmente associadas com medo ou raiva. De forma oposta, a estimulação elétrica da amígdala aumenta os níveis plasmáticos de corticosterona, sintomas autonômicos relacionados ao medo, ansiedade, atenção, vigilância e “frozen” ou gelar, paralisar (KAPP et al., 1994). Gray (1990) relatou em seu estudo que a amígdala é rica em neurônios produtores de CRF e representa parte do sistema CRF extra-hipotalâmico que está relacionada ao comportamento de medo em resposta ao estresse, como também na ativação do eixo hipotálamo-hipófise-adrenal.

A amígdala contém três subdivisões funcionais: grupo medial, grupo basolateral e o grupo central. O grupo medial de subnúcleos apresenta extensas conexões com o bulbo olfativo e são particularmente importantes para o processamento de informações de feromônios. O grupo basolateral, que é especialmente desenvolvido em humanos, apresenta conexões importantes com o córtex cerebral, especialmente o pré-frontal medial e orbital (CARMICHAEL & PRINCE, 1995), influenciando sentimentos conscientes. Projeções deste grupo são enviadas também para os núcleos centrais. O grupo central caracteriza-se por conexões com o tronco encefálico, com o hipotálamo e com estruturas sensoriais viscerais, tais como o núcleo do trato solitário (PITKÄNEN, 2000) influenciando os padrões de respostas viscerais que acompanham os estados emocionais. Parece que o corpo amigdalóide é o local no qual a percepção de estímulos é combinada à informação sobre a significação biológica dos mesmos. O corpo amigdalóide emite comandos para o hipotálamo para ativar o sistema nervoso simpático ou parassimpático, dependendo das demandas da situação. Este núcleo da amígdala projeta-se para o *locus coeruleus* e para a área tegmental ventral controlando a liberação de noradrenalina e de dopamina (DAVIS & WHALEN, 2001). Além disso, esta área pode ser responsável direta pelas expressões faciais e prostração (ROLLS, 1999). Estudos em humanos indicam que a amígdala (CANLI et al., 2000) e a ínsula (BUHEL et al., 1999) são importantes na identificação do significado emocional de um estímulo ambiental e a produção de um estado afetivo e do comportamento emocional adequados.

Em revisão feita por Phillips e colaboradores (2003), verifica-se que os processos que levam à percepção de estímulos e ao comportamento emocional adequado podem ser dependentes de dois sistemas neurais: um sistema ventral e um sistema dorsal. O sistema ventral seria importante para a identificação do significado do estímulo emocional e a produção de

estados afetivos. Este sistema é formado pela amígdala, ínsula, estriado ventral e as regiões anterior e ventral do giro cingulado e córtex pré-frontal. O sistema dorsal, incluindo o hipocampo e as regiões dorsal e anterior do giro cingulado e córtex pré-frontal, é responsável pela integração dos processos cognitivos e pode ser influenciado pelo *input* emocional do sistema ventral, sendo importante para a performance da função executiva do comportamento e regulação do estado afetivo.

## Circuitos Neurais da Emoção



**Figura 1 - Circuitos neurais da emoção.** Modificado de [www.fpce.up.pt/psicof/aulas/12\\_emocoes.pdf](http://www.fpce.up.pt/psicof/aulas/12_emocoes.pdf)

### 1.2 Mudanças estruturais e funcionais no SNC durante a depressão

Embora algum grau de alteração do humor esteja presente em virtualmente todos os problemas psiquiátricos, a essência do transtorno de humor é uma regulação anormal do sentimento de tristeza e de felicidade. Várias estruturas pré-frontais e límbicas e seus circuitos interconectados têm sido implicados na regulação afetiva. Anormalidades nas áreas

neuroanatômicas como: o córtex pré-frontal ventromedial, córtex pré-frontal orbital lateral, córtex cingulado anterior, estriado ventral (incluindo o *accumbens*), amígdala e o hipocampo estão presentes em pacientes com depressão maior comparado com indivíduos saudáveis (DREVETS, 1998; DAVIDSON, 2003).

A importância de alterações no córtex frontal em quadros depressivos vem sendo ressaltada por vários autores (POWEL & MIKLOWITZ, 1994; VEIEL, 1997; MURPHY et al., 2001; ALEXOPOULOS et al., 2002), levando em conta as alterações clínicas encontradas em quadros psíquicos típicos relacionadas a alterações da atenção, da psicomotricidade, da capacidade executiva e da tomada de decisão. A área frontal e a estriatal também têm como importante função a modulação das estruturas límbicas e do tronco encefálico, que estão fisiologicamente envolvidas na mediação do comportamento emocional. Assim, disfunções nesses circuitos parecem participar na patogênese e na sintomatologia das doenças psiquiátricas (DREVETS, 2001).

Na depressão, parece haver redução global do metabolismo do córtex cerebral anterior e aumento do metabolismo de glicose em várias regiões límbicas, com ênfase na amígdala. Estudos mostram redução do metabolismo e do fluxo sanguíneo do córtex pré-frontal dorsolateral e dorsomedial (SOARES & MANN, 1997), mas hiperatividade do córtex pré-frontal ventromedial e córtex pré-frontal orbital lateral (DREVETS, 1998). A hiperatividade do córtex pré-frontal ventromedial está associada com aumento da sensibilidade para dor, ansiedade, ruminações depressivas e tensão, enquanto a hipoatividade do córtex pré-frontal dorsolateral pode produzir retardo psicomotor, apatia, e déficits de atenção e memória (ANAND et al., 2005).

Estudos anatômicos e de neuroimagem mostraram alterações anatômicas do córtex orbital bilateral em pacientes deprimidos idosos (LAI et al., 2000) e diminuição do fluxo sanguíneo e do metabolismo no córtex pré-frontal em pacientes com depressão unipolar e bipolar (SOARES & MANN, 1997).

Thase (1999), em revisão feita sobre aspectos anatômicos da depressão, relata alterações na substância branca subcortical, especialmente na área periventricular, gânglios da base e tálamo. Sweeney e colaboradores (2000) e Soares e Mann (1997) relataram alterações funcionais do sistema fronto-estriatal, redução do fluxo sanguíneo e do metabolismo nos gânglios da base em pacientes com depressão unipolar e bipolar. Além disso, verifica-se aumento de substância branca em pacientes unipolares, especialmente na área periventricular, e redução nos núcleos

caudado e putâmen. As alterações fronto-estriatais e límbicas vêm sendo identificadas em subgrupos de pacientes deprimidos idosos e jovens, sendo que estas parecem estar relacionadas com uma pior evolução da doença a curto e a longo prazo (ALEXOPOULOS et al., 2002).

A amígdala também vem sendo amplamente implicada nos transtornos afetivos por estar intimamente relacionada ao aprendizado emocional (KENNEDY et al., 1997). O núcleo central da amígdala parece ser crucial na relação entre emoção e comportamento. Estudos empregando tomografia por emissão de pósitrons (PET scan), mostram anormalidades consistentes nas regiões pré-frontais, cingulares e da amígdala (KENNEDY et al., 1997).

O aumento no fluxo sanguíneo na amígdala, tálamo (DREVETS et al., 1992), e regiões ventrais límbicas, incluindo a ínsula anterior e estriado ventral (MAYBERG et al., 1999), e a correlação positiva entre o metabolismo da amígdala e a gravidade da depressão (ABERCROMBIE et al., 1998) têm sido encontrados em pacientes com depressão maior. Este hipermetabolismo amigdaliano serviria como amplificador emocional que ajudaria a distorcer os sinais de estressores relativamente menores em pessoas vulneráveis (DREVETS, 2003).

### **1.3 Processos que medeiam as mudanças neurobiológicas na depressão**

As principais teorias relativas às bases biológicas da depressão enfocam alterações da atividade dos neurotransmissores cerebrais e de seus receptores. A depressão pode envolver múltiplos correlatos biológicos de disfunção e desregulação em um ou vários sistemas de neurotransmissores cerebrais, propriedade que pode contribuir para a disparidade na sintomatologia e na resposta à terapia antidepressiva (COOPER et al., 1996; NAIR & SHARMA, 1989).

A hipótese clássica mostra que a depressão está associada à disfunção principalmente dos sistemas noradrenérgicos e serotoninérgicos centrais, ou com a subresponsividade de seus receptores. Entretanto, o conhecimento atual da complexa inter-relação entre os sistemas neurotransmissores cerebrais mostra que a hipótese de déficit de neurotransmissores é uma concepção simplista da fisiopatologia da depressão. Assim, houve deslocamento do foco de estudos para o papel dos receptores dos neurotransmissores na biologia da depressão especialmente devido aos seguintes achados: a) a depleção de monoaminas provoca um aumento

compensatório do número de receptores pós-sinápticos (*up-regulation*); b) em estudos *post mortem*, nos cérebros de pacientes suicidas, encontrou-se aumento do número de receptores 5HT<sub>2</sub> no córtex frontal; c) a ativação de alguns subtipos do mesmo receptor provoca efeitos diversos e até mesmo opostos (GRAEFF & BRANDÃO, 1993; STAHL, 1998; WILLNER, 1990). Pressupondo anormalidades funcionais em alguns tipos de receptores, esta hipótese explicativa da depressão obteve significativo avanço com o emprego de ligantes marcados radioativamente onde se evidenciou que após o uso de antidepressivos por algumas semanas ocorre redução no número de receptores beta-adrenérgicos pós-sinápticos (*down-regulation*) (GRAEFF & BRANDÃO, 1993; LEONARD, 1997).

Pacientes depressivos e dependentes de álcool que cometeram suicídio apresentaram níveis elevados de noradrenalina no hipotálamo (MOSES & ROBINS, 1975), e presença de alta-sensibilidade dos receptores  $\beta_2$ -adrenérgicos no hipotálamo e córtex pré-frontal (MEANA et al., 1992), embora outros dados indiquem diminuição da responsividade pós-sináptica dos  $\alpha_2$ -adrenoreceptores na depressão (MOKRANI et al., 1997).

Algumas condições, como a depressão maior, suicídio violento e transtornos afetivos sazonais, estão relacionadas a ritmicidade da função serotoninérgica (CAPPIELLO et al., 1996). Agressão impulsiva ou comportamento suicida têm sido relacionados com a diminuição da atividade serotoninérgica (COCCARO, 1992). Existem 14 tipos de receptores serotoninérgicos (BARNES & SHARP, 1999), onde os receptores 5-HT<sub>1B</sub> têm papel crucial na regulação da neurotransmissão serotoninérgica, atuando como auto-receptores em neurônios serotoninérgicos originários do núcleo da rafe e, como hetero-receptores em vários neurônios que não contêm serotonina (MORET & BRILEY, 1994). A diminuição da função dos receptores 5-HT<sub>1</sub> pode causar o estado de depressão. Este dado é apoiado por achados indicando que tratamentos antidepressivos efetivos aumentam progressivamente a função dos receptores 5-HT<sub>1A</sub> no hipocampo (BLIER et al., 1993) e que a depleção aguda de triptofano produz o retorno dos sintomas depressivos em torno de 80% dos pacientes depressivos tratados (DELGADO et al., 1990). Além disso, estresse agudo e crônico, como também os glicocorticóides, aumentam o número de 5-HT<sub>2</sub> no córtex (MIZOGUCHI et al., 2008) e podem ser responsáveis pelo desenvolvimento de depressão durante exposição a estresse crônico.

Os receptores 5-HT<sub>3</sub> também parecem estar envolvidos na modulação de várias funções, assim como na ansiedade/ depressão e na dor (COSTALL & NAYLOR, 2004). O sistema

serotoninérgico pode ter papel crucial na modulação do ritmo circadiano. O núcleo supraquiasmático recebe projeções densas de neurônios serotoninérgicos da rafe (JACOBS & AZMITIA, 1992). Desta forma, parece que o sistema serotoninérgico pode promover modulação inibitória do sistema circadiano por ativação do núcleo supraquiasmático pela luz (VAN DEN POL & DUDEK, 1993). Estudo de Sleight e colaboradores (1995) sugere que ocorre *down-regulation* dos receptores 5-HT<sub>7</sub> localizados no hipotálamo em resposta ao tratamento com fluoxetina, indicando o papel destes receptores no mecanismo de ação das drogas antidepressivas e na regulação do ritmo circadiano controlado pelo núcleo supraquiasmático (MULLINS et al., 1999).

Outros achados relacionados à depressão foram apresentados em estudos clínicos que revelaram que os transtornos depressivos estão associados a dessincronização do ritmo circadiano (GOODWIN et al., 1982; HALLONQUIST et al., 1986). Esta observação levou à idéia de que o restabelecimento do ritmo circadiano normal pode ter potencial antidepressivo (WEHR & WIRZ-JUSTICE, 1982; BOIVIN, 2000; WIRZ-JUSTICE, 2006). De fato, a depressão está associada a diferentes distúrbios de ritmos endógenos tais como: alterações no ciclo sono-vigília e na secreção hormonal particularmente do eixo hipotálamo-hipófise-adrenal (GRAEFF & BRANDÃO, 1993; KAPLAN et al., 1994; TALBOTT et al., 1992).

Alteração no hipocampo pode estar relacionada a achados consistentes em pacientes com depressão que mostram nível elevado do hormônio do estresse, o cortisol, que pode causar prejuízo na neuroplasticidade e resistência celular (MANJI et al., 2003), resultando na diminuição de BDNF que está envolvido na neurogênese (TAPIA-ARANCIBIA et al., 2004). Estudos clínicos e pré-clínicos sugerem que a desregulação no BDNF ocorre sob condições de estresse crônico e depressão. Em modelos animais, a imobilização aguda e crônica e administração aguda e crônica de estímulo doloroso resultaram na diminuição da expressão de BDNF (DURIC & McCARSON, 2005). Com essas informações, surge a hipótese neurotrófica para a patogênese da depressão maior. Neste modelo, estresse e vulnerabilidade genética elevam os glicocorticóides esteróides e alteram a plasticidade celular via *down-regulation* dos fatores de crescimento e sensibilidade dos receptores. A redução no BDNF tem impacto negativo nos processos funcionais e estruturais do sistema límbico, especialmente no hipocampo (DUMAN & MONTEGGIA, 2006).

O tratamento crônico com inibidores da recaptação de monoaminas aumenta a ativação do AMP cíclico, que tem como resultado final o aumento da síntese de BDNF (DUMAN et al, 1997). O efeito do aumento dos níveis de monoaminas (dopamina, serotonina e noradrenalina) no BDNF e fatores de crescimento pode ser o mecanismo que produz a resposta antidepressiva. Um estudo com dez pacientes, que foram tratados por 12 semanas com um inibidor duplo da recaptação, mostrou que houve diminuição dos sintomas depressivos e aumento dos níveis séricos de BDNF quando comparado ao grupo controle (AYDEMIR et al., 2005). A resposta terapêutica dos antidepressivos também pode estar associada ao restabelecimento da atividade cortical. No estudo de Mayberg e outros (2000), após 6 semanas de tratamento, os pacientes apresentaram diminuição na atividade límbica e aumento da atividade do córtex pré-frontal.

Complementando a hipótese neurotrófica da depressão maior, encontra-se a teoria monoaminérgica, que postula que a depressão está associada a níveis diminuídos de monoaminas, particularmente serotonina e noradrenalina. Um estudo recente de imagem de pacientes com depressão não tratada mostrou atividade elevada da enzima monoaminoxidase A (MAO-A), que metaboliza de forma não específica as monoaminas. A diminuição a longo prazo das monoaminas estaria relacionada com a atividade global da MAO-A resultando na expressão da doença depressiva (LU et al., 2005).

#### **1.4 Antidepressivos tricíclicos**

Os antidepressivos tricíclicos (ADT) estão em uso há meio século e a sua descoberta veio reduzir enormemente a utilização da eletroconvulsoterapia. Muitos ADT têm mais potência para inibir a recaptação de noradrenalina do que a recaptação de serotonina. No caso da doxepina, da amitriptilina e da nortriptilina, eles também inibem a recaptação de glicina, bloqueando o transportador de glicina 1b e o transportador de glicina 2a em nível semelhante (NUNES et al., 2000). Os ADT em graus variados, também são bloqueadores potentes de receptores histaminérgicos  $H_1$ , serotoninérgicos  $5-HT_2$ , colinérgicos muscarínicos e adrenérgicos  $\alpha-1$  (RICHELSON & NELSON, 1984).

Embora a eficácia geral para o tratamento da depressão seja equivalente à dos inibidores seletivos da recaptação de serotonina (ISRS), os ADT tendem a ter mais efeitos colaterais e, devido à sua capacidade de bloquear os receptores mencionados acima, assim como os canais de

sódio (PANCRAZIO et al., 1998) e de potássio (CASIS & SANCHEZ-CHAPULA, 1998), podem ser arritmogênicos e epileptogênicos quando consumidos em quantidades supra-terapêuticas. Desta forma, os ADT têm sido menos utilizados como agentes de primeira linha no tratamento da depressão (PETERSEN et al., 2002). Todavia, os ADT ainda são usados em pacientes com depressão resistente aos ISRS ou a inibidores da monoaminoxidase ou na depressão resistente a diversos antidepressivos (NIERENBERG et al., 2003), assim como podem ser usados como adjuntos para potencialização de efeitos dos ISRS em doentes resistentes aos ISRS (EISEN, 1989).

Nelson e colaboradores (1991) demonstraram que a desipramina, ADT predominantemente noradrenérgico, potencializa os ISRS provavelmente por acelerar o início da resposta clínica. Além disso, dados do Danish University Antidepressant Group (1986) também indicam que a clomipramina pode ser mais efetiva do que o citalopram no tratamento da depressão melancólica ou no tratamento de pacientes depressivos com certas condições médicas co-mórbidas.

Dados da literatura mostram que os ADT parecem ser mais efetivos para tratar dores neuropáticas do que os ISRS, talvez devido a sua capacidade de inibir a recaptção de serotonina e noradrenalina e de bloquear os canais de sódio e de potássio (SINDRUP & JENSEN, 1999; O'MALLEY et al., 1999). Além disso, a nortriptilina mostrou-se eficaz no tratamento da depressão com uso concomitante de supressor hormonal em paciente sem resposta ao tratamento com fluoxetina 20 mg/dia por 8 semanas (YUKIZAKI et al., 2007).

Mais de 120 estudos tentaram demonstrar a associação entre os níveis sanguíneos dos antidepressivos tricíclicos e a resposta terapêutica. Em 1971, Asberg e colaboradores sugeriram a existência de uma faixa de concentração sanguínea ótima para a nortriptilina (ASBERG et al., 1971). O estudo de Ribeiro e colaboradores (2000) apresentou uma associação do tipo curvilíneo bifásico para o ADT nortriptilina. Essas associações entre as concentrações sanguíneas e os efeitos terapêuticos das drogas utilizadas na psiquiatria podem ser do tipo linear ou sigmóide, curvilíneo bifásico, ou inexistente (De OLIVEIRA et al., 1990). O tipo linear ou sigmóide indica que a elevação das concentrações sanguíneas aumenta proporcionalmente a eficácia da droga. No entanto, doses excessivas além de não permitir o aumento suplementar de eficácia, pode envolver riscos de toxicidade. Um exemplo desse tipo de associação é encontrado em estudos com o ADT imipramina.



De Oliveira e colaboradores (1989) realizaram uma revisão de literatura onde encontraram 20 estudos envolvendo a nortriptilina, nove dos quais não apresentaram qualquer associação entre concentração e efeito clínico, entretanto, dez trabalhos demonstraram haver esse tipo de associação. Além disso, este achado foi confirmado experimentalmente através de um modelo animal (De OLIVEIRA et al., 1990).

A associação entre concentrações plasmáticas versus efeito terapêutico não é clara no que diz respeito a amitriptilina, clomipramina e desipramina, para as quais os resultados são altamente contraditórios de um autor para outro (De OLIVEIRA et al., 1989).

O presente estudo utilizou os ADT nortriptilina e desipramina, ambos antidepressivos tricíclicos, com o objetivo de verificar a hipótese do fenômeno da “janela terapêutica”. Partimos do pressuposto que se a nortriptilina deixa de atuar em doses e concentrações elevadas, o mesmo deveria ocorrer com a expressão de c-Fos em áreas do cérebro importantes para a ação antidepressiva desse ADT. Com relação à desipramina, como os dados são contraditórios, pretendeu-se verificar a existência da “janela terapêutica” e relacioná-la com o número de núcleos imunorreativos a c-Fos.

### **1.5 Expressão de c-Fos e depressão**

A proteína c-Fos é o produto do gene *c-fos* que está envolvido na regulação da transcrição gênica. A família do gene Fos consiste de 4 membros: FOS, FOSB, FOSL1 e FOSL2. Estes genes codificam um zíper de leucina que pode dimerizar com proteínas de um outro gene imediato, Jun, formando um fator de transcrição heterodimérico, complexo AP-1, que regula a expressão de genes de resposta tardia. Desta forma, a proteína c-Fos pode estimular ou reprimir a transcrição, dependendo com que membro da família Jun forma o complexo (MORGAN, 1990).

A relação precisa entre a expressão de c-Fos e a transcrição de produtos de genes tardios permanece incerta para muitos sistemas neuronais. Embora muitos neurônios sejam conhecidos por expressar c-Fos somente após ativação sináptica, o RNAm ou a proteína c-Fos do gene *c-fos* podem ser usados como marcadores de ativação neuronal no cérebro (SAGAR et al., 1988).

Desta forma, a proteína c-Fos é especialmente útil, porque é rapidamente detectada por anticorpos diretamente contra c-Fos. Este procedimento imunohistoquímico permitiu

investigações para determinar quais neurônios são ativados no cérebro em resposta a estímulos específicos (HOFFMAN et al., 1993).

No sistema nervoso de mamíferos, a indução de um gene de ação imediata é o primeiro sinal de resposta genômica a um estímulo (SHENG & GREENBERG, 1990). Os mais conhecidos dos genes de ação imediata são os fatores de transcrição ou proto-oncogenes, dentre eles o *c-fos* (BECKMANN & WILCE, 1997). Uma variedade de estímulos pode induzir a expressão do proto-oncogene *c-fos* e da proteína Fos, incluindo estresse, dor, luz, odores, dano tecidual e drogas. Este gene é rápida e transitoriamente ativado em resposta ao mecanismo do receptor que resulta em aumento intracelular de cálcio e/ou AMPc (MORGAN & CURRAN, 1991). A indução de genes de ação imediata pode ser demonstrada em células ou regiões de secções teciduais onde há o RNAm ou proteína, através de métodos de hibridização *in situ*, histoquímica ou imunohistoquímica, respectivamente. Essas técnicas têm sido extensamente empregadas no estudo do cérebro de animais, e tem auxiliado no mapeamento de regiões cerebrais específicas, sendo útil para análise neuroanatômica de diversos estados funcionais (HERRERA & ROBERTSON, 1996; HOFFMAN & LYO, 2002; KACZMAREK & ROBERTSON, 2002).

Alguns autores mostraram que diferentes classes de antidepressivos são capazes de induzir a expressão da proteína c-Fos (produto do gene *c-fos*) em diferentes áreas do cérebro de ratos (BECK, 1995; MORELI et al., 1999). Os antidepressivos também modificaram a expressão de *c-fos* induzida por situações estressantes, como o medo condicionado (CAMPEAU et al., 1991) ou nado forçado (DUNCAN et al., 1996). Assim, é possível que a alteração da expressão de c-Fos reflita diferenças na atividade neurotransmissora que ocorre na depressão bem como no uso de antidepressivos. A identificação das áreas de ativação específicas do sistema nervoso central provocadas por antidepressivos com mecanismos de ação diferentes pode constituir importante passo para a explicação desses mecanismos.

O estudo de Morinobu e colaboradores (1997) avaliou o perfil da expressão de c-Fos após administração aguda e crônica de antidepressivos em ratos submetidos a estresse de contenção. Esse trabalho demonstrou que aplicações crônicas (6 a 9 dias), de eletroconvulsoterapia, diminuiu significativamente a indução de c-Fos em ratos submetidos ao estresse de contenção, o que não ocorre após administração aguda (1 a 3 dias). O mesmo acontece com os antidepressivos tranilcipromina, imipramina, desipramina e sertralina. Segundo Morinobu, a ocorrência de *down-*

*regulation* de c-Fos induzida pelo estresse de contenção após uso de antidepressivos com diferentes mecanismos de ação sugere que esse efeito pode decorrer da ação pós-sináptica comum aos tratamentos antidepressivos (MORINOBU et al., 1997).

Tratamento crônico e agudo com fluoxetina em ratos estressados e não-estressados induz distintos padrões regionais de expressão de c-Fos (LINO-de-OLIVEIRA et al., 2001). O estresse incontrollável é capaz de induzir expressão de *c-fos* em múltiplas áreas cerebrais, sendo que a substância cinzenta periaquedutal (PAG) apresentou expressão da proteína c-Fos após nado forçado (BELLCHAMBERS et al., 1998). Tratamento crônico com imipramina e desipramina induziu expressão de c-Fos no núcleo central da amígdala e no núcleo dorsolateral da estria terminal (DUNCAN et al., 1996). Houve um aumento da imunorreatividade para Fos devido ao nado forçado nas regiões corticais límbicas, incluindo o córtex prefrontal medial, córtex orbital ventrolateral e córtex cingulado. Também houve aumento da expressão de c-Fos em áreas como núcleo paraventricular do hipotálamo, habênula lateral, núcleo paraventricular do tálamo, núcleo medial da amígdala e núcleo septal lateral (DUNCAN et al., 1996).

De acordo com os achados da literatura, observa-se que a indução da expressão de c-Fos pode ser utilizada como marcador da atividade pós-sináptica com o uso de antidepressivos, justificando a condução de estudos experimentais acerca das ações agudas e crônicas dessas drogas. A identificação das áreas de ativação específicas no SNC, provocadas por antidepressivos com mecanismos de ação diferentes, pode se constituir em importante passo para a localização de áreas relevantes para a ação dessas medicações e contribuir com dados adicionais para a compreensão dos seus mecanismos de ação.

## **1.6 Teste do Nado Forçado Modificado - Um modelo de identificação de drogas com ação antidepressiva**

O estresse parece ser um dos principais fatores ambientais que predisõem o indivíduo à depressão. Em cerca de 60% dos casos, os episódios depressivos são precedidos pela ocorrência de fatores estressantes, principalmente de origem psicossocial (POST, 1992). Além disso, a conhecida influência de fatores genéticos no desenvolvimento da depressão poderia ser decorrente do aumento da sensibilidade a eventos estressantes (KENDLER et al., 1995). A maior

parte dos modelos animais de depressão, como o nado forçado e o desamparo aprendido, avalia o desenvolvimento de alterações comportamentais e fisiológicas em resposta à pré-exposição a evento estressante inescapável.

Poucos, se algum, modelos animais mimetizam completamente a depressão humana. Entretanto, o teste do nado forçado é um modelo de teste comportamental para roedores muito usado pela indústria farmacêutica para verificar a atividade de antidepressivos (PORSOLT et al., 1978; LUCKI, 1997). Tipicamente, os ratos são colocados em um cilindro contendo água por um período de 15min (sessão pré-teste), e após 24 horas o procedimento é repetido, mas com duração de 5min (sessão teste). Os roedores mostram uma característica comportamental de grande tempo de imobilidade, apresentando somente movimentos necessários para manter a cabeça para fora da água durante o tempo da sessão teste. Quando drogas antidepressivas são administradas entre o pré-teste e a sessão teste, dentro das 24 horas, o comportamento de imobilidade é seletivamente diminuído na sessão teste. Entretanto, dependendo da classe estrutural dos antidepressivos, os ratos apresentam aumento na atividade do nado ou escalada, que seria uma tentativa de escapar da água. Tipicamente, antidepressivos tricíclicos e drogas que atuam na transmissão noradrenérgica aumentam o comportamento de escalada, enquanto os inibidores da recaptção de serotonina (ISRS) aumentam o tempo do nado comparado ao grupo controle (CRYAN & LUCKI, 2000; CRYAN et al., 2005; DETKE et al., 1995). O teste do nado forçado originalmente descrito por Porsolt e colaboradores (1978) mensurava somente a imobilidade, o que não permitiria a diferenciação de drogas com ação serotoninérgica das de ação noradrenérgica. O teste do nado forçado modificado, além de permitir o estudo dos efeitos dos ISRS em ratos, é útil em distinguir que grupo de compostos age via inibição da recaptção de noradrenalina.

Nosso grupo fez modificações no teste do nado forçado, as quais consistiram no aumento da profundidade da água que passou de 15cm para 20cm, resultando em maior flutuação do animal e impedindo que estes se apoiassem com as patas traseiras no fundo do cilindro. O comportamento mensurado não foi somente a imobilidade, mas também os de comportamentos ativos (escalada, nado, mergulho) assemelhando-se aos estudos de outros autores (DETKE & LUCKI, 1996; DETKE et al., 1995). Assim, o teste do nado forçado modificado é muito sensível a uma grande variedade de tratamentos antidepressivos, os quais reduzem significativamente o período de imobilidade. Uma das maiores vantagens do teste do nado forçado modificado é a

rapidez para verificar a ação dos antidepressivos, porque ele é sensível aos efeitos de curta duração desses fármacos.

Dessa forma, decidimos neste estudo verificar o perfil da expressão de c-Fos no cérebro de ratos sob tratamento agudo e crônico com antidepressivos tricíclicos (nortriptilina e desipramina), especialmente no que diz respeito ao fenômeno da “janela terapêutica” e, comparar as respostas comportamentais (imobilidade, nado e escalada) no teste do nado forçado em ratos sob tratamento agudo com nortriptilina e desipramina. Os dados do presente trabalho poderão constituir-se em importante passo para a localização de áreas relevantes para a ação destas drogas antidepressivas, assim como contribuir com dados adicionais para a compreensão dos seus mecanismos de ação.

## 2 HIPÓTESES

**Hipótese 1:** ratos tratados agudamente com nortriptilina e desipramina apresentam diferença no perfil de expressão cerebral de c-Fos em relação aos controles tratados com salina.

**Hipótese Nula:** ratos tratados agudamente com nortriptilina e desipramina não apresentam diferença no perfil de expressão cerebral de c-Fos em relação aos controles tratados com salina.

**Hipótese 2:** o padrão de expressão de c-Fos em cérebros de ratos induzido pelo tratamento agudo com diferentes doses de nortriptilina é diferente daquele induzido pelo tratamento agudo com desipramina.

**Hipótese Nula:** o padrão de expressão de c-Fos em cérebros de ratos induzido pelo tratamento agudo com diferentes doses de nortriptilina não é diferente daquele induzido pelo tratamento agudo com desipramina.

**Hipótese 3:** o padrão de expressão de c-Fos em cérebro de ratos pode ser usado para identificar a ocorrência de “janela terapêutica” para drogas antidepressivas.

**Hipótese Nula:** o padrão de expressão de c-Fos em cérebro de ratos não pode ser usado para identificar a ocorrência de “janela terapêutica” para drogas antidepressivas.

**Hipótese 4:** o tratamento agudo com nortriptilina e desipramina modifica o padrão de comportamento no teste do nado forçado e há diferença no padrão de comportamento induzido por desipramina e nortriptilina.

**Hipótese Nula:** o tratamento agudo com nortriptilina e desipramina não modifica o padrão de comportamento no teste do nado forçado e não há diferença no padrão de comportamento induzido por desipramina e nortriptilina.

**Hipótese 5:** Tratamento crônico com nortriptilina e desipramina modifica o perfil de expressão cerebral de c-Fos em relação aos controles tratados com salina.

**Hipótese Nula:** Tratamento crônico com nortriptilina e desipramina não modifica o perfil de expressão cerebral de c-Fos em relação aos controles tratados com salina.

### 3 OBJETIVOS

**Objetivo geral 1:** Analisar os perfis da expressão de c-Fos no cérebro de ratos sob tratamento agudo com nortriptilina e desipramina, especialmente no que diz respeito ao fenômeno da janela terapêutica.

**Objetivos específicos:**

- 1A. Analisar o perfil da expressão de c-Fos no cérebro de ratos sob tratamento agudo com diferentes doses de nortriptilina.
- 1B. Analisar o perfil da expressão de c-Fos no cérebro de ratos sob tratamento agudo com diferentes doses de desipramina.
- 1C. Comparar os perfis da expressão de c-Fos no tratamento agudo com desipramina e nortriptilina verificando ocorrência de “janela terapêutica”.

**Objetivo geral 2:** Estudar o efeito do tratamento agudo com antidepressivos tricíclicos no comportamento de ratos submetidos ao Teste do Nado Forçado.

**Objetivos específicos:**

- 2A. Comparar as respostas comportamentais (imobilidade, nado e escalada) no teste do nado forçado em ratos sob tratamento agudo com nortriptilina.
- 2B. Comparar as respostas comportamentais (imobilidade, nado e escalada) no teste do nado forçado em ratos sob tratamento agudo com desipramina.
- 2C. Investigar se o padrão de resposta observado em ratos submetidos ao teste do nado forçado pode confirmar a ocorrência de janela terapêutica para o antidepressivo nortriptilina.

**Objetivo geral 3:** Analisar o perfil da expressão de c-Fos no cérebro de ratos sob tratamento crônico com nortriptilina e desipramina e verificar a ocorrência do fenômeno da janela terapêutica.

**Objetivos específicos:**

- 1A. Verificar o perfil da expressão de c-Fos no cérebro de ratos sob tratamento crônico com diferentes doses de nortriptilina.
- 1B. Verificar o perfil da expressão de c-Fos no cérebro de ratos sob tratamento crônico com diferentes doses de desipramina.
- 1C. Comparar o padrão da expressão de c-Fos no tratamento crônico com desipramina e nortriptilina verificando ocorrência de “janela terapêutica”.

## 4 MATERIAL E MÉTODOS

### 4.1 Animais

Foram utilizados ratos adultos Wistar machos, provenientes do biotério do Laboratório de Neurociências do ICS-UFBA, pesando  $250 \pm 30$ g, mantidos sob condições controladas de luminosidade (luzes ligadas de 6 às 19:00 horas) e temperatura ( $23 \text{ }^\circ\text{C} \pm 2^\circ\text{C}$ ) e com acesso a ração (Nuvital Nutrientes, Curitiba) e água *ad libitum*. Os animais eram manipulados nos dias prévios aos experimentos a fim de habituá-los aos procedimentos experimentais. Os protocolos experimentais foram conduzidos de acordo com as regras sugeridas pelo *National Institute of Health* (USA).

### 4.2 Drogas utilizadas

Para o estudo do efeito da administração aguda de nortriptilina e desipramina na expressão de c-Fos e teste do nado forçado foram utilizadas as doses de 5, 10, 25 e 50mg/kg; i.p. No estudo do efeito da administração crônica destes antidepressivos foram utilizadas as doses de 5, 10, 15 e 20mg/kg, i.p durante 14 dias. Os grupos controles receberam soro fisiológico a 0,9%, tanto no tratamento agudo quanto no crônico.

### 4.3 Grupos experimentais

#### **Estudo do perfil da expressão de c-Fos no cérebro de ratos sob tratamento agudo com nortriptilina e desipramina**

Neste estudo, utilizamos uma média de 50 animais sendo  $5 \pm 1$  ratos para cada dose das drogas e 10 animais no grupo controle. Os ratos receberam nortriptilina e desipramina nas doses de 5, 10, 25 ou 50mg/kg, i.p ou salina 0,9% 2 horas antes dos procedimentos para remoção do cérebro. Os animais foram anestesiados com tiopental sódico (40 mg/kg) e submetidos a perfusão transcardíaca com tampão fosfato de sódio seguido de paraformaldeído a 4% dissolvido no mesmo tampão e os cérebros foram removidos para análise histoquímica para detecção da proteína c-Fos através do método Avidina-biotina peroxidase.



### Estudo do efeito do tratamento agudo com antidepressivos tricíclicos no comportamento de ratos submetidos ao teste do nado forçado

Utilizamos uma média de 10 animais para cada dose testada, totalizando 90 animais. Os ratos foram submetidos à sessão pré-teste e vinte e quatro horas depois foram submetidos à sessão teste. Duas horas antes da sessão teste, os animais receberam a administração de nortriptilina ou desipramina nas doses de 5, 10, 25 e 50mg/kg, i.p ou salina 0,9%. A sessão teste foi gravada por 5min para posterior análise dos comportamentos.

### Estudo do perfil da expressão de c-Fos no cérebro de ratos sob tratamento crônico com nortriptilina e desipramina

Neste estudo, utilizamos uma média de 50 animais com  $7 \pm 3$  ratos para cada dose dos tratamentos. Os ratos receberam dose única diária de nortriptilina, desipramina (5, 10, 15 ou 20mg/kg, i.p.) ou salina 0,9% via intraperitoneal durante 14 dias. No 14º dia, duas horas após a administração das drogas ou salina, os animais foram anestesiados com tiopental sérico (40mg/kg) e submetidos a perfusão transcardíaca com tampão fosfato de sódio seguido de paraformaldeído a 4% dissolvido no mesmo tampão. Os cérebros foram removidos para análise histoquímica para detecção da proteína c-Fos através do método biotina- avidina peroxidase.

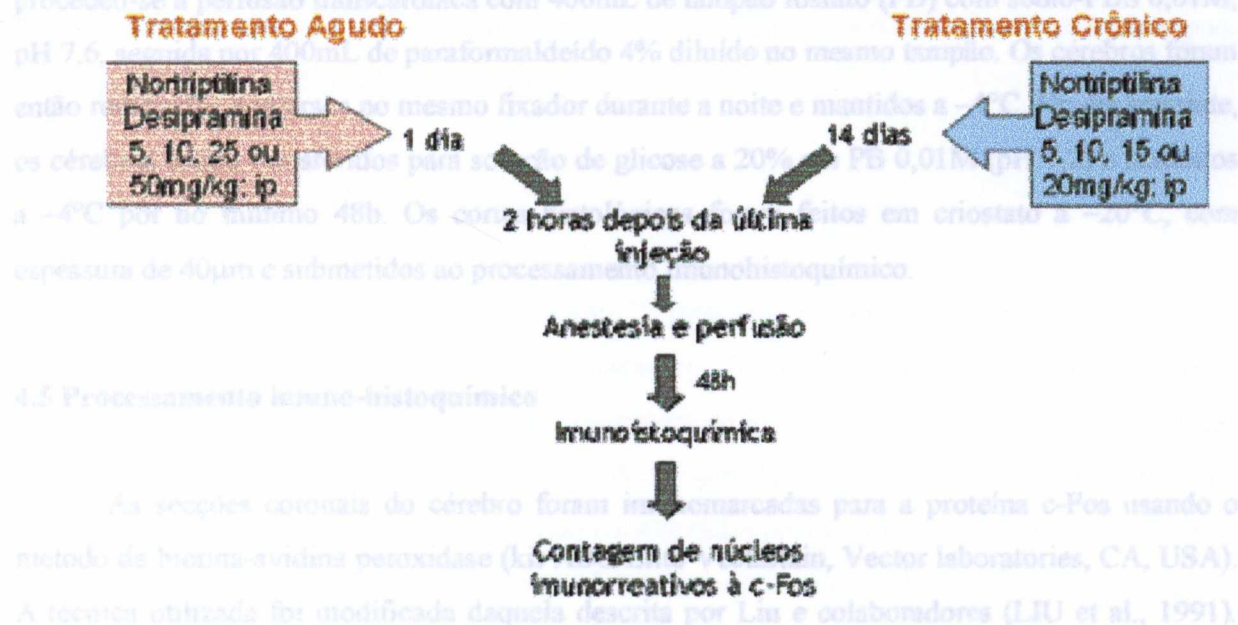


Figura 2 - Protocolos para estudo do perfil da expressão de c-Fos no cérebro de ratos sob tratamento agudo e crônico com nortriptilina e desipramina.

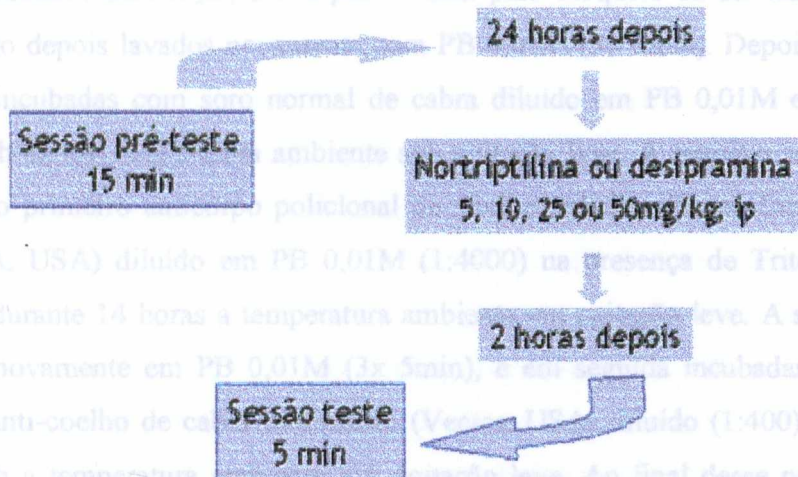


Figura 3 - Protocolo para estudo do comportamento de ratos sob tratamento agudo com nortriptilina e desipramina no teste do nado forçado.

#### 4.4 Procedimentos para remoção do cérebro e preparo dos mesmos para processamento imuno-histoquímico

Duas horas após a administração das drogas ou salina, os animais foram anestesiados com injeção intraperitoneal de 40mg/kg de pentobarbital sódico (Tionembutal, Abbott Laboratories) e procedeu-se a perfusão transcardíaca com 400mL de tampão fosfato (PB) com sódio-PBS 0,01M, pH 7,6, seguida por 400mL de paraformaldeído 4% diluído no mesmo tampão. Os cérebros foram então removidos e imersos no mesmo fixador durante a noite e mantidos a  $-4^{\circ}\text{C}$ . No dia seguinte, os cérebros foram transferidos para solução de glicose a 20% em PB 0,01M (pH 7,2) e mantidos a  $-4^{\circ}\text{C}$  por no mínimo 48h. Os cortes histológicos foram feitos em criostato a  $-20^{\circ}\text{C}$ , com espessura de  $40\mu\text{m}$  e submetidos ao processamento imunohistoquímico.

#### 4.5 Processamento imuno-histoquímico

As secções coronais do cérebro foram imunomarcadas para a proteína c-Fos usando o método da biotina-avidina peroxidase (kit ABC Elite Vectastain, Vector laboratories, CA, USA). A técnica utilizada foi modificada daquela descrita por Liu e colaboradores (LIU et al., 1991). Inicialmente os cortes foram lavados três vezes com PB 0,01M com intervalos de 5 min entre cada lavagem (3x 5min), mantidos em agitador de Klein com agitação leve. A seguir os cortes

foram então incubados com  $H_2O_2$  a 1% por 15 min para bloqueio da atividade da peroxidase endógena, e logo depois lavados novamente com PB 0,01M (3x 5min). Depois das lavagens as secções foram incubadas com soro normal de cabra diluído em PB 0,01M e leite em pó 3% (Molico) por 1 hora em temperatura ambiente sob agitação leve. A seguir o soro foi aspirado e acrescentou-se o primeiro anticorpo policlonal de coelho anti-Fos (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA) diluído em PB 0,01M (1:4000) na presença de Triton-X 100 (0,3%) permanecendo durante 14 horas a temperatura ambiente em agitação leve. A seguir, as secções foram lavadas novamente em PB 0,01M (3x 5min), e em seguida incubadas com o segundo anticorpo IgG anti-coelho de cabra biotilado (Vector, USA) diluído (1:400) em PB 0,01M e leite 3%, por 1h a temperatura ambiente sob agitação leve. Ao final desse período as secções foram lavadas em PB 0,01M (3x 5min) e incubadas por 1h a temperatura ambiente com o complexo biotina-avidina peroxidase (1:200) em PB 0,01M. Após nova lavagem em PB 0,01M (3x 5min), os cortes foram incubados em uma solução de 0,02% de 3,3' diaminobenzidina-tetrahydroclorato (Sigma, MO, USA) contendo 0,08% de sulfato amoniacal de níquel e 0,0002% de  $H_2O_2$ . A seguir, as secções foram colocadas em gelatina contendo etanol a 80% e montadas em lâminas. Após secagem dos cortes em estufa (50°C), as lâminas foram imersas em xilol a 100% por 10min e cobertas com lamínula, utilizando Permount® (Fisher Scientific) para adesão. Os cérebros dos animais controles e experimentais foram processados simultaneamente para evitar possíveis variações entre os ensaios.

#### 4.6 Análise histológica

As lâminas visualizadas em microscópio tiveram suas imagens capturadas e avaliadas por um sistema de análise computadorizada (Image-Pro, Discovery – version 4.5 for Windows, Media Cybernetics, MD, USA, 2002) para contagem da expressão de c-Fos nas áreas cerebrais identificadas com base no atlas de Paxinos & Watson (1998). As células que apresentavam núcleos de coloração marrom ou negra foram consideradas positivas para imunoreatividade de c-Fos. O sistema foi calibrado para ignorar as diferenças de fundo (*background*). A contagem dos núcleos celulares imunorreativos para c-Fos foi realizada através do programa Image Pro-Plus para Windows 98/2000 versão 4.1 (MediaCybernetics, USA).

#### 4.7 Teste do nado forçado modificado

O teste do nado forçado utilizado foi modificado daquele inicialmente descrito por Porsolt e colaboradores (1978). A modificação introduzida foi em relação à profundidade da coluna d'água, que foi aumentada de 15-18cm para 23cm, resultando na impossibilidade do rato colocar as patas no fundo do recipiente permitindo que o animal flutue mais. Além disso, foi medido o tempo gasto em comportamentos ativos (escalada e nado) e não apenas o tempo de imobilidade. Assim, o cilindro de vidro apresentava 40cm de altura e 20cm de diâmetro e foi preenchido com água a altura de 23cm. Tanto a temperatura da água quanto da sala foram mantidas em (25°C) durante todo o período experimental. Inicialmente, procedeu-se à sessão pré-teste com duração de 15min, em seguida os ratos eram removidos da água, parcialmente secos com uma toalha, e colocados de volta em suas gaiolas. Vinte e quatro horas depois do pré-teste, os ratos receberam a administração das drogas ou de salina e foram expostos à mesma condição do pré-teste durante 5min (sessão experimental). A sessão experimental foi gravada com câmera filmadora para análise subsequente das respostas comportamentais. A figura 4 mostra fotografias do cilindro utilizado no experimento e dos ratos em cada comportamento típico analisado. As respostas comportamentais dos ratos foram divididas nas seguintes categorias: imobilidade (flutuar e realizar somente movimentos necessários para manter o focinho acima d'água); nado (movimentos ativos em torno do tanque ou mergulhando); escalada (movimento vigoroso das patas traseiras, colocando parte do corpo para fora da água, usualmente contra as paredes do tanque) (FRÖHLICH et al., 2008; LUCKI, 1997). Tanto a sessão pré-teste quanto a sessão teste foram realizadas entre as 11:00 e 14:00h. A água foi trocada e o cilindro lavado entre o teste de cada animal a fim de se evitar estresse dos animais a serem estudados em seguida (ABEL & BILITZKE, 1990).

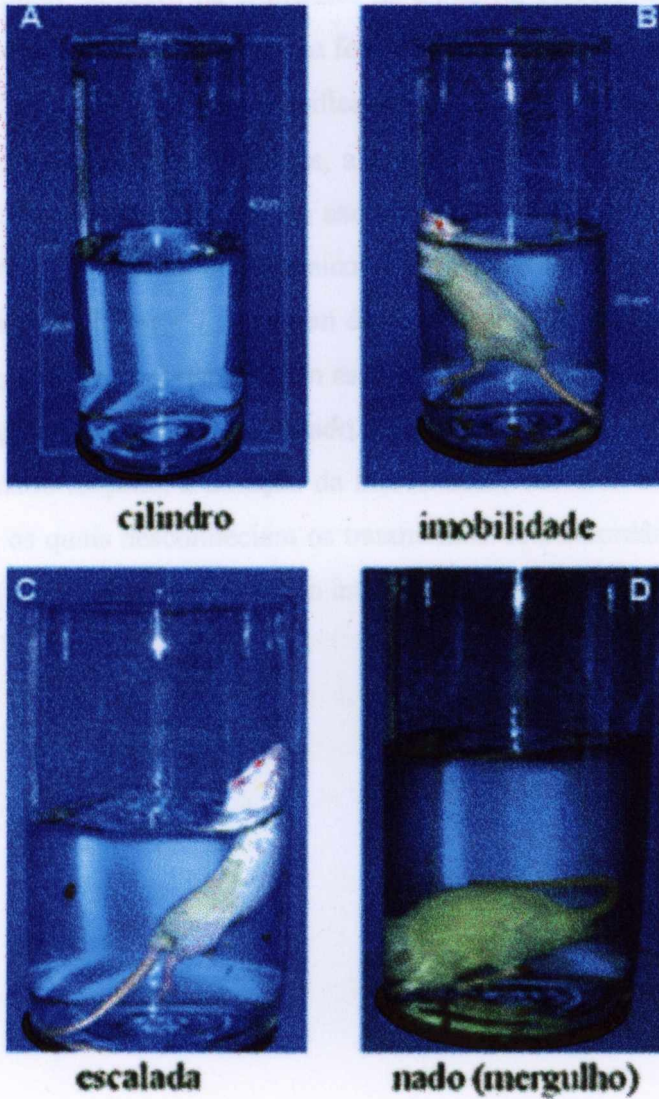


Figura 4 – Fotografias do cilindro utilizado para o nado forçado e dos ratos em cada comportamento típico analisado (A) cilindro com as medidas utilizadas (B) imobilidade, (C) escalada, (D) nado.

#### 4.8 Análise Estatística

Os dados do estudo do perfil da expressão de c-Fos no cérebro de ratos sob tratamento agudo e crônico com nortriptilina e desipramina foram submetidos à análise de variância de uma via (“one-way” ANOVA). Quando efeitos significantes eram encontrados ( $p < 0,05$ ), utilizamos o teste t de Dunnett para comparações múltiplas, a fim de avaliar as diferenças entre os grupos tratados por diferentes doses e os controles em uso de salina. O teste t de Dunnett foi idealizado para comparar diferentes grupos com um único grupo controle. A presença de associações curvilíneas bifásicas entre as doses e a contagem de células imunorreativas é esperada quando se observa a perda de significância estatística com as doses mais elevadas, com queda da contagem de c-Fos, em comparação com o grupo não tratado.

No estudo do nado forçado, a duração da imobilidade, escalada e natação foi mensurada por três observadores, os quais desconheciam os tratamentos. A concordância da análise entre os observadores foi alta (coeficiente de correlação intraclassa  $R > 0.99$ ), assim, foi feita a média do

## 5 RESULTADOS

### Expressão de c-Fos no cérebro de ratos sob tratamento agudo com nortriptilina e desipramina

A figura 5 ilustra o número de núcleos imunorreativos a c-Fos na região hipocampal CA1 (painel A) e na amígdala hipocampal-AHiPM (painel B) após administração aguda de nortriptilina ou desipramina em diferentes doses (5, 10, 25 e 50mg/kg, i.p.) ou salina (dose 0-controle). No painel A observa-se aumento significativo ( $p < 0,05$ ) na expressão de c-Fos na CA1 apenas na dose de 25mg/kg de nortriptilina. A administração de desipramina nas diferentes doses não foi estatisticamente diferente do grupo controle mesmo que tenha uma tendência à da expressão de c-Fos nesta área. Na AHiPM (painel B), a administração de desipramina induziu aumento significativo da expressão de c-Fos apenas na dose de 50mg/kg, enquanto que para a nortriptilina este aumento foi significativo somente na dose de 25mg/kg.

A figura 6 mostra fotomicrografia típica da área CA1 do hipocampo (CA1) e da amígdala hipocampal (AHiPM) com núcleos imunorreativos a c-Fos em ratos submetidos à administração aguda de nortriptilina e desipramina nas doses de 5, 10, 25 e 50mg/kg, i.p ou salina.

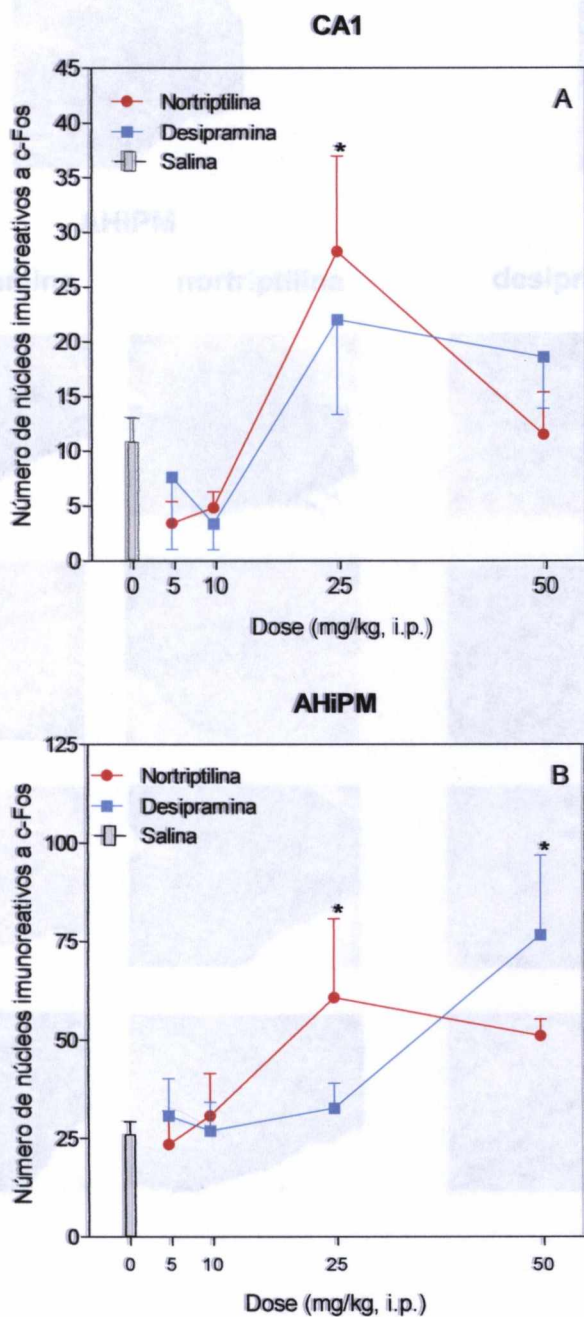


Figura 5 – Efeito do tratamento agudo com nortriptilina e desipramina (5, 10, 25 e 50mg/kg) ou salina (dose 0) na expressão c-Fos na CA1 (painel A) e AHIPM (painel B). Dados foram submetidos à one Way Anova seguido pelo post-test de Dunnett ( $p < 0,05$ ) e são expressos como média  $\pm$  SEM. Resultados da Anova para dados do painel A são:  $F_{(4,37)} = 4,524$ ;  $p = 0,005$  e para o painel B são:  $F_{(4,36)} = 3,796$ ;  $p = 0,017$ . Asteriscos indicam a diferença entre as diferentes doses da droga e controle tratado com salina (dose 0).



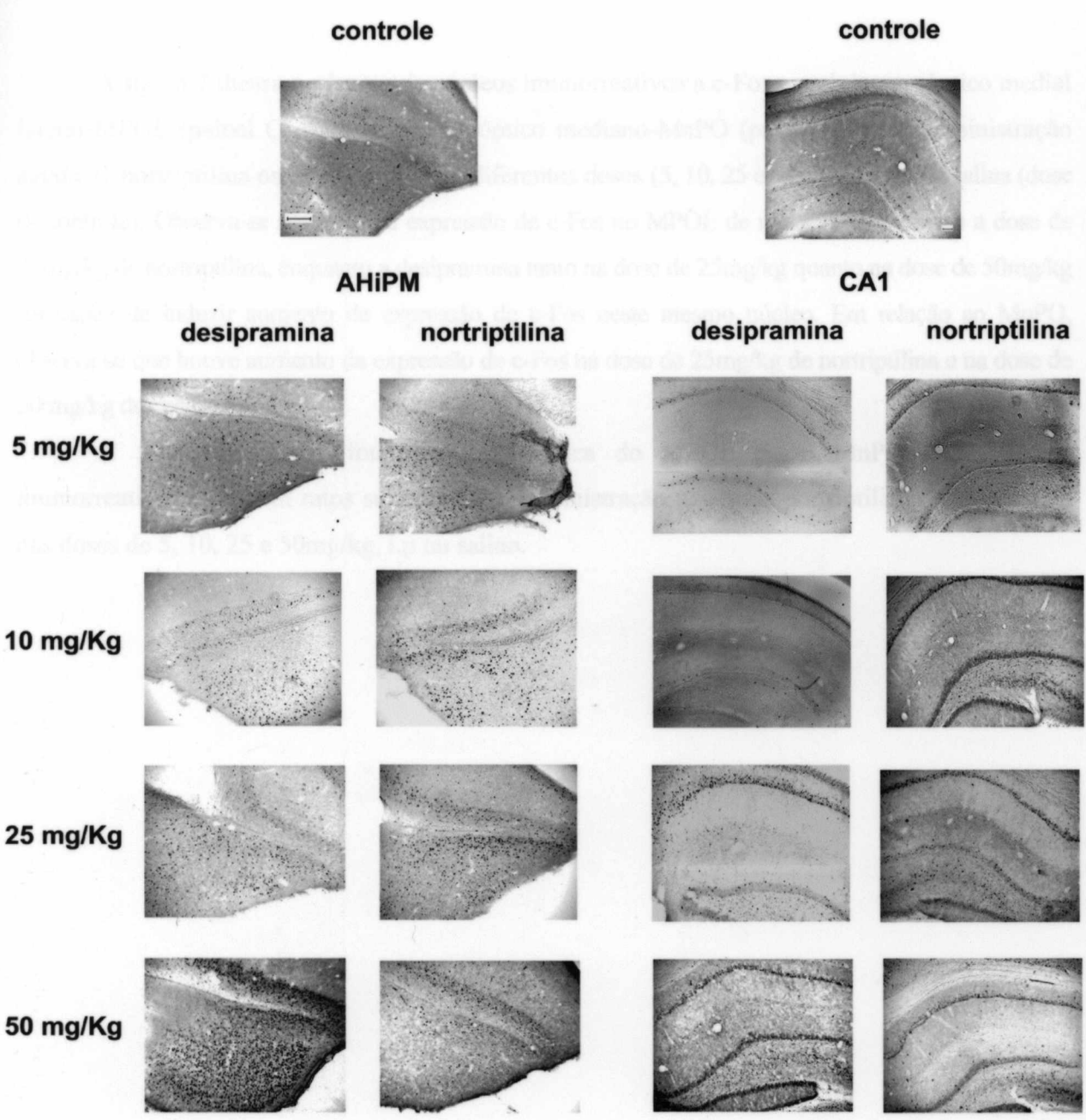


Figura 6 - Fotomicrografia típica da área CA1 do hipocampo (CA1) e na amígdala hipocampal (AHiPM) com núcleos imunorreativos a c-Fos em ratos submetidos a administração aguda de nortriptilina e desipramina nas doses (5, 10, 25 e 50mg/kg, i.p) ou salina.

A figura 7 ilustra o número de núcleos imunorreativos a c-Fos no núcleo preóptico medial lateral-MPOL (painel C) e no núcleo preóptico mediano-MnPO (painel D) após administração aguda de nortriptilina ou desipramina em diferentes doses (5, 10, 25 e 50mg/kg, i.p.) ou salina (dose 0- controle). Observa-se aumento da expressão de c-Fos no MPOL de ratos que receberam a dose de 25mg/kg de nortriptilina, enquanto a desipramina tanto na dose de 25mg/kg quanto na dose de 50mg/kg foi capaz de induzir aumento da expressão de c-Fos neste mesmo núcleo. Em relação ao MnPO, observa-se que houve aumento da expressão de c-Fos na dose de 25mg/kg de nortriptilina e na dose de 50 mg/kg de desipramina.

A figura 8 mostra fotomicrografia típica do MPOL e do MnPO com núcleos imunorreativos c-Fos em ratos submetidos à administração aguda de nortriptilina e desipramina nas doses de 5, 10, 25 e 50mg/kg, i.p ou salina.

Controle

Controle

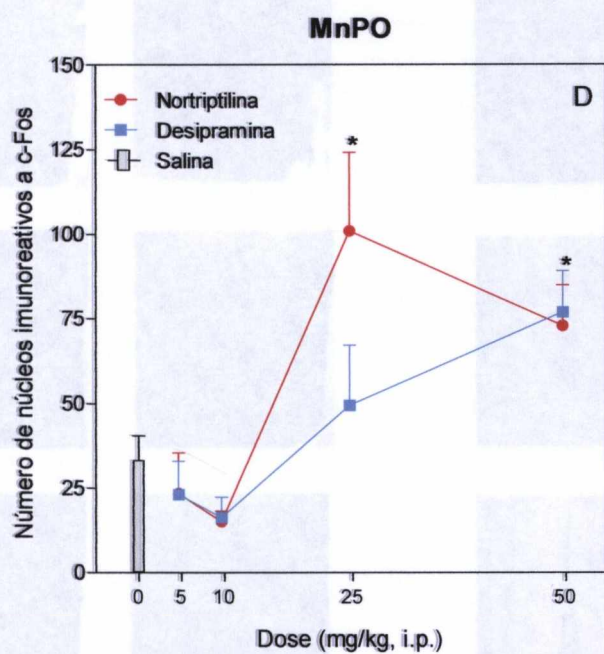
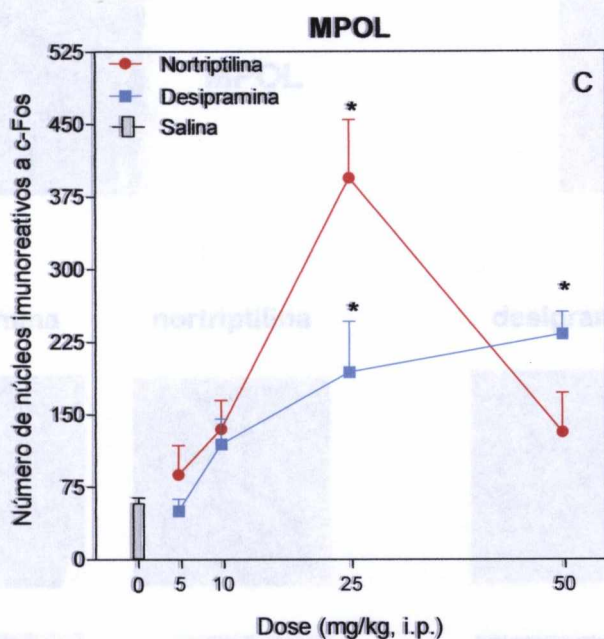


Figura 7 – Efeito do tratamento agudo com nortriptilina e desipramina (5, 10, 25 e 50mg/kg) ou salina (dose 0) na expressão c-Fos no MPOL (painel C) e MnPO (painel D). Dados foram submetidos à one Way Anova seguido pelo post-test de Dunnett ( $p < 0,05$ ) e são expressos como média  $\pm$  SEM. Resultados da Anova para dados do painel C são:  $F_{(4,37)} = 26,100$ ;  $p = 0,0001$  e para o painel D são:  $F_{(4,34)} = 7,541$ ;  $p = 0,0001$ . Asteriscos indicam a diferença entre as diferentes doses da droga e controle tratado com salina (dose 0).

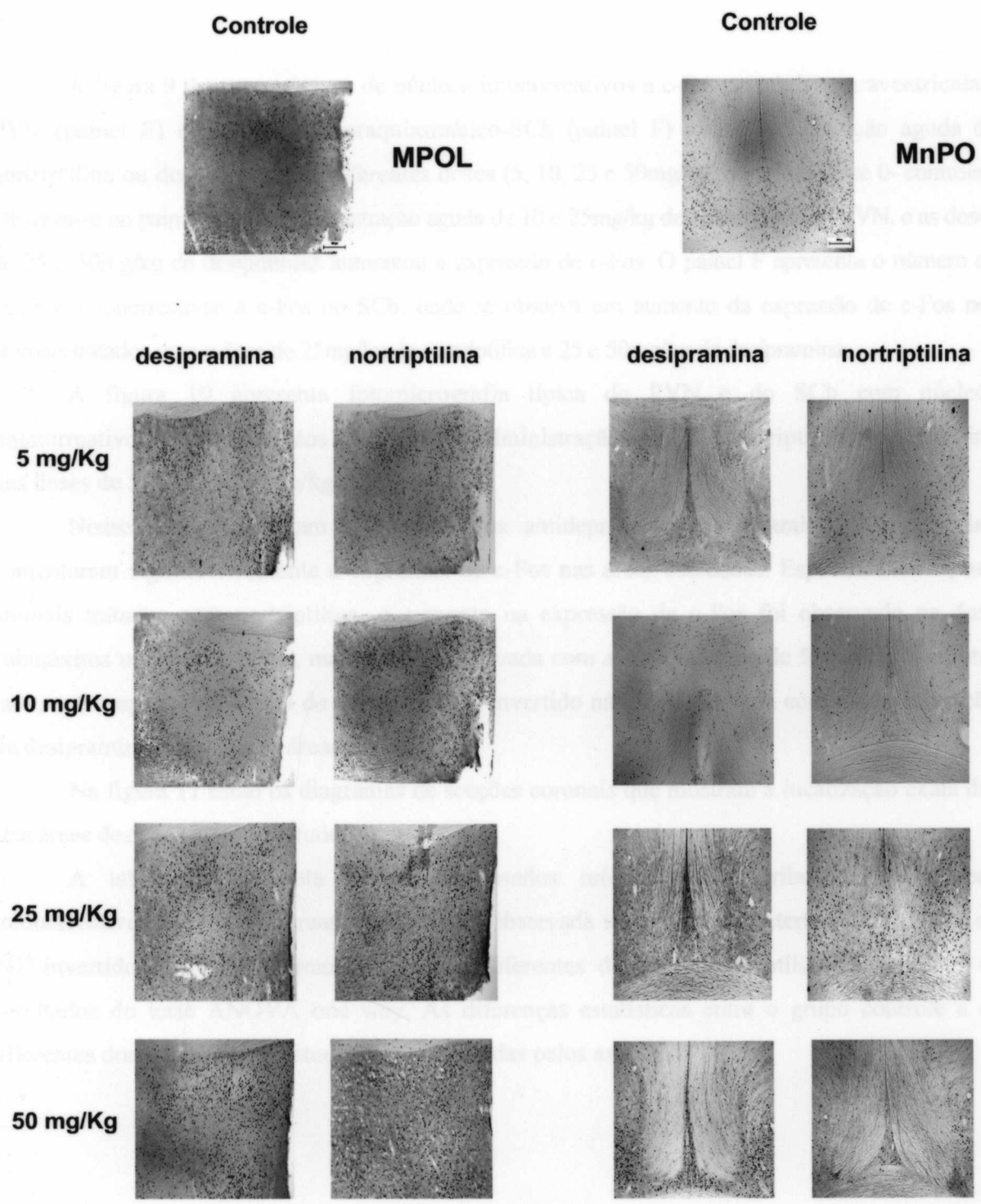


Figura 8 - Fotomicrografia típica do MPOL e do MnPO com núcleos imunorreativos c-Fos em ratos submetidos a administração aguda de nortriptilina e desipramina nas doses (5, 10, 25 e 50mg/kg, i.p) ou salina.

A figura 9 ilustra o número de núcleos imunorreativos a c-Fos no núcleo paraventricular-PVN (painel E) e no núcleo supraquiasmático-SCh (painel F) após administração aguda de nortriptilina ou desipramina em diferentes doses (5, 10, 25 e 50mg/kg) ou salina (dose 0- controle). Observa-se no painel E que a administração aguda de 10 e 25mg/kg de nortriptilina no PVN, e as doses de 25 e 50mg/kg de desipramina aumentou a expressão de c-Fos. O painel F apresenta o número de núcleos imunorreativos a c-Fos no SCh, onde se observa um aumento da expressão de c-Fos nos animais tratados com a dose de 25mg/kg de nortriptilina e 25 e 50mg/kg de desipramina.

A figura 10 apresenta fotomicrografia típica do PVN e do SCh com núcleos imunorreativos a c-Fos em ratos submetidos à administração aguda de nortriptilina e desipramina nas doses de 5, 10, 25 e 50mg/kg, i.p ou salina.

Nossos dados mostram que ambos os antidepressivos, desipramina e nortriptilina aumentaram significativamente a expressão de c-Fos nas áreas estudadas. Especificamente, nos animais tratados com nortriptilina, o aumento na expressão de c-Fos foi observado na dose submáxima usada (25mg/kg), mas não foi observada com a dose máxima de 50mg/kg. Por outro lado, esta resposta em forma de curva em “U”-invertido não foi observada com a administração de desipramina nas mesmas áreas.

Na figura 11 estão os diagramas de secções coronais que mostram a localização exata das seis áreas destacadas neste estudo.

A tabela 1 apresenta dados condensados referentes à distribuição de núcleos imunorreativos a c-Fos em áreas onde não foi observada uma curva característica em forma de “U”-invertido nos animais tratados com as diferentes doses de nortriptilina, bem como os resultados do teste ANOVA one way. As diferenças estatísticas entre o grupo controle e as diferentes doses das drogas estudadas são indicadas pelos asteriscos.

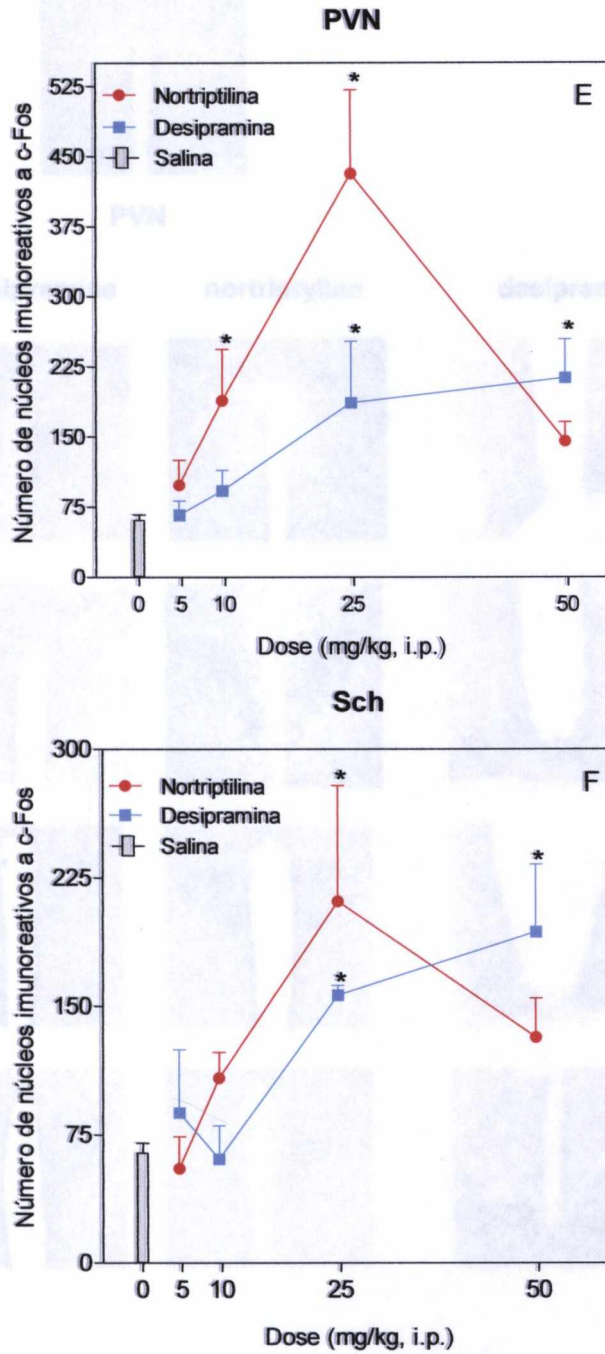


Figura 9 – Efeito do tratamento agudo com nortriptilina e desipramina (5, 10, 25 e 50mg/kg) ou salina (dose 0) na expressão c-Fos no PVN (painel E) e Sch (painel F). Dados foram submetidos à one Way Anova seguido pelo post-test de Dunnett ( $p < 0,05$ ) e são expressos como média  $\pm$  SEM. Resultados da Anova para dados do painel E são:  $F_{(4, 37)} = 18,488$ ;  $p = 0,0001$  e para o painel F são:  $F_{(4,31)} = 6,382$ ;  $p = 0,0001$ . Asteriscos indicam a diferença entre as diferentes doses da droga e controle tratado com salina (dose 0).

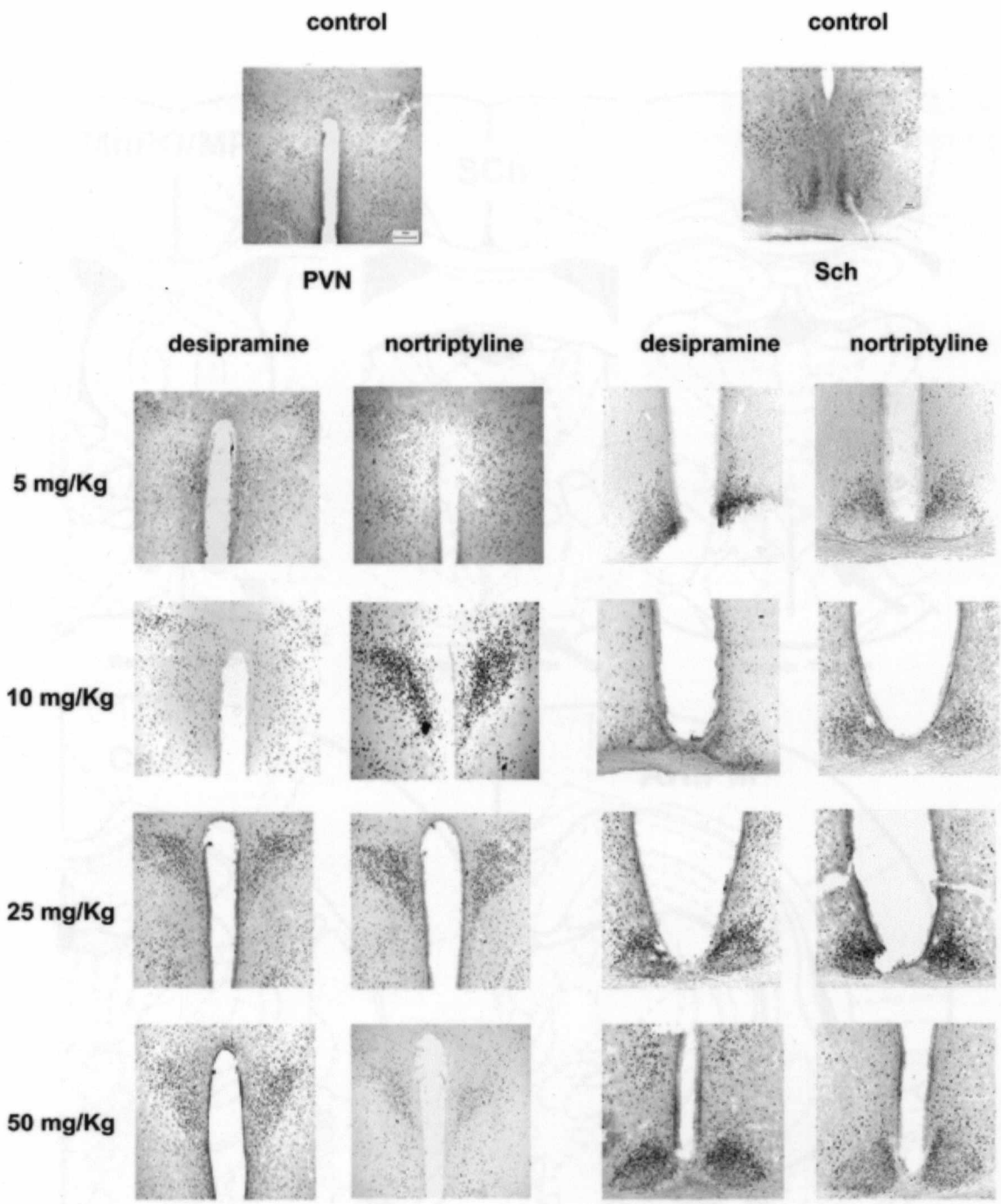
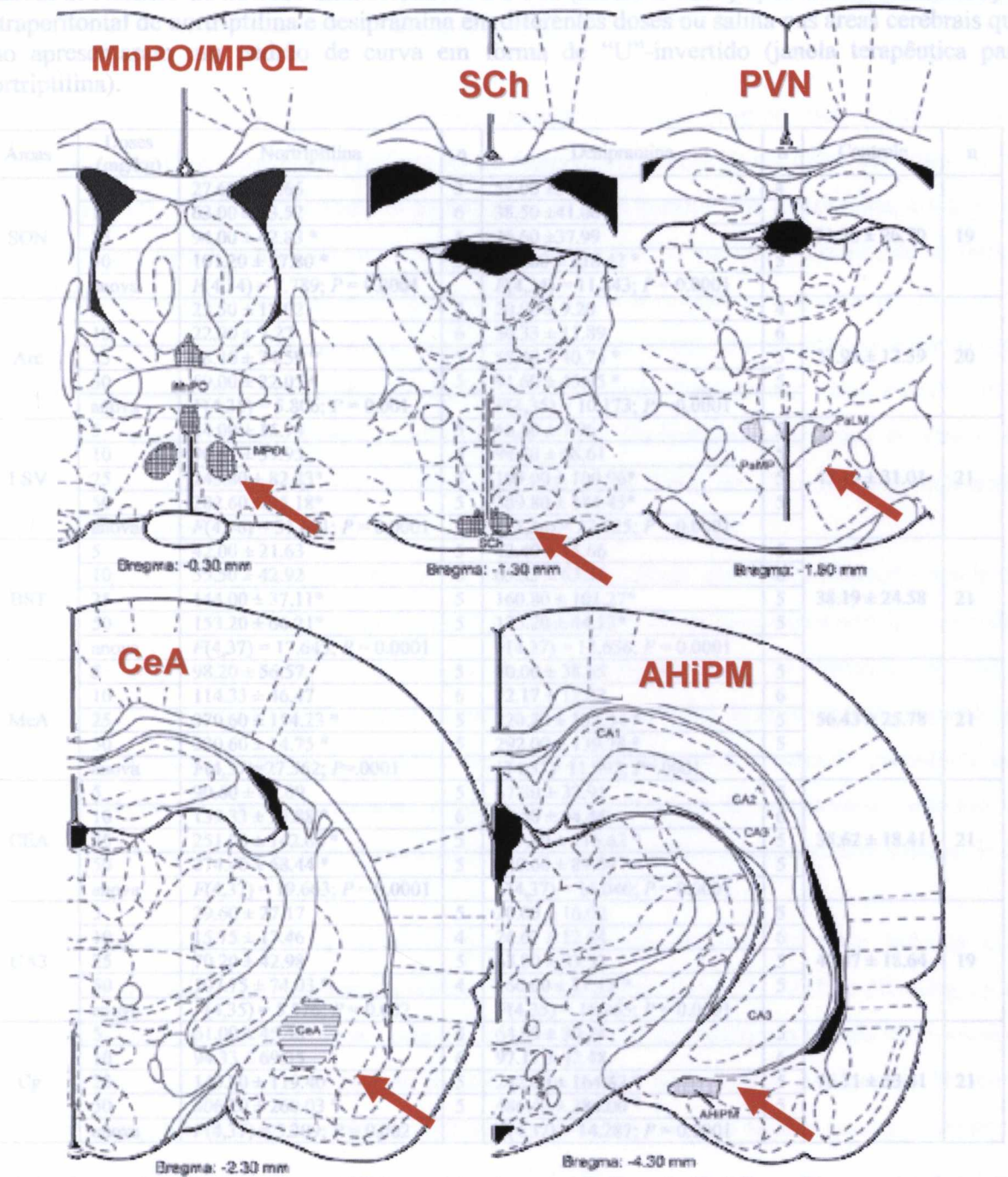


Figura 10 - Fotomicrografia típica do PVN e do Sch com núcleos imunorreativos c-Fos em ratos submetidos a administração aguda de nortriptilina e desipramina nas doses (5, 10, 25 e 50mg/kg, i.p) ou salina

Taboleta 1. Número de núcleos imunorreativos a c-Fos (média  $\pm$  SEM) após 2 h da administração intraperitoneal de morfina (10 mg/kg) em camundongos da linhagem C57BL/6J. Os dados foram analisados por teste t de Student e teste de ANOVA seguido pelo teste t de Dunnett. (\*) indicam diferenças estatisticamente significativas com  $P < 0.05$ . O teste t de Dunnett compara o grupo controle com todos os outros grupos.



Os dados foram analisados por teste t de Student e teste de ANOVA seguido pelo teste t de Dunnett. (\*) indicam diferenças estatisticamente significativas com  $P < 0.05$ . O teste t de Dunnett compara o grupo controle com todos os outros grupos.

Figura 11 – Diagrama esquemático, adaptado do atlas estereotático de Paxinos & Watson (1998), bregma -0.30mm a -4.30mm, ilustrando as sete áreas nas quais o número de núcleos imunorreativos a c-Fos foi quantificado no presente estudo.



**Tabela 1.** Número de núcleos imunorreativos a c-Fos (média  $\pm$  SEM) após 2 h da administração intraperitoneal de nortriptilina e desipramina em diferentes doses ou salina nas áreas cerebrais que não apresentaram um padrão de curva em forma de “U”-invertido (janela terapêutica para nortriptilina).

Áreas	Doses (mg/kg)	Nortriptilina	n	Desipramina	n	Controle	n
SON	5	27.67 $\pm$ 30.66	3	53.00 $\pm$ 31.65	4	31.26 $\pm$ 26.70	19
	10	63.00 $\pm$ 33.52	6	38.50 $\pm$ 41.06	6		
	25	94.00 $\pm$ 42.83 *	5	46.60 $\pm$ 37.99	5		
	50	101.20 $\pm$ 37.80 *	5	201.80 $\pm$ 118.42 *	5		
	anova	$F(4,34) = 7.789; P = 0.0001$		$F(4,34) = 11.843; P = 0.0001$			
Arc	5	23.50 $\pm$ 17.02	4	20.00 $\pm$ 9.20	4	23.90 $\pm$ 12.39	20
	10	22.00 $\pm$ 7.27	6	30.33 $\pm$ 11.89	6		
	25	48.40 $\pm$ 34.59 *	5	58.40 $\pm$ 40.74 *	5		
	50	59.00 $\pm$ 22.05 *	5	91.60 $\pm$ 45.95 *	5		
	anova	$F(4,35) = 5.806; P = 0.001$		$F(4,35) = 10.173; P = 0.0001$			
LSV	5	44.00 $\pm$ 15.94	5	66.60 $\pm$ 7.96	5	45.19 $\pm$ 31.01	21
	10	90.67 $\pm$ 59.95	6	94.80 $\pm$ 68.61	5		
	25	243.80 $\pm$ 82.83*	5	199.00 $\pm$ 100.96*	5		
	50	282.60 $\pm$ 95.18*	5	389.80 $\pm$ 184.45*	5		
	anova	$F(4,36) = 31.671; P = 0.0001$		$F(4,36) = 22.125; P = 0.0001$			
BST	5	42.00 $\pm$ 21.63	5	43.40 $\pm$ 15.66	5	38.19 $\pm$ 24.58	21
	10	55.50 $\pm$ 42.92	6	65.33 $\pm$ 63.31	6		
	25	144.00 $\pm$ 37.11*	5	160.80 $\pm$ 101.27*	5		
	50	153.20 $\pm$ 66.21*	5	175.20 $\pm$ 44.13*	5		
	anova	$F(4,37) = 17.645; P = 0.0001$		$F(4,37) = 13.656; P = 0.0001$			
MeA	5	98.20 $\pm$ 56.57	5	80.00 $\pm$ 38.65	5	56.43 $\pm$ 25.78	21
	10	114.33 $\pm$ 46.47	6	72.17 $\pm$ 12.02	6		
	25	370.60 $\pm$ 154.23 *	5	220.20 $\pm$ 182.34 *	5		
	50	230.60 $\pm$ 74.75 *	5	292.00 $\pm$ 139.78 *	5		
	anova	$F(4,37) = 27.562; P = .0001$		$F(4,37) = 11.992; P = .0001$			
CEA	5	90.60 $\pm$ 62.09	5	47.80 $\pm$ 32.91	5	35.62 $\pm$ 18.41	21
	10	139.33 $\pm$ 95.88 *	6	78.50 $\pm$ 64.44	6		
	25	251.00 $\pm$ 142.64 *	5	157.80 $\pm$ 116.62 *	5		
	50	274.40 $\pm$ 68.44 *	5	240.60 $\pm$ 89.84 *	5		
	anova	$F(4,37) = 19.663; P = 0.0001$		$F(4,37) = 16.040; P = 0.0001$			
CA3	5	29.60 $\pm$ 27.17	5	20.00 $\pm$ 16.02	5	40.47 $\pm$ 18.64	19
	10	15.75 $\pm$ 17.46	4	26.67 $\pm$ 12.04	6		
	25	70.20 $\pm$ 42.98	5	63.80 $\pm$ 33.52	5		
	50	107.75 $\pm$ 74.03 *	4	160.00 $\pm$ 77.15 *	5		
	anova	$F(4,35) = 5.576; P = 0.002$		$F(4,35) = 16.965; P = 0.0001$			
Cg	5	61.00 $\pm$ 45.48	5	64.80 $\pm$ 30.28	5	76.71 $\pm$ 53.31	21
	10	94.33 $\pm$ 69.35	6	97.17 $\pm$ 42.48	6		
	25	143.80 $\pm$ 119.40	5	242.00 $\pm$ 164.82 *	5		
	50	306.20 $\pm$ 260.03 *	5	486.40 $\pm$ 284.00 *	5		
	anova	$F(4,37) = 5.209; P = 0.002$		$F(4,37) = 14.287; P = 0.0001$			

Os dados foram submetidos a one way ANOVA seguida pelo teste t de Dunnett. (\*) indicam diferença estatisticamente significativa com  $P < 0.05$ . O teste t de Dunnett compara o grupo controle com todas os outros grupos.

**Arc**-núcleo arqueado; **BST**-núcleo da estria terminal; **CA3**- área hipocampal 3; **CEA**- núcleo central da amígdala; **Cg**- giro do cíngulo; **LSV**- núcleo septal lateral; **Mea**- núcleo medial da amígdala; **SON**- núcleo supraóptico.

### **Efeito do tratamento agudo com os antidepressivos tricíclicos, desipramina e nortriptilina, no comportamento de ratos submetidos ao Teste do Nado Forçado**

A figura 12 mostra a duração do comportamento de imobilidade no teste do nado forçado de ratos tratados com nortriptilina (Painel A) ou desipramina (Painel B) em diferentes doses [5, 10, 25 e 50mg/kg ou com salina, i.p. (dose 0- controles)]. Em ratos tratados com nortriptilina, o tempo de imobilidade no nado forçado mostra uma curva em forma de “U” em que a diminuição do tempo de imobilidade está associada às doses de 10 e 25mg/kg de nortriptilina, enquanto na maior dose (50mg/kg) o tempo de imobilidade não foi diferente daquele observado em animais tratados com salina (grupo controle). O tempo de imobilidade no nado forçado em ratos tratados com desipramina (painel B) apresentou padrão diverso, com diminuição progressiva do tempo de imobilidade de acordo com a dose utilizada, sendo que as doses de 25 e 50mg/kg induziram efeito inibitório mais significativo.

A figura 13 apresenta os valores do tempo de escalada após administração aguda de nortriptilina (painel A) e desipramina (painel B). No painel A observa-se que a nortriptilina induz aumento do tempo de escalada com uma curva padrão em forma de “U”-invertido em que o aumento da atividade está associado com o uso da dose de 25mg/kg de nortriptilina, enquanto na maior dose (50mg/kg) o tempo de escalada não foi estatisticamente diferentes do encontrado nos animais controle. Em animais tratados com desipramina (Painel B), observa-se aumento do tempo de escalada de forma dose-dependente crescente, com efeito, significativo nas doses de 25 e 50mg/kg.

A figura 14 mostra os dados referentes ao tempo de nado de ratos tratados com nortriptilina (Painel A) ou desipramina (Painel B) em diferentes doses [5, 10, 25 e 50mg/kg, i.p ou com salina (dose 0- controles)]. Neste comportamento, não foi observado um padrão dose-resposta característico, sendo que a nortriptilina reduziu o tempo de nado apenas na dose de 25mg/kg, enquanto o tratamento com desipramina não alterou o tempo de nado apenas quando comparado ao grupo controle.

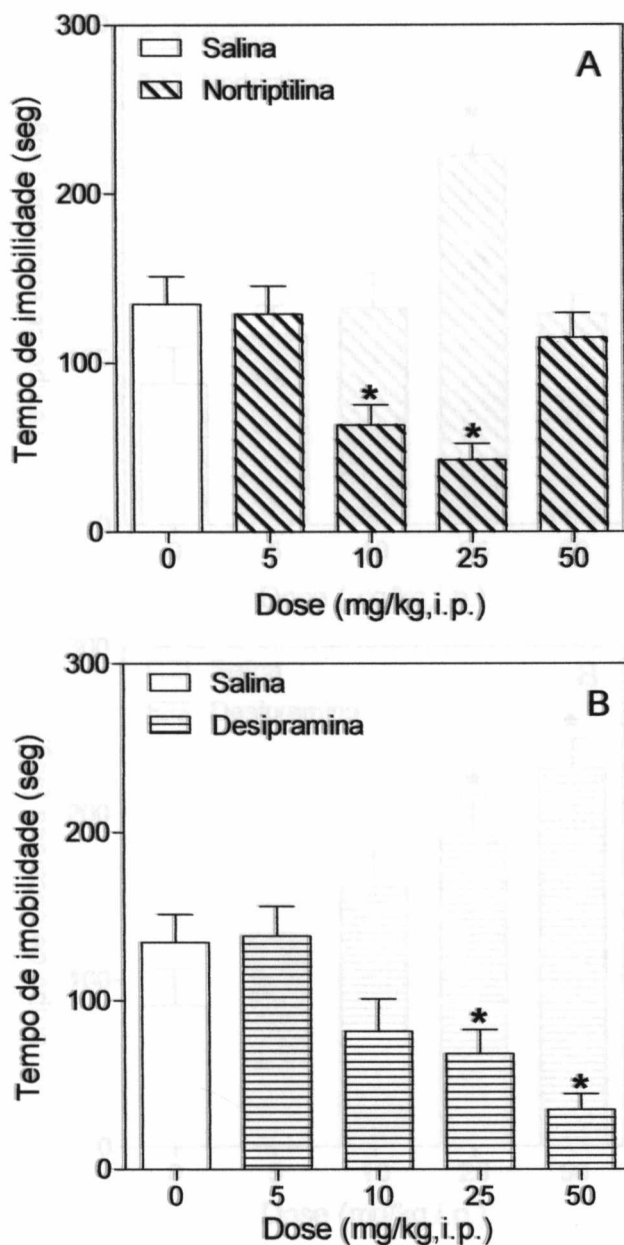


Figura 12 – Efeito do tratamento agudo com nortriptilina (Painel A) e desipramina (Painel B) nas doses de 5, 10, 25 e 50mg/kg ou salina (dose 0) no tempo de imobilidade durante o teste do nado forçado. Dados foram submetidos à one Way Anova seguido pelo post-test de Dunnett ( $p < 0,05$ ) e são expressos como média  $\pm$  SEM. Resultados da Anova para dados do painel A são:  $F_{(4,37)} = 8,557$ ;  $p < 0,0001$  e para o painel B são:  $F_{(4,36)} = 8,331$ ;  $p < 0,0001$ . Asteriscos indicam a diferença entre as diferentes doses da droga e controle tratado com salina (dose 0).

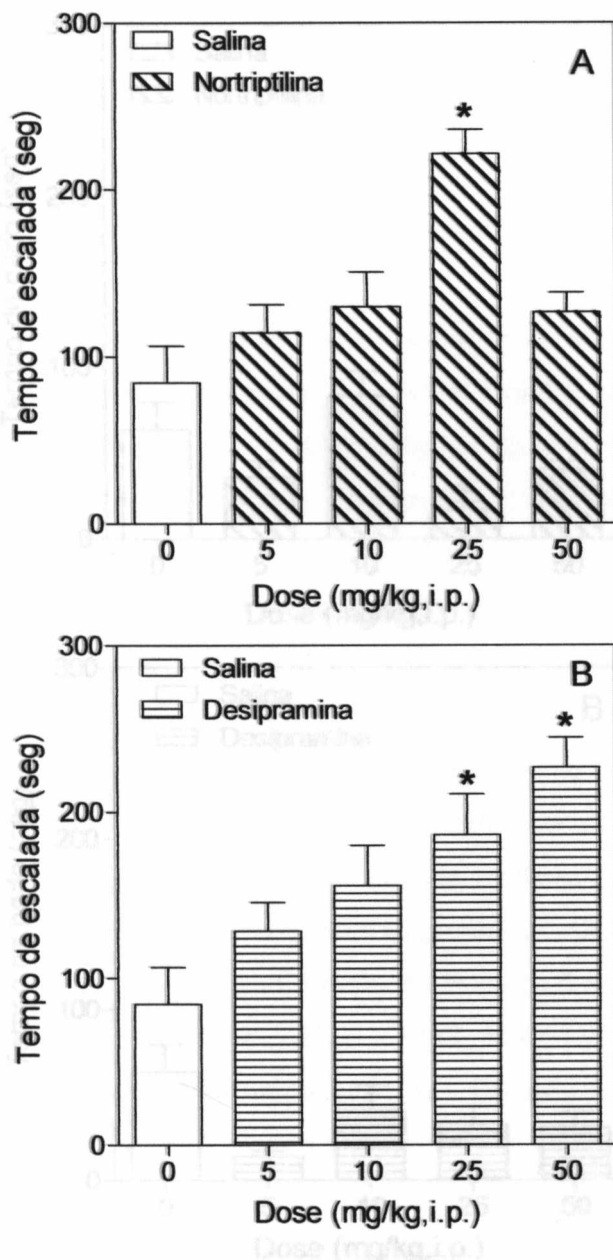


Figura 13 – Efeito do tratamento agudo com nortriptylina (Painel A) e desipramina (Painel B) nas doses de 5, 10, 25 e 50mg/kg ou salina (dose 0) no tempo de escalada durante o teste do nado forçado. Dados foram submetidos à one Way Anova seguido pelo post-test de Dunnett ( $p < 0,05$ ) e são expressos como média  $\pm$  SEM. Resultados da Anova para dados do painel A são:  $F_{(4,37)} = 9,508$ ;  $p < 0,0001$  e para o painel B são:  $F_{(4,36)} = 6,721$ ;  $p = 0,0001$ . Asteriscos indicam a diferença entre as diferentes doses da droga e controle tratado com salina (dose 0).

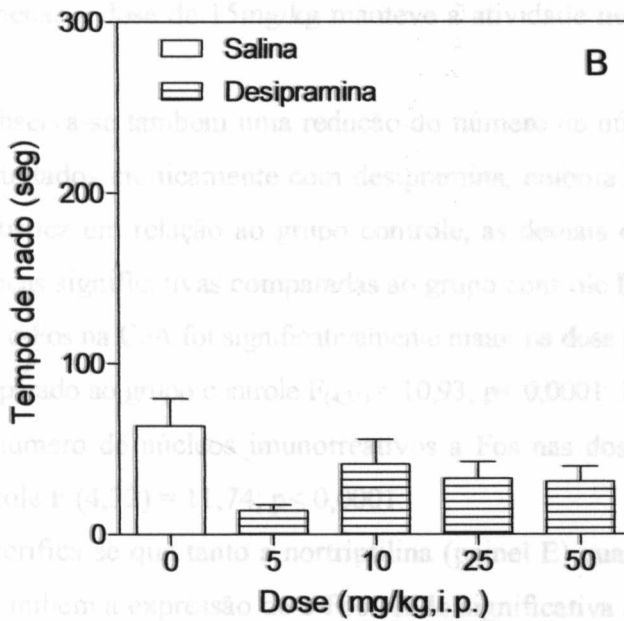
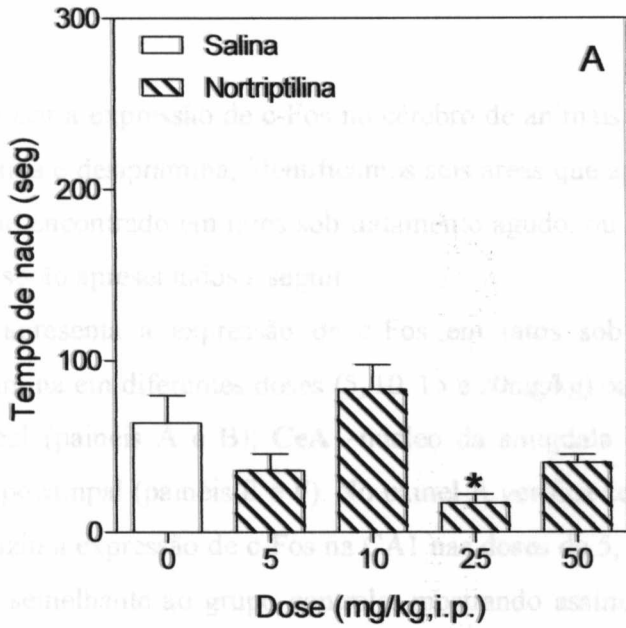


Figura 14 – Efeito do tratamento agudo com nortriptilina (Painel A) e desipramina (Painel B) nas doses de 5, 10, 25 e 50mg/kg ou salina (dose 0) no tempo de nado durante o teste do nado forçado. Dados foram submetidos à one Way Anova seguido pelo post-test de Dunnett ( $p < 0,05$ ) e são expressos como média  $\pm$  SEM. Resultados da Anova para dados do painel A são:  $F_{(4,37)} = 5,900$ ;  $p = 0,0009$  e para o painel B são:  $F_{(4,36)} = 2,467$ ;  $p = 0,062$ . Asteriscos indicam a diferença entre as diferentes doses da droga e controle tratado com salina (dose 0).

o painel B -  $F_{(4,37)} = 9,307$ ;  $p < 0,001$

## **Expressão de c-Fos no cérebro de ratos sob tratamento crônico com nortriptilina e desipramina**

Depois de analisar a expressão de c-Fos no cérebro de animais submetidos ao tratamento crônico com nortriptilina e desipramina, identificamos seis áreas que apresentaram um padrão de resposta semelhante ao encontrado em ratos sob tratamento agudo, ou seja, uma curva em forma de “U”-invertido que serão apresentados a seguir.

A figura 15 apresenta a expressão de c-Fos em ratos sob tratamento crônico com nortriptilina e desipramina em diferentes doses (5, 10, 15 e 20mg/kg) ou salina (controle) nas áreas: **CA1** –área hipocampal (painéis A e B); **CeA** –núcleo da amígdala central (painéis C e D) e **AHiPM**- amígdala hipocampal (painéis E e F). No painel A verifica-se que o tratamento crônico com nortriptilina reduziu a expressão de c-Fos na CA1 nas doses de 5, 10 e 20mg/kg, enquanto a dose de 15mg/kg foi semelhante ao grupo controle, mostrando assim, uma curva inibitória em “U”-invertido onde apenas a dose de 15mg/kg manteve a atividade neuronal nesta área  $F_{(4,32)}=3,58$ ;  $p=0,017$ .

No painel B observa-se também uma redução do número de núcleos imunorreativos a c-Fos na CA1 de ratos tratados cronicamente com desipramina, embora apenas a dose de 5mg/kg mostre diferença estatística em relação ao grupo controle, as demais doses de desipramina não tendo induzido diferenças significativas comparadas ao grupo controle  $F_{(4,32)}=3,61$ ;  $p=0,017$ .

A expressão de c-Fos na CeA foi significativamente maior na dose de 15mg/kg de nortriptilina (painel C) quando comparado ao grupo controle  $F_{(4,31)}=10,93$ ;  $p<0,0001$ . Já a desipramina (painel D) induziu aumento do número de núcleos imunorreativos à Fos nas doses de 15 e 20 mg/kg em relação ao grupo controle  $F_{(4,32)}=11,74$ ;  $p<0,0001$ .

NA AHiPM, verifica-se que tanto a nortriptilina (painel E) quanto a desipramina (painel F) na dose de 5mg/kg inibem a expressão de c-Fos sendo significativa a diferença em relação ao controle apenas para a desipramina. Na dose de 20mg/kg, tanto de nortriptilina quanto de desipramina, ocorre a diminuição do número de núcleos imunorreativos a c-Fos na AHiPM, no entanto essa diferença não foi estatisticamente significativa. A dose de 15mg/kg de ambos antidepressivos induziu um aumento da expressão de c-Fos, mas neste caso, apenas a nortriptilina apresentou diferença significante em relação ao grupo controle. Painel E -  $F_{(4,32)}=6,434$ ;  $p=0,008$ ; e painel F -  $F_{(4,32)}=9,307$ ;  $p<0,001$ .

A figura 16 apresenta fotomicrografia típica que mostra a distribuição de núcleos neuronais imunorreativos a c-Fos em secções coronais de cérebro de ratos das estruturas CA1.

A figura 17 apresenta fotomicrografia típica que mostra a distribuição de núcleos neuronais imunorreativos a c-Fos em secções coronais de cérebro de ratos das estruturas CeA.

A figura 18 apresenta fotomicrografia típica que mostra a distribuição de núcleos neuronais imunorreativos a c-Fos em secções coronais de cérebro de ratos das estruturas AHIPM.

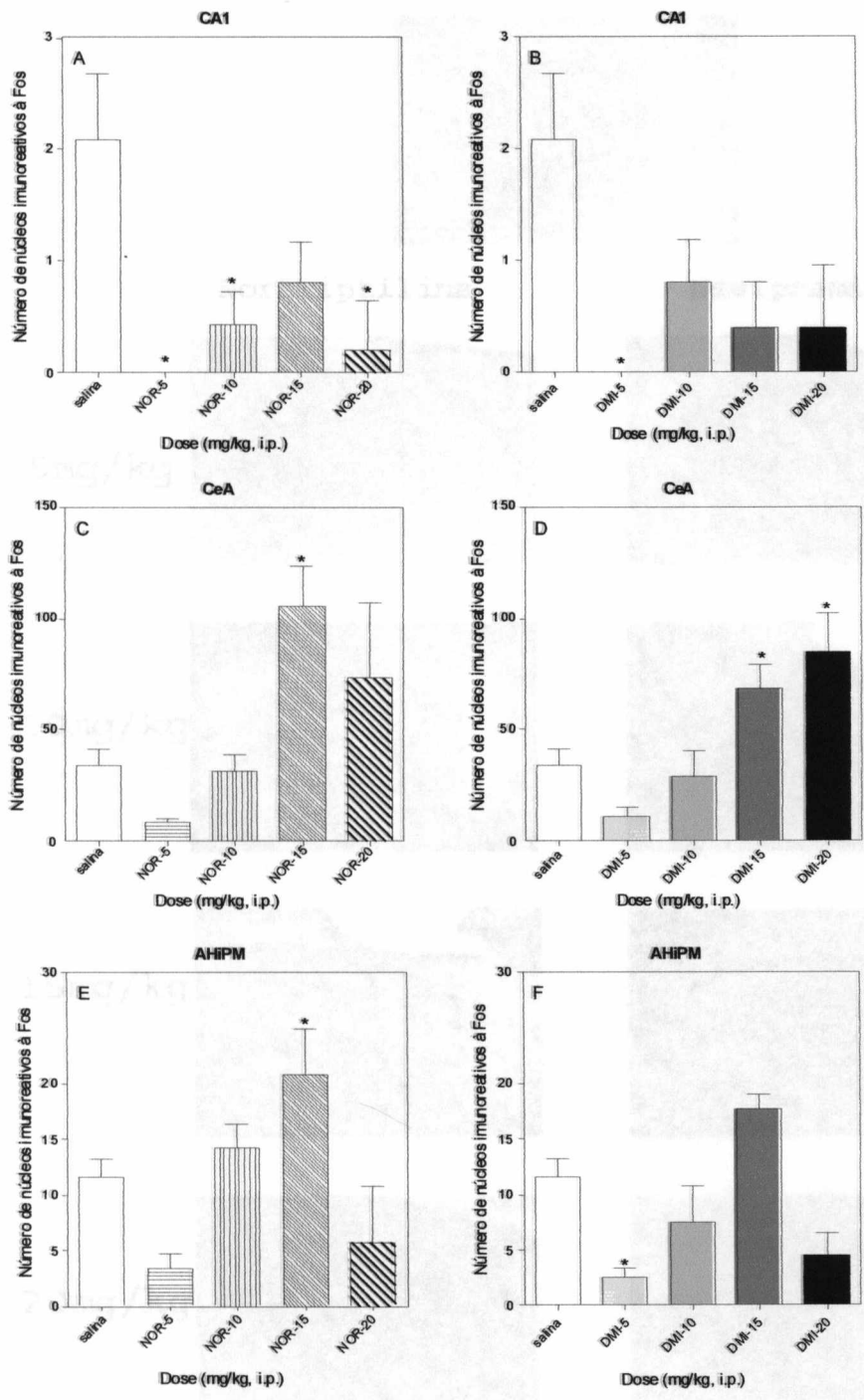
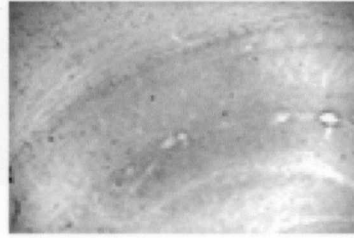


Figura 15 – Efeito do tratamento crônico na expressão de c-Fos na CA1 –área hipocampal (A, B); no CeA –núcleo da amígdala central (C, D) e AHIPM- amígdala hipocampal (E, F) nas diferentes doses de nortriptilina e desipramina (5, 10, 15 e 20mg/kg). Dados foram submetidos à one-way ANOVA seguido pelo teste de Dunnett ( $p < 0.05$ ) e foram expressos como média  $\pm$  SEM. Asteriscos indicam a diferença entre as diferentes doses da droga e controle tratado com salina (dose 0).



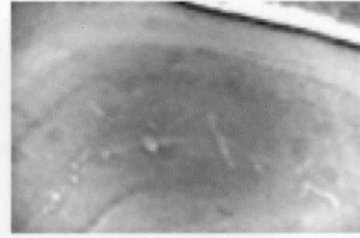
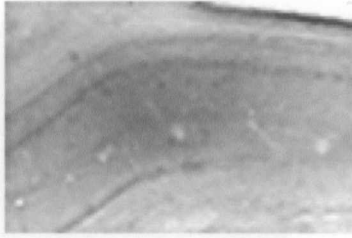
Controle



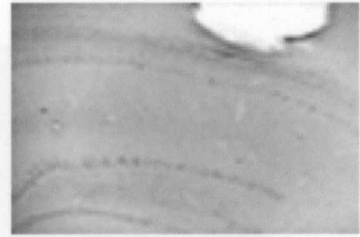
Nortriptilina

Desipramina

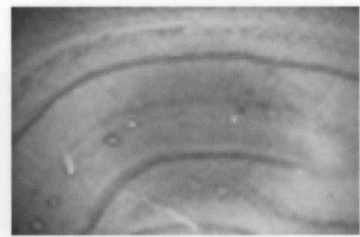
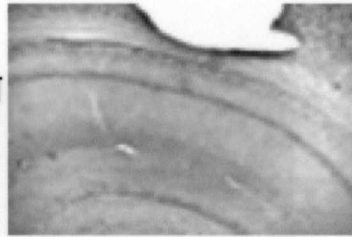
5mg/kg



10mg/kg



15mg/kg



20mg/kg

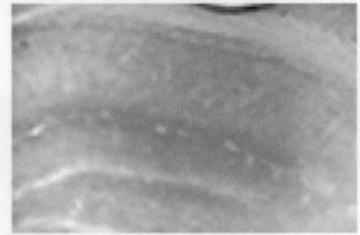
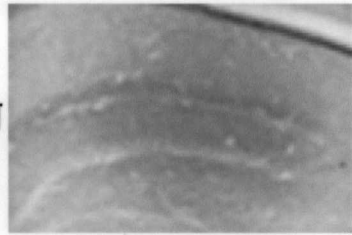
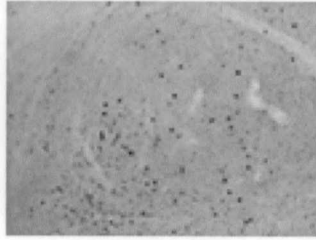


Figura 16 - Fotomicrografia típica que mostra a distribuição de núcleos neuronais imunorreativos a c-Fos em secções coronais de cérebro de ratos das estruturas CA1.

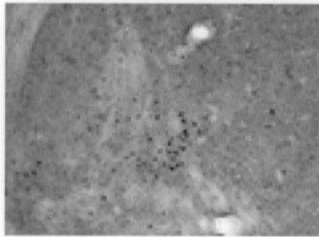
Controle



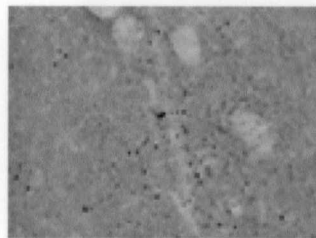
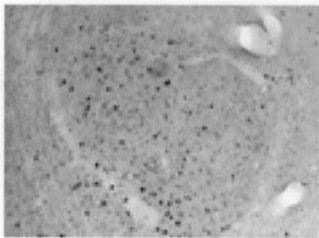
Nortriptilina

Desipramina

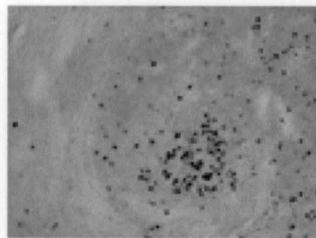
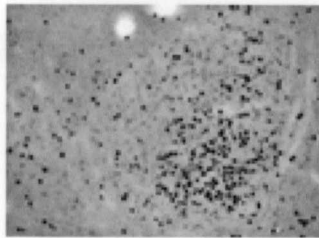
5mg/kg



10mg/kg



15mg/kg



20mg/kg

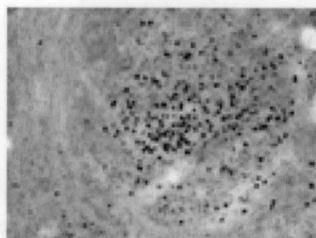
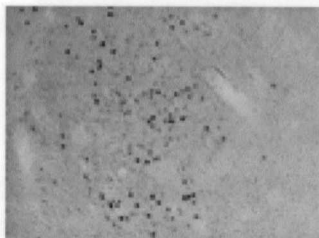


Figura 17 - Fotomicrografia típica que mostra a distribuição de núcleos neuronais imunorreativos a c-Fos em secções coronais de cérebro de ratos das estruturas CeA.

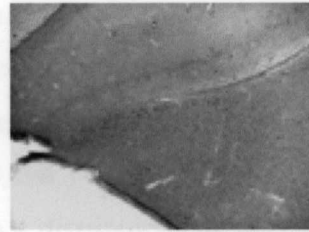
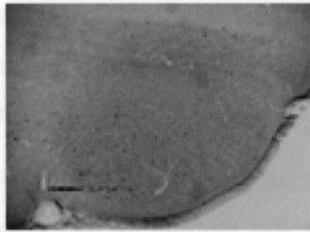
Controle



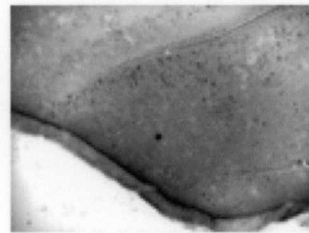
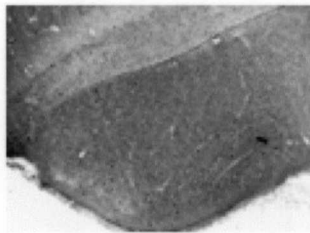
Nortriptilina

Desipramina

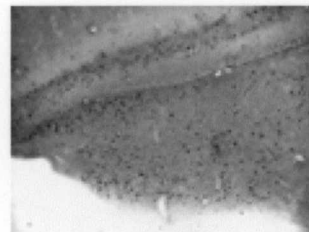
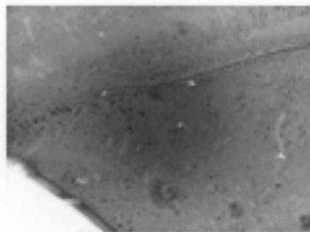
5mg/kg



10mg/kg



15mg/kg



20mg/kg

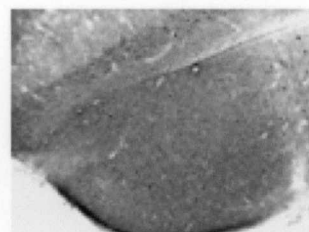
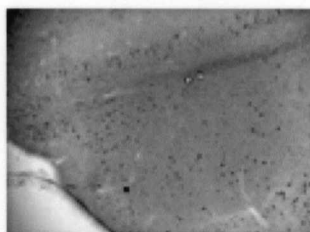


Figura 18 - Fotomicrografia típica que mostra a distribuição de núcleos neuronais imunorreativos a Fos em secções coronais de cérebro de ratos das estruturas AHIPM.

A figura 19 apresenta o número de núcleos imunorreativos para c-Fos no PaLM- núcleo paraventricular magnocelular (painéis A e B) e no PaMP- núcleo paraventricular parvocelular (painéis C e D) em ratos tratados cronicamente com nortriptilina e desipramina em diferentes doses (5, 10, 15 e 20mg/kg, i.p.) ou salina (controle). No PaLM, tanto a nortriptilina (painel A)  $F_{(4,32)} = 13,84$ ;  $p < 0,0001$ , quanto a desipramina (painel B)  $F_{(4,32)} = 10,16$ ;  $p < 0,0001$  na dose de 15mg/kg aumentaram a expressão de c-Fos, enquanto as demais doses não apresentaram diferença significativa quando comparadas ao grupo controle.

No PaMP observou-se um aumento da expressão de c-Fos apenas na dose de 15 mg/kg de nortriptilina (painel C)  $F_{(4,30)} = 14,09$ ;  $p < 0,0001$ , enquanto a desipramina (painel D) a expressão de c-Fos foi semelhante ao grupo controle  $F_{(4,28)} = 2,21$ ;  $p = 0,098$ .

A figura 20 apresenta fotomicrografia típica que mostra a distribuição de núcleos neuronais imunorreativos a c-Fos em secções coronais de cérebro de ratos das estruturas PaLM e PaMP.

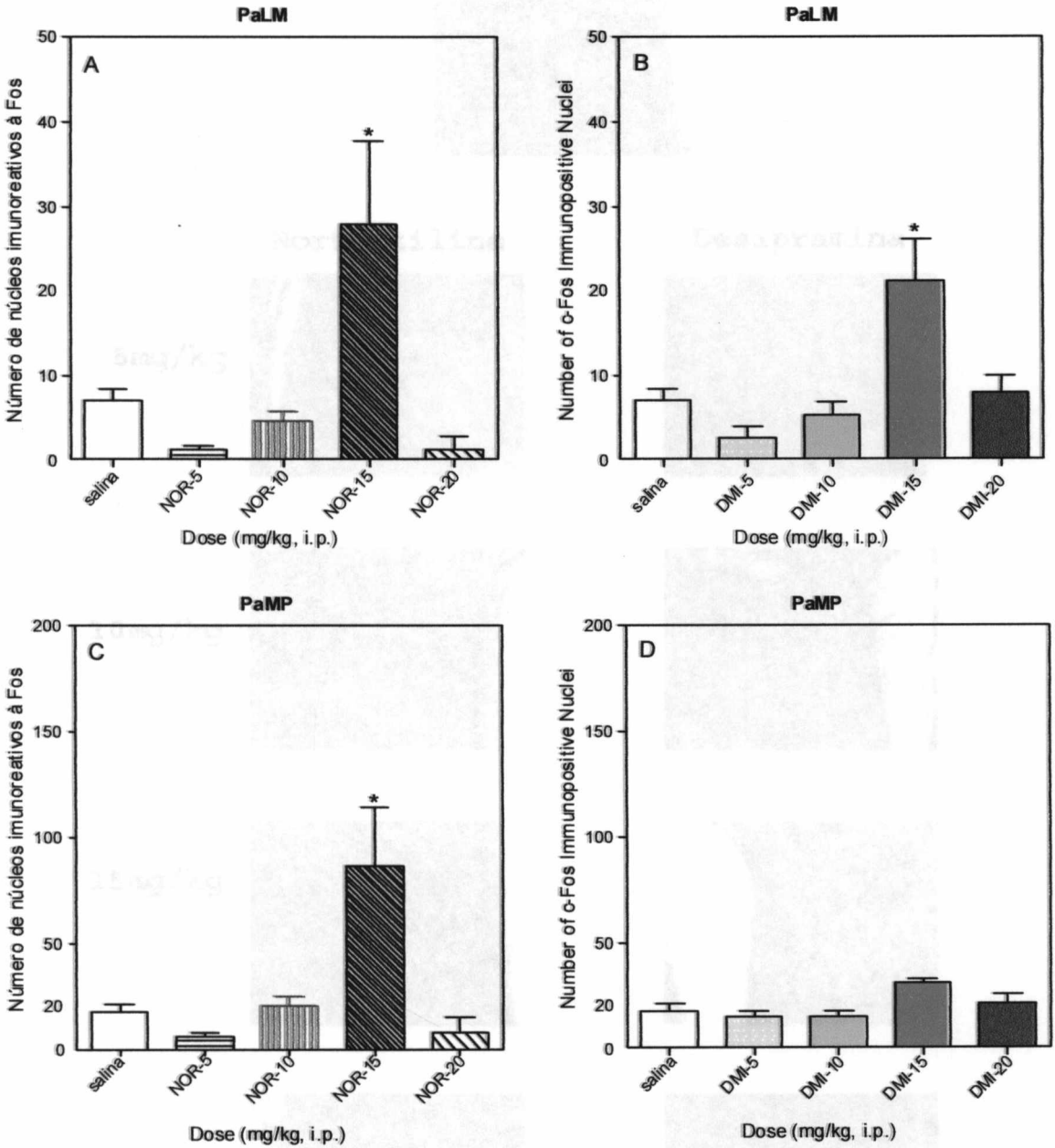
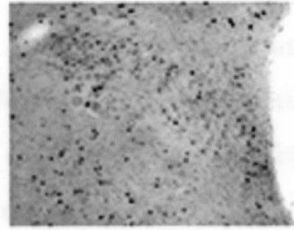


Figura 19 – Efeito do tratamento crônico na expressão de c-Fos no PaLM – núcleo paraventricular magnocelular (A, B) e no PaMP- núcleo paraventricular parvocelular (C, D) nas diferentes doses de nortriptilina e desipramina (5, 10, 15 e 20mg/kg). Dados foram submetidos à one-way ANOVA seguido pelo teste de Dunnett ( $p < 0.05$ ) e foram expressos como média  $\pm$  SEM. Asteriscos indicam a diferença entre as diferentes doses da droga e controle tratado com salina (dose 0).

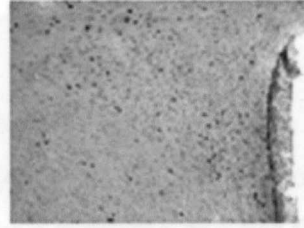
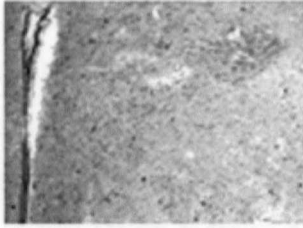
**Controle**



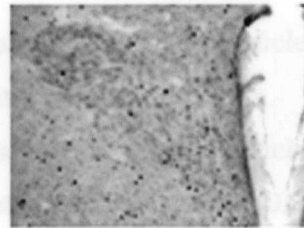
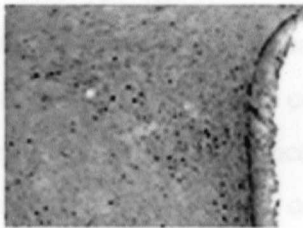
**Nortiptilina**

**Desipramina**

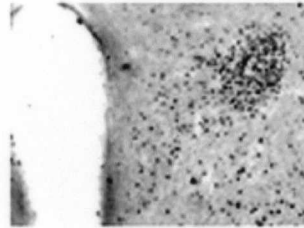
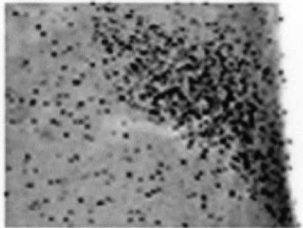
**5mg/kg**



**10mg/kg**



**15mg/kg**



**20mg/kg**

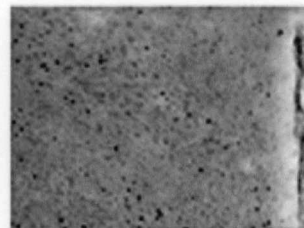
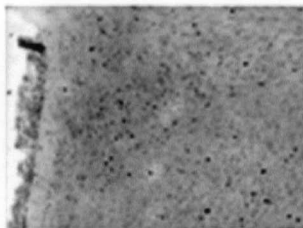


Figura 20 - Fotomicrografia típica que mostra a distribuição de núcleos neuronais imunorreativos a c-Fos em secções coronais de cérebro de ratos das estruturas PaLM e PaMP.

A figura 21 apresenta o número de núcleos imunorreativos para c-Fos no **SCh**- núcleo supraquiasmático (painéis A e B) e no **MPOL**- núcleo preóptico medial lateral (painéis C e D) após tratamento crônico de nortriptilina e desipramina em diferentes doses (5, 10, 15 e 20mg/kg, i.p.) ou salina (controle). No SCh, observou-se uma diminuição da expressão de c-Fos nas doses de 5, 10 e 20mg/kg de nortriptilina (painel A)  $F_{(4,21)} = 33,11$ ;  $p < 0,0001$ , enquanto na dose de 15mg/kg o número de núcleos imunorreativos a c-Fos não foi diferente do grupo controle. Já o tratamento crônico com desipramina (painel B) reduziu a expressão de c-Fos no SCh apenas nas doses de 5 e 10mg/kg,  $F_{(4,20)} = 14,12$ ;  $p = 0,0002$ .

Na área MPOL observa-se aumento da expressão de c-Fos após tratamento crônico com nortriptilina (painel C) apenas na dose de 15mg/kg -  $F_{(4,28)} = 9,42$ ;  $p = 0,0001$ , enquanto o tratamento crônico com desipramina (painel D) em todas as doses utilizadas a expressão de c-Fos foi semelhante ao grupo controle -  $F_{(4,31)} = 1,805$ ;  $p = 0,157$ .

A figura 22 apresenta fotomicrografia típica que mostra a distribuição de núcleos neuronais imunorreativos a c-Fos em secções coronais de cérebro de ratos das estruturas SCh.

A figura 23 apresenta fotomicrografia típica que mostra a distribuição de núcleos neuronais imunorreativos a c-Fos em secções coronais de cérebro de ratos das estruturas MPOL.

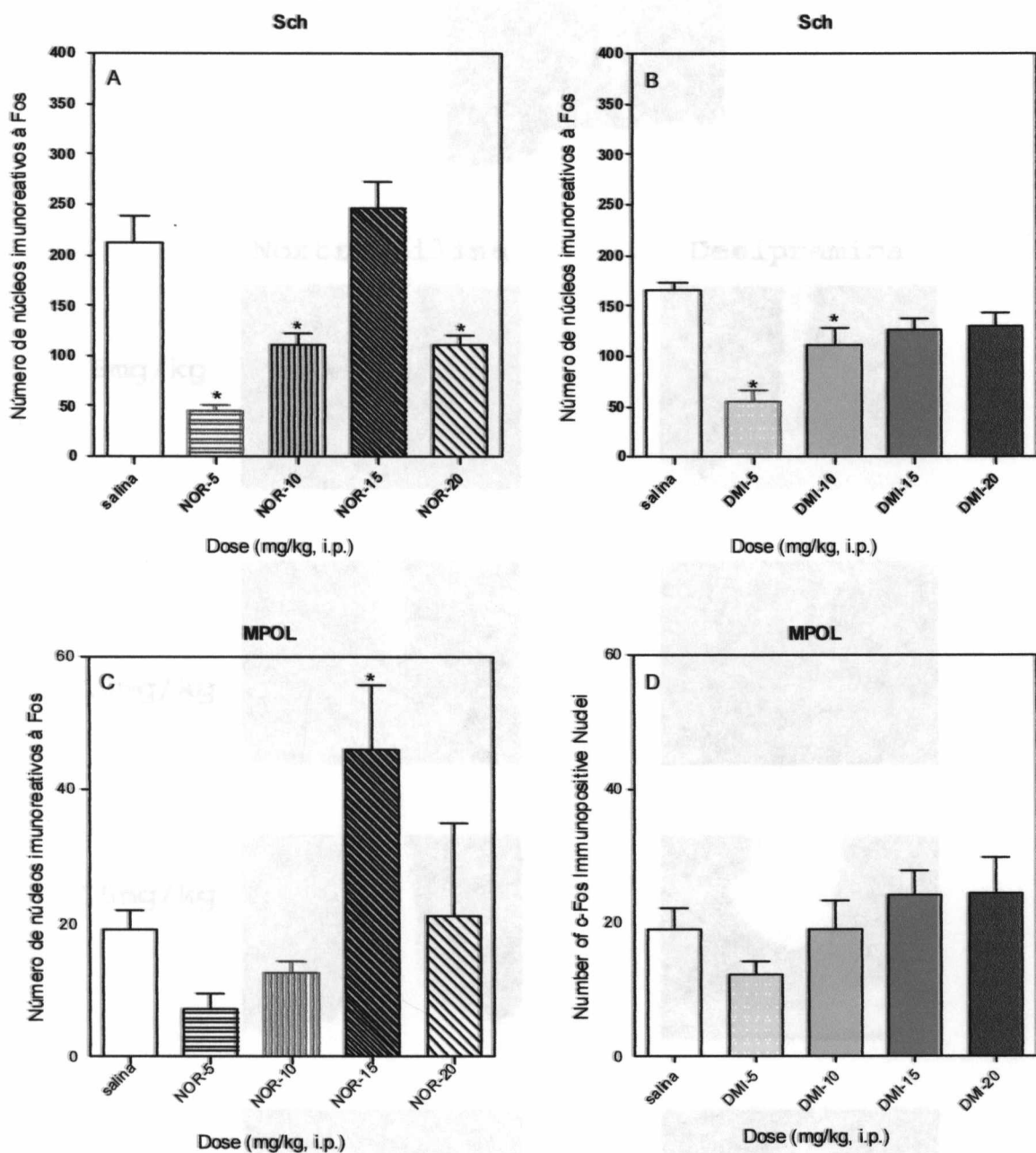


Figura 21 – Efeito do tratamento crônico na expressão de c-Fos no Sch – núcleo supraquiasmático (A, B) e no MPOL- núcleo preóptico medial lateral (C, D) nas diferentes doses de nortriptilina e desipramina (5, 10, 15 e 20mg/kg). Dados foram submetidos à ANOVA seguido pelo teste de Dunnett ( $p < 0.05$ ) e foram expressos como média  $\pm$  SEM. Asteriscos indicam a diferença entre as diferentes doses da droga e controle tratado com salina (dose 0).



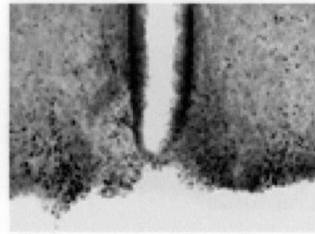
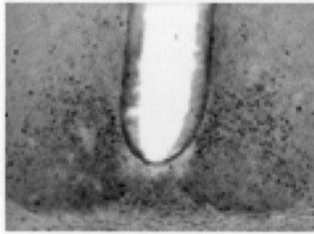
Controle



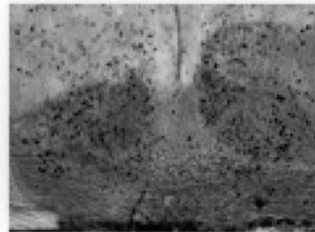
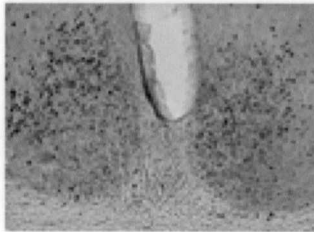
Nortriptilina

Desipramina

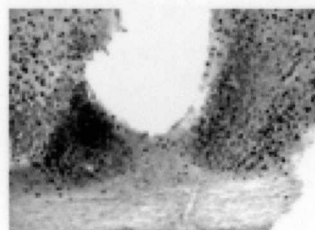
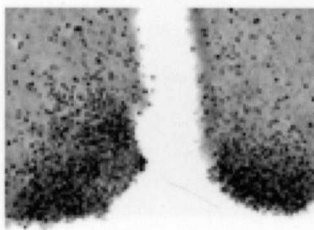
5mg/kg



10mg/kg



15mg/kg



20mg/kg

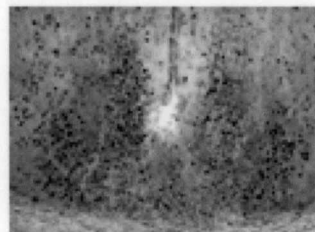
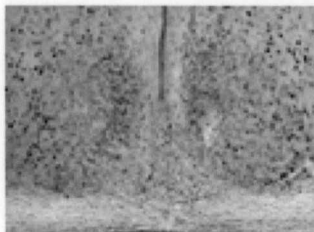


Figura 22- Fotomicrografia típica que mostra a distribuição de núcleos neuronais imunorreativos a c-Fos em secções coronais de cérebro de ratos das estruturas SCh.

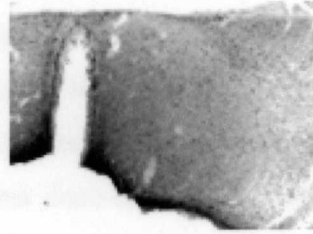
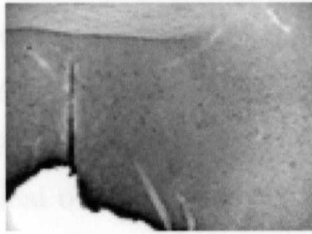
Controle



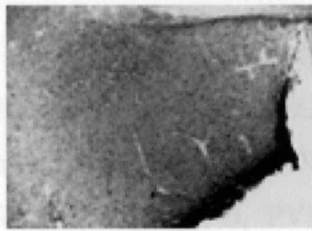
Nortriptilina

Desipramina

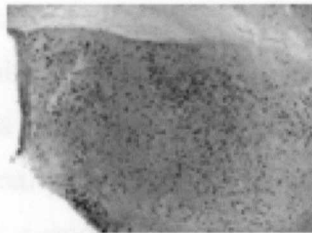
5mg/kg



10mg/kg



15mg/kg



20mg/kg

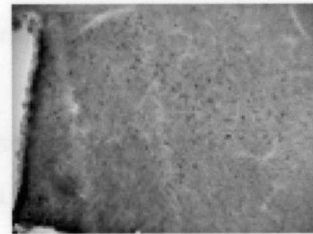
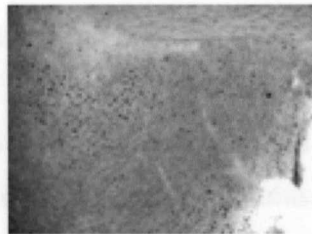


Figura 23- Fotomicrografia típica que mostra a distribuição de núcleos neuronais imunorreativos a c-Fos em secções coronais de cérebro de ratos das estruturas MPOL.

## 6 DISCUSSÃO

O presente estudo mostra que o tratamento agudo com antidepressivos tricíclicos, nortriptilina e desipramina, em diferentes doses, leva ao aumento da expressão de c-Fos de forma dose-dependente nas seguintes áreas cerebrais: MPOL, PVN, SCh, CA1 e MeA. Enquanto o padrão de expressão de c-Fos em ratos tratados com desipramina mostra curva linear crescente, a nortriptilina mostra curva em forma de “U”-invertido, sendo que tanto a menor quanto a maior dose se diferenciam do grupo controle. O mesmo padrão de resposta foi observado com a administração crônica destes antidepressivos. Além disso, verificou-se no teste do nado forçado que a desipramina diminui o tempo de imobilidade de forma dose-dependente linear crescente enquanto a nortriptilina reduziu o tempo de imobilidade de forma dose-dependente do tipo “U”, sendo que a menor e a maior doses apresentaram menor efeito no tempo de imobilidade.

Alguns estudos mostram que a expressão de c-Fos aumenta em certas regiões cerebrais em resposta a nortriptilina e desipramina (BECK, 1995; DAHMEN et al., 1997), e em nossos estudos também verificamos o mesmo achado. No estudo agudo, nossos dados mostraram que em seis estruturas cerebrais (MPOL, MnPO, PVN, SCh, CA1, AHIPM) o número de núcleos imunoreativos a c-Fos sugeriu um padrão em curva de U-invertido após administração de nortriptilina. Vários estudos sugerem uma relação bifásica, curvilínea entre os níveis plasmáticos de nortriptilina e resultados clínicos em pacientes deprimidos. Esta relação curvilínea foi claramente demonstrada usando nortriptilina, mas não desipramina, no teste da suspensão pela cauda, um modelo animal para testar drogas antidepressivas, em que o efeito auto-inibitório da nortriptilina é evidente quando altas doses são usadas (De-OLIVEIRA et al., 1990). Assim, nossos achados mostram que a ocorrência de “janela terapêutica” clínica para nortriptilina é mimetizada em certas áreas cerebrais em nível molecular, como mensurado pela expressão de c-Fos.

Os mecanismos que explicam o efeito dose-resposta em forma de “U” -invertido da nortriptilina na prática clínica requerem futuras elucidações. A ocorrência de fenômeno similar, considerando a expressão de c-Fos no grupo de animais que receberam nortriptilina demonstrado em nossos estudos, também necessita de mais esclarecimentos. No entanto, existem evidências clínicas de que o hidróxi-metabólito pode estar envolvido no efeito auto-inibitório da nortriptilina

(YOUNG et al., 1988), o que poderia explicar a diminuição da expressão de c-Fos no grupo de animais que recebeu altas doses de nortriptilina.

No estudo agudo, testamos a hipótese de que o tratamento com nortriptilina e desipramina modificaria o perfil da expressão cerebral de c-Fos em relação ao grupo de animais que recebeu salina, e que também haveria diferença no padrão da expressão de c-Fos induzido pelas duas drogas estudadas. Embora a nortriptilina e a desipramina sejam aminas secundárias que bloqueiam, de forma potente, a recaptação de noradrenalina, estudos revelam que a nortriptilina mostra uma associação do tipo curvilíneo bifásico entre as concentrações sanguíneas e os efeitos terapêuticos, porém essa associação é menos clara no que diz respeito à desipramina (De-OLIVEIRA et al., 1990). Então, é possível que essas drogas possam ativar áreas cerebrais diferentes, o que poderia explicar a diferença na sua resposta terapêutica.

Nossos dados mostram que tanto a nortriptilina quanto a desipramina aumentam significativamente a expressão de c-Fos em todas as áreas cerebrais estudadas, quando comparado ao grupo controle. Os animais tratados com a dose submáxima de nortriptilina (25 mg/kg) apresentaram aumento da expressão de c-Fos em algumas áreas cerebrais, mostrando associação do tipo curvilíneo bifásico. No entanto, a administração aguda de desipramina mostrou uma resposta dose-crescente. Desta forma, parece que o antidepressivo nortriptilina apresenta uma “janela de atividade” equivalente à janela terapêutica observada nos estudos de De-Oliveira e colaboradores (1990).

Dados da literatura mostram que as áreas cerebrais que parecem ter relevância na fisiopatogênese da depressão incluem o córtex pré-frontal, hipocampo, amígdala e vários núcleos hipotalâmicos. No presente estudo verificamos que a administração aguda dos antidepressivos tricíclicos, nortriptilina e desipramina, aumentam a expressão de c-Fos no MPOL, MnPO, PVN, SCh, região CA1, e AHIPM. Embora não possamos afirmar qual é o papel exato destas áreas cerebrais na gênese e/ou na manutenção da depressão, podemos sugerir alguns possíveis mecanismos envolvidos na psicopatologia dos transtornos do humor que podem estar relacionados com estas áreas.

Tem sido demonstrado que tanto o estresse quanto a depressão alteram a atividade do hipocampo (DRANOVSKY & HEN, 2006), associada à diminuição da proliferação celular ou neurogênese (MALBERG, 2004). Esta diminuição da neurogênese pode ser decorrente de níveis plasmáticos elevados de cortisol, pois a administração aguda de corticosteróide reduz a

plasticidade sináptica na CA1 (ALFAREZ et al., 2003). A revisão realizada por Dranovsky & Hen (2006), sugeriu que os antidepressivos tricíclicos modulam a sinapse monoaminérgica, aumentando a plasticidade celular e estrutural do hipocampo, revertendo o efeito do estresse e aumentando a neurogênese da zona do giro denteado no hipocampo. Em nosso estudo, a administração aguda de nortriptilina apenas na dose de 25mg/kg induziu aumento da expressão cerebral de c-Fos na área CA1 em comparação com os animais controle, enquanto a desipramina apresentou uma tendência ao aumento no número de núcleos imunoreativos a c-Fos de forma dose-dependente crescente, embora não tenha significância estatística. Embora não possamos afirmar qual via neuronal foi modificada pelos antidepressivos, é clara a diferença no padrão da expressão de c-Fos na área CA1 de ratos tratados agudamente com nortriptilina quando comparada ao controle.

Outra área que mostrou alteração no padrão da expressão de c-Fos foi a amígdala hipocampal posteromedial (AHiPM), na dose de 25mg/kg de nortriptilina, o que pode ser devido à conexão entre o hipocampo (CA1) e o complexo amigdalóide. O aumento da expressão de c-Fos indica simplesmente aumento da atividade neuronal sem, contudo, informar qual o tipo de interação neuronal existente. Assim, no presente estudo não é possível afirmar quais estruturas estão interagindo nem tampouco se essa interação é do tipo inibitória ou excitatória. No entanto, dados da literatura mostram que, durante situações de estresse, o hipocampo pode sofrer modulação pelo complexo amigdalóide, sendo a comunicação amígdala-hipocampo importante para a evocação e a expressão de memórias relacionadas ao medo. Demonstrou-se que células de ambas as estruturas, durante a evocação de uma resposta condicionada de medo, disparam de forma sincronizada, com frequência anteriormente relacionada à aquisição de memória aversiva e resposta do hipocampo a eventos emocionais significantes ou ameaçadores (SEINDENBECHER et al., 2003). Corroborando esta idéia, outro estudo demonstrou que animais geneticamente selecionados com maior sensibilidade à depressão apresentam atividade hipocampal aumentada (SHUMAKE et al., 2002).

O núcleo da amígdala central vem sendo estudado nos transtornos afetivos e parece ser de crucial importância para a relação entre emoção e comportamento (KENNEDY et al., 1997). A estimulação elétrica da amígdala em humanos aumenta a secreção de cortisol e a sensação de medo, ansiedade, disforia, e a lembrança de eventos desagradáveis passados (BROTHERS, 1995). A amígdala também está envolvida com a liberação do CRH (HERMAN & CULLINAM,

1997), sugerindo que o excesso de atividade da amígdala pode estar envolvido na indução da hipersecreção de CRH relatado nos distúrbios do humor e alterações emocionais (MUSSELMAN & NEMEROFF, 1993). Assim, fica claro que a amígdala exerce papel importante na organização emocional, envolvendo alterações comportamentais, neuroendócrinas relacionadas ao estresse (DREVETS, 2001).

Em nosso estudo, a expressão de c-Fos na CeA aumentou nas doses de 25 e 50mg/kg com tratamento agudo de nortriptilina e desipramina, enquanto que no tratamento crônico, observamos o aumento da expressão de c-Fos na dose de 15mg/kg para nortriptilina e nas doses de 15 e 20mg/kg para desipramina. Dados da literatura mostram redução do metabolismo da amígdala associado ao tratamento com antidepressivos e sugerem que este efeito pode ser comum para uma variedade de tratamentos antidepressivos (DREVETS, 1995; ABERCROMBIE et al., 1996). Como no presente trabalho verificamos um aumento de c-Fos tanto na CeA quanto na AHIPM em animais sob tratamento agudo e crônico com nortriptilina e desipramina, é possível sugerir que estas áreas tenham alguma participação no efeito terapêutico destes antidepressivos, embora mais estudos sejam necessários para especificar o caráter desta participação.

O hipotálamo regula vários processos fisiológicos que podem estar alterados na depressão. Entre as principais alterações funcionais observadas na depressão podemos citar o apetite (WELLMAN et al., 1993), o comportamento sexual (Mas, 1995), o ciclo sono-vigília (MOORE & EICHLER, 1972), e a secreção e liberação hormonal, sendo este último e especialmente importante para as respostas ao estresse (ARBORELIUS et al., 1999). O núcleo paraventricular (PVN) é um dos componentes do eixo hipotálamo-hipófise-adrenal, em que tem sido demonstrada hiperatividade dos receptores para corticosteróide na depressão (HOSBOER, 2001). Este núcleo apresenta dois grupos celulares distintos, sendo a parte medial formada por neurônios parvocelulares e a porção lateral por neurônios magnocelulares. Os neurônios magnocelulares produzem vasopressina e ocitocina e se projetam para o lobo neural da hipófise. Já os elementos parvocelulares sintetizam CRH (SILVA et al., 2002) e se projetam para a adeno-hipófise, além de enviar axônios descendentes para o tronco cerebral e para todos os níveis da medula espinhal. A vasopressina produzida pelos neurônios magnocelulares também pode atuar na adeno-hipófise regulando a liberação de hormônio adrenocorticotrófico (ACTH) (WOTJAK et al., 1996).

No presente trabalho verificamos que tanto a nortriptilina quanto a desipramina, quando administradas agudamente, aumentam a expressão de c-Fos no PVN quando comparado ao grupo controle, sendo as doses eficazes 10 e 25 mg/kg para nortriptilina e 25 e 50mg/kg para desipramina. A distribuição dos núcleos celulares imunomarcados foi homogênea em todo o PVN, estando ambas as partes do PVN marcadas nos animais sob tratamento agudo. Desta forma, a contagem dos núcleos imunoreativos a c-Fos não foi individualizada por sub-região do PVN. Entretanto, nos grupos de animais que receberam tratamento crônico, observamos que a dose de 15mg/kg de ambas as drogas induziu aumento mais intenso da expressão de c-Fos na porção magnocelular (PaLM) do PVN, quando comparado ao grupo controle. Por outro lado, a região parvocelular (PaMP) apresentou aumento da expressão de c-Fos somente na dose de 15mg/kg de nortriptilina. Assim, parece que a administração crônica, tanto de nortriptilina, quanto desipramina, estimula os neurônios magnocelulares e que somente a nortriptilina é capaz de estimular os neurônios parvocelulares.

Estudos *post-mortem* têm demonstrado aumento do número de neurônios imunorreativos a CRH no PVN de pacientes deprimidos (PURBA et al., 1996). Por outro lado, tratamento com antidepressivo diminui a expressão de CRH em neurônios do PVN de ratos (BRADY et al., 1992). Alguns estudos sugerem um papel para o CRH na neurobiologia da depressão, desde que neurônios produtores deste neuro-hormônio estão fortemente ativados na depressão. Observou-se que, em pacientes deprimidos, há aumento do número de neurônios produtores de CRH, aumento do número de neurônios que co-expressam AVP e CRH e aumento da expressão de RNAm para CRH em neurônios do PVN. Ao contrário, pacientes sob tratamento com antidepressivos apresentam atenuação da síntese de CRH (RAADSHEER et al., 1994, 1995) e diminuição de CRH no líquido cerebrospinal (HEUSER et al., 1998). Neurônios produtores de CRH também foram identificados em áreas extra-hipotalâmicas, incluindo várias estruturas límbicas como a amígdala medial e central e o leito da estria terminal (GRAY, 1990). A amígdala é muito rica em neurônios produtores de CRH e representa a parte do sistema de CRH-extra-hipotalâmico que está relacionada ao comportamento de medo e às repostas comportamentais ao estresse, como também ativação do eixo hipotálamo-hipófise-adrenal (GRAY, 1990). Aubry mostrou em seu estudo que ocorre diminuição dos níveis de RNAm dos receptores para CRF-R1 na amígdala durante administração crônica de amitriptilina (AUBRY et al., 1999).

Outros neurohormônios produzidos no PVN e que parecem estar envolvidos nos sintomas da depressão são a vasopressina e a ocitocina. Observou-se em pacientes com depressão maior um aumento da atividade neuronal das células que sintetizam vasopressina e ocitocina no PVN (PURBA et al., 1996). Este fato pode explicar a alteração do eixo-hipotálamo-hipófise-adrenal e o aumento da responsividade à vasopressina em pacientes deprimidos (DINAN et al., 1999). Além disso, verificou-se que os níveis plasmáticos de vasopressina estão correlacionados positivamente com níveis de cortisol na depressão (BRUNNER et al., 2002). Em paralelo, a ativação dos neurônios produtores de ocitocina tem sido implicada com a diminuição do apetite e perda de peso presentes na depressão, desde que este neuropeptídeo pode atuar como hormônio da saciedade (MEYNEN et al., 2007).

Um aumento da atividade de neurônios vasopressinérgicos pode ser crucial para sustentar a responsividade corticotrófica na presença de altos níveis de glicocorticóides circulantes durante o estresse crônico e depressão (AGUILERA & RABADAN-DIEHL, 2000). A ocitocina, por outro lado, inibe a liberação de ACTH, achado confirmado em humanos (LEGROS, 2001), o que mostra um exemplo de ação antagonista entre vasopressina e ocitocina.

Embora a expressão de c-Fos seja um bom indicador de atividade neuronal, não podemos inferir quais vias neuronais estão ativadas e quais neurotransmissores são liberados nas diversas condições que estimulam esta expressão. Entretanto, como no presente trabalho verificamos que tanto o tratamento crônico quanto o agudo com antidepressivos tricíclicos aumenta a expressão de c-Fos no PVN. Assim, estes dados, em conjunto com os da literatura nos permite sugerir que este núcleo pode ser importante na resposta terapêutica destes antidepressivos.

Outro núcleo hipotalâmico de interesse na fisiopatogênese da depressão é o núcleo supraquiasmático (SCh). Este núcleo recebe projeções bilaterais diretas da retina, apresenta atividade do tipo marcapasso e participa da regulação de um grande número de ritmos circadianos e circanuais (VAN ESSEVELDT et al., 2000). Além disso, alguns estudos têm enfatizado o papel do Sch na cognição (ARUSHANYAN et al., 2000) e em transtornos afetivos (BUIJIS et al., 1993). Verificou-se também uma relação recíproca entre a atividade do Sch e respostas comportamentais. O estresse pode levar a quadros de depressão com distúrbios psicopatológicos que podem perturbar os ritmos biológicos (KRIPKE et al., 1978). Estudos neuroanatômicos têm revelado extensivas relações recíprocas entre o Sch e várias estruturas límbicas que participam do comportamento afetivo (BUIJIS et al., 1998).



A alteração funcional do Sch, caracterizada pelo aumento do número de neurônios expressando AVP com uma diminuição de RNAm, e diminuição da flutuação do RNAm para AVP, tem sido encontrado em pacientes deprimidos (ZHOU et al., 2001). A diminuição da atividade do Sch na depressão pode estar, em parte, relacionada ao aumento do cortisol plasmático que inibe a função deste núcleo (LIU et al., 2006). Estudos em animais mostram que neurônios vasopressinêrgicos do Sch exercem influência inibitória sobre neurônios produtores de CRH do PVN.

No presente trabalho verificamos que a administração aguda de nortriptilina e desipramina, leva a aumento da expressão de c-Fos no Sch nas doses de 25mg/kg de nortriptilina e de 25 e 50mg/kg de desipramina, quando comparadas ao grupo controle. No entanto, a administração crônica desses antidepressivos levou ao efeito contrário, provocando diminuição da expressão de c-Fos neste núcleo. Mais estudos são necessários para esclarecer essa diferença entre os tratamentos agudo e crônico com antidepressivos sob a expressão de c-Fos, e qual o papel que o Sch desempenha na terapêutica antidepressiva.

O núcleo preóptico mediano (MnPO) faz parte da lâmina terminal e está conectado com o órgão subfornical e órgão vasculoso da lâmina terminal (OLDFIELD et al., 1992). Este núcleo tem conectividade aferente e eferente com regiões que estão envolvidas na regulação cardiovascular, térmica, hidromineral e neuroendócrina, e no ciclo sono-vigília (LIND & JOHNSON, 1982; SAPER & LEVISOHN, 1983; SWANSON, 1976). O MnPO contém neurônios GABAérgicos ativadores do sono e está envolvido na regulação do sono REM/ não-REM, estando este núcleo fortemente ativado durante o sono (SZYMUSIAK & MCGINTY, 2008). Nossos dados mostram que a administração aguda de nortriptilina e desipramina induziu aumento da expressão de c-Fos no MnPO assim como na MPOL. Esse aumento de ativação neuronal poderia ser devido às alterações cardiovasculares que são induzidas pelo estresse, e até mesmo pelo efeito da droga neste sistema. Entretanto, o que podemos afirmar com os presentes resultados é que tanto o MnPO quanto a MPOL parecem participar do mecanismo de ação das drogas estudadas desde que houve aumento da expressão de c-Fos de forma dose-dependente.

Mudanças na sinapse serotoninérgica e noradrenérgica podem explicar as mudanças emocionais experimentadas pelos pacientes. As respostas ao tratamento agudo em modelos animais podem servir como um indicador da eficácia de antidepressivos (NESTLER et al., 2002). Dois modelos animais que estabelecem validade da resposta aguda à antidepressivos são o teste

da suspensão da cauda e o teste do nado forçado (LUCKI, 2001). Destes dois modelos, o teste do nado forçado também demonstrou ser útil para verificar as respostas para o tratamento crônico com antidepressivos (DULAWA et al., 2004).

Para confirmar se o padrão de expressão de c-Fos pode ser usado para identificar a ocorrência de “janela terapêutica”, decidimos testar as doses utilizadas no primeiro estudo, com administração aguda de nortriptilina e desipramina, em um modelo de teste comportamental para roedores. Assim, investigamos se o tratamento agudo com diferentes doses de nortriptilina e desipramina modifica o padrão de comportamento no teste do nado forçado. Nossos dados mostram que o teste do nado forçado confirmou uma relação curvilínea bifásica em forma de “U” entre as doses de nortriptilina e o tempo de imobilidade, refletindo o padrão de resposta dose-dependente em forma de “U”-invertido da nortriptilina observado no estudo da expressão de c-Fos. Assim, a dose de 25mg/kg, que induziu maior expressão de c-Fos em algumas áreas cerebrais, foi a dose que induziu menor duração do comportamento de imobilidade. Já a administração aguda de desipramina diminuiu o tempo de imobilidade de forma dose-resposta crescente, de modo semelhante ao padrão da expressão de c-Fos sendo a resposta mais intensa, nos dois estudos, na dose de 50mg/kg.

Nossos dados estão de acordo com os encontrados na literatura, onde os antidepressivos tricíclicos, predominantemente noradrenérgicos, aumentam o comportamento de escalada (MACIEJ KUSMIDER et al., 2007). Outros estudos mostram que os inibidores da recaptação de serotonina (ISRS) aumentam o comportamento do nado comparado ao grupo controle (CRYAN & LUCKI, 2000; CRYAN et al., 2002; DETKE et al., 1995). Assim, como em nosso estudo utilizamos antidepressivos tricíclicos que são predominantemente noradrenérgicos e não serotoninérgicos, fato que pode explicar a ausência de alteração no tempo de nado durante o teste do nado forçado.

Assim, nossos resultados confirmam uma relação entre as doses de nortriptilina e o padrão curvilinear bifásico em forma de U e o tempo de imobilidade em ratos submetidos ao teste do nado forçado. Estes achados refletem o padrão dose-resposta em forma de “U”-invertido “janela terapêutica” para nortriptilina (mas não para desipramina) e o número de núcleos c-Fos imunorreativos em seis áreas cerebrais de ratos. Estas áreas podem ser locais importantes para o estudo dos mecanismos intracelulares da ação de drogas antidepressivas.

## 7 CONCLUSÕES

Os dados obtidos com a administração aguda de antidepressivos tricíclicos confirmam a existência de associação do tipo curvilíneo bifásico entre as doses de nortriptilina e a contagem de c-Fos em ratos.

O estudo do nado forçado confirmou uma relação curvilínea bifásica em forma de U entre as doses de nortriptilina, mas não para a desipramina, e o tempo de imobilidade, como também em relação ao comportamento de escalada. Estes achados refletem o padrão de resposta dose-dependente em forma de U invertido da nortriptilina e a contagem de c-Fos nas áreas cerebrais de ratos.

A administração crônica de antidepressivos tricíclicos também mostrou a existência de associação do tipo curvilíneo bifásico entre as doses de nortriptilina e a contagem de c-Fos em ratos. Desta forma, nossos achados indicam que algumas áreas do cérebro podem ser importantes alvos para o estudo dos mecanismos intracelulares da ação de antidepressivos. As mais sugestivas são áreas hipotalâmicas: núcleos preóptico medial lateral, preóptico mediano, paraventricular e supraquiasmático; além da área CA1 do hipocampo, bem como a amígdala hipocampal posteromedial e o núcleo amigdalóide central.

Como não podemos afirmar qual é o papel exato destas áreas cerebrais particulares na gênese ou na manutenção da depressão, é difícil construir um racional, uma hipótese não-especulativa, que possa resultar em uma adequada interpretação de nossos achados. Entretanto, nossos dados mostram que algumas áreas cerebrais podem estar implicadas na ação dos antidepressivos nortriptilina e desipramina.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABEL, E. L., BILITZKE, J. A possible alarm substance in the forced swimming test. **Physiol. Behav.** v. 48, p.233-239, 1990.
- ABERCROMBIE, H. C., SCHAEFER, S. M., LARSON, C. L., OAKES, T. R., LINGRAN, K. A., HOLDEN, J. F. Metabolic rate in the right amygdala predicts negative affect in depressed patients. **Neuroreport.** v. 9, p.3301-3307, 1998.
- ABERCROMBIE, H. C., SCHAEFER, S. M., LARSON, C. L., WARD, R. T., HOLDEN, J. F., TURSKI, P. A., PERLMAN, S., DAVIDSON, R. J. Medial prefrontal and amygdalar glucose metabolism in depressed and control subjects: an FDG- PET study [Abstract]. **Psychophysiology**, v.33, p.S17, 1996.
- AGUILERA, G., RABADAN-DIEHL, C. Vasopressinergic regulation of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis: implications for stress adaptation. **Regul. Pept.** v. 96, p.23-29, 2000.
- ALEXOPOULOS, G. S., RAUE, P., AREAN, P. Frontostriatal and limbic dysfunction in late-life depression. **Am. J. Geriatr. Psychiatry** v. 10, p.687-695, 2002.
- ALFAREZ, D. N., JOËLS, M., KRUGERS, J. H. Chronic unpredictable stress impairs long-term potentiation in rat hippocampal CA1 area and dentate gyrus *in vitro*. **Eur. J. Neurosci.** v.17, p.1928-1934, 2003.
- ANAND, A., LI, Y., WANG, Y. Activity and connectivity of brain mood regulating circuit in depression: a functional magnetic resonance study. **Biol. Psychiatry.** v. 57, p.1079-1088, 2005.
- ARBORELIUS, L., OWENS, M. J., PLOTSKY, P. M., NEMEROFF, C. B. The role of corticotropin-releasing factor in depression and anxiety disorders, **J. Endocrinol.** v. 160, p.1-12, 1999.
- ARUSHANYAN, E. B., VODOLAZSKAYA, M. G., POPOV, A. V. Acceleration of the acquisition of a conditioned reflex to time in rats with disruption of the suprachiasmatic nuclei of the hypothalamus. **Neurosci. Behav. Physiol.** v. 30, p.649-651, 2000.
- ASBERG, M., CRONHOLM, B., SJOQVIST, F., TUCK, D. Relationship between plasma level and therapeutic effect of nortriptyline. **Br. Med. J.** v. 3, p.331-334, 1971.

- AUBRY, J. M., POZZOLI, G., VALE, W. W. Chronic treatment with the antidepressant amitriptyline decreases CRF-R1 receptor mRNA levels in the rat amygdala. **Neurosci. Lett.** v. 14, p.197-200, 1999.
- AYDEMIR, O., DEVECI, A., TANELI, F. The effect of chronic antidepressant treatment on serum brain-derived neurotrophic factor levels in depressed patients: a preliminary study. **Prog. Neuropsychopharmacol. Biol. Psychiatry.** v. 29, p.261-265, 2005.
- BARNES, N.M., SHARP, T. A review of central 5-HT receptors and their function. **Neuropharmacology**, v. 38, p.1083-152,1999.
- BECK, C. H. M. Acute treatment with antidepressant drugs selectively increases the expression of c-fos in the rat brain. **J. Psychiatry Neurosci.** v. 20, p.25-32, 1995.
- BECKMANN, A. M., WILCE, P. A. EGR transcription factors in the nervous system. **Neurochem. Int.** v. 31, p.477-510, 1997.
- BELLCHAMBERS, C. E., CHIENG, B., KEAY, K. A., CHRISTIE, M. J. Swim-stress but not opioid withdrawal increases expression of C-Fos immunoreactivity in rat periaqueductal gray neurons which project to the rostral ventromedial medulla. **Neuroscience**, v. 83, p.517-524, 1998.
- BLIER, P., LISTA, A., De MONTIGNY, C. Differential properties of pre- and postsynaptic 5-hydroxytryptamine<sub>1A</sub> receptors in the dorsal raphe and hippocampus: I. Effect of spiperone. **J. Pharmacol. Exp. Ther.** v. 265, p.7-15,1993.
- BOIVIN, D. B. Influence of sleep-wake and circadian rhythm disturbances in psychiatric disorders. **J. Psychiatry. Neurosci.** v. 35, p.446-458, 2000.
- BRADY, L. S., GOLD, P. W., HERKENHAM, M., LYNN, A. B., WHITFIELD Jr, H. J. The antidepressants fluoxetine, idazoxan and phenelzine alter corticotropin-releasing hormone and tyrosine hydroxylase mRNA levels in rat brain: therapeutic implications, **Brain Res.** v. 572, p.117-125, 1992.
- BROTHERS, L. Neurophysiology of the perception of intentions by primates. In: **Gazzaniga, M. S. (Ed.) The cognitive Neurosciences.** MIT Press, Cambridge, MA, 1995. p. 1107-1116.

BRUNNER, J., KECK, M. E., LANDGRAF, R., UHR, M., NAMENDORF, C., BRONISCH, T. Vasopressin in CSF and plasma in depressed suicide attempters: preliminary results. **Eur. Neuropsychopharmacol.** v.12, p.489-494, 2002.

BUIJIS, R. M., MARKMAN, M., NUNES-CARDOSO, B., HOU, Y. X., SHINN, S. Projections of the suprachiasmatic nucleus to stree-related areas in the rat hypothalamus: a light and elotronmicroscopic study. **J. Comp. Neurol.** v. 335, p.42-54, 1993.

BUIJIS, R. M., HERMES, M. H. L. J., KALSBECK, A. The suprachiasmatic nucleus-paraventricular nucleus interactions: a bridge to the neuroendocrine and autonomic nervous system, in: **I. J. A. Urban, J. P. H. Burbach, D. De Wied (Eds.), Progress in Brain Research**, Amsterdam: Elsevier, 1998, v. 119, p.365-381.

BUHEL, C., DOLAN, R. J., ARMONY, J. L., FRISTON, K. J. Amygdala-hippocampal involvement in human aversive trace conditioning revealed through event-related functional magnetic resonance imaging. **J. Neurosci.** v. 19, p.10869-10876, 1999.

CAMPEAU, S., HAYWARD, M. D., HOPE, B. T., ROSEN, J. B., NESTLER, E. J., DAVIS, M. Induction of *c-fos* proto-oncogene in rat amygdala during unconditioned and conditioned fear. **Brain Res.** v. 565, p.349-352, 1991.

CANLI, T., ZHAO, Z., BREWEER, J., GABRIELI, J. D. E., CAHILL, L. Event-related activation in the human amygdala associates with later memory for individual emotional experiences. **J. Neurosci.** v. 20, p.1-5, 2000.

CAPPIELLO, A., MALISON, R. T., McDOUGLE, C. J., VESGO, S. J., CHARNEY, D. S., HENINGER, G. R., PRINCE, L. H. Seasonal variation in neuroendocrine and mood responses to iv L-tryptophan in depressed patients and healthy subjects. **Neuropsychopharmacology**, v. 15, p.475-483, 1996.

CARMICHAEL, S. T., PRINCE, J. L. Limbic connections of the orbital and medial prefrontal cortex in Macaque Monkeys. **J. Comp. Neurol.** v. 363, p.615-641, 1995.

CASIS, O., SANCHEZ-CHAPULA, J. Mechanism of block of cardiac transient outward K<sup>+</sup> current (I<sub>to</sub>) by antidepressant drugs. **J. Cardiovasc. Pharmacol.** v. 32, p.527-534, 1998.

- CLORE, G. L., ORTONY, A. Cognition in emotion: Always, sometimes or never? In: Lane R., Nadel, L., Ahern, G., Allen, J., Kaszniak, A., Rapcsak, S., Schwartz, G. Editors. **Cognitive Neuroscience of Emotion**. New York: Oxford University Press, 2000. p.24-61.
- COCCARO, E. F. Impulsive aggression and central serotonergic system function in humans: an example of a dimensional brain-behavior relationship. **Int. Clin. Psychopharmacol.** v. 7, p.3-12, 1992.
- COOPER, P.J., MURRAY, L., HOOPER, R., WEST, A. The development and validation of a predictive index for postpartum depression. **Psychol. Med.** v. 26, p.627-34, 1996.
- COSTALL, B., NAYLOR, T. 5-HT<sub>3</sub> receptors. **Curr Drug Targets CNS Neurol Disord.** v. 3, p.27-37, 2004.
- CRYAN, J. F., PAGE, M. R., LUCKI, I. Differential behavioral effects of the antidepressants reboxetine, fluoxetine, and moclobemide in a modified forced swim test following chronic treatment. **Psychopharmacology**, v. 182, p.335-344, 2005.
- CRYAN, J. F., PAGE, M. R., LUCKI, I. Noradrenergic lesions differentially alter the antidepressant-like effect of reboxetine in a modified forced swim test. **Eur. J. Pharmacol.** v. 436, p.197-205, 2002.
- CRYAN, J. F., LUCKI, I. Antidepressant-like behavioral effects mediated by 5-hydroxytryptamine (2C) receptors. **J. Pharmacol. Exp. Ther.** v. 295, p.1120-1126, 2000.
- DAHMEN, N., FEHR, C., REUSS, S., HIEMKE, C. Stimulation of immediate early gene expression by desipramine in rat brain. **Biol. Psychiatry.** v. 42, p.317-23, 1997.
- DANISH UNIVERSITY ANTIDEPRESSANT GROUP. Citalopram: clinical effect profile in comparison with clomipramine. A controlled multicenter study. **Psychopharmacology, (Berl.)** v. 90, p.131-138, 1986.
- DAVIDSON, R. J. Affective neuroscience and psychophysiology: toward a synthesis. **Psychophysiology**, v. 40, p.655-665, 2003.
- DAVIS, M., WHALEN, P. J. The amygdala: Vigilance and emotion. **Mol. Psychiatry.** v. 6, p.3-34, 2001.

DELGADO, P. L., CHARNEY, D. S., PRICE, L. H., AGHJANIAN, G. K., LANDIS, H., HENINGER, G. R. Serotonin function and mechanism of antidepressant action. Reversal of antidepressant-induced remission by rapid depletion of plasma tryptophan. **Ach. Gen. Psychiatry**, v. 47, p.411-418, 1990.

De-OLIVEIRA, I. R., DIQUET, B., VAN DER MEERSCH, M., DARDENNES, R., GONIDEC, J., PRADO-LIMA, P. A. S. Self-inhibiting action of nortriptyline's anti-immobility effect at high plasma and brain levels mice. **Psychopharmacol.** v. 102, p.553-556, 1990.

De-OLIVEIRA, I. R., PRADO-LIMA, P. A. S., SAMUEL-LAJEUNESSE, B. Monitoring of tricyclic antidepressant plasma levels: a review of the literature. Part I, **Psychiatry & Psychobiology**, v. 4, p.43-60, 1989.

DETKE, M. J., LUCKI, I. Detection of serotonergic and noradrenergic antidepressants in the rat forced swimming test: the effects of water depth. **Behav. Brain Res.** v. 73, p.43-46, 1996.

DETKE, M. J., RICKELS, M., LUCKI, I. Active behaviors in the rat forced swimming test differentially produced by serotonergic and noradrenergic antidepressants. **Psychopharmacology**, v. 121, p.66-72, 1995.

DINAN, T. G., LAVELLE, E., SCOTT, L. V., NEWELL-PRINCE, J., MEDBAK, S., GROSSMAN, A. B. Desmopressin normalizes the blunted adrenocorticotropin response to corticotropin-releasing hormone in melancholic depression: evidence of enhanced vasopressinergic responsivity. **J. Clin. Endocrinol. Metab.** v. 84, p.2238-2240, 1999.

DRANOVSKY, A., HEN, R. Hippocampal Neurogenesis: Regulation by stress and antidepressant. **Biol. Psychiatry**. v. 59, p.1136-1143, 2006.

DREVETS, W. C. Neuroimaging abnormalities in the amygdala in mood disorders. **Ann. N. Y. Acad. Sci.** v. 985, p.420-444, 2003.

DREVETS, W. C. Neuroimaging and neuropathological studies of depression: implications for the cognitive-emotional features of mood disorders. **Cur. Opin. Neurobiol.** v. 11, p.240-249, 2001.

DREVETS, W. C. Functional neuroimaging studies of depression: the anatomy of melancholia. **Annu. Rev. Med.** v. 49, p.341-361, 1998.



DREVETS, W. C. PET and the functional anatomy of major depression. In: **Nakajima, T., Ono, T (Eds.), Emotion, Memory and Behavior – Study of Human and Nonhuman Primates.** Tokyo: Japan Scientific Societies Press, 1995. p.43-62.

DREVETS, W. C., VIDEEN, T. O., PRINCE, J. L., PRESKOR, S. H., CARMICHAEL, S. T., RAINCHLE, M. E. A functional anatomical study of unipolar depression. **J. Neurosci.** v. 12, p.3268-3641, 1992.

DULAWA, S. C., HOLICK, K. A., GUNDERSEN, B., HEN, R. Effects of chronic fluoxetine in animal models of anxiety and depression. **Neuropsychopharmacology**, v. 29, p.1321-1330, 2004.

DUMAN, R. S. Depression: a case of neuronal life and death? **Biol. Psychiatry.** v. 56, p.140-145, 2004.

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

DUMAN, R. S., HENINGER, G. R., NESTLER, E. J. A molecular and cellular theory of depression. **Arch. Gen. Psychiatry.** v. 54, p.597-606, 1997.

DUNCAN, G. E., KNAPP, D. J., JOHNSON, K. B., BREESE, G. R. Functional classification of antidepressants based on antagonism of swim-stress-induced fos-like immunoreactivity. **J. Pharmacol. Exp. Ther.** v. 277, p.1076-1089, 1996.

DURIC, V., McCARSON, K. E. Hippocampal neurokinin-1 receptor and brain-derived neurotrophic factor gene expression is decreased in rat models of pain and stress. **Neuroscience**, v. 133, p.999-1006, 2005.

EISEN, A. Fluoxetine and desipramine: a strategy for augmenting antidepressant response. **Pharmacopsychiatry**, v. 22, p.272-273, 1989.

FRÖHLICH, H., HOENSELAAR, A., EICHNER, J., ROSENBROCK, H., BIRK, G., ZELL, A. Automated classification of the behavior of rats in the forced swimming test with support vector machines. **Neural Netw.** v. 21, p.92-101, 2008.

- GRAEFF, F. G., BRANDÃO, M. L. **Neurobiologia das doenças mentais**. São Paulo: Lemos Editorial, 1993.
- GRAY, T. S. The organization and possible function of amygdaloid corticotropin-releasing factor pathways. In: **E. B. DeSouza and C. B. Nemeroff (Eds.), Corticotropin-Releasing Factor: Basic and Clinical Studies of a Neuropeptide**, CRC Press, Boca Raton, FL, 1990. p.53.
- GOODWIN, F. K., WIRZ-JUSTICE, A., WEHR, T.A. Evidence that the pathophysiology of depression and the mechanism of action of antidepressant drugs both involve alterations in circadian rhythms. In: **Costa, Ragni (eds), Typical and Atypical Antidepressants: Clinical Practice**. New York: Raven Press, 1982. p.1-11.
- HALLONQUIST, J. D., GOLBERG, M. A., BRANDES, J. S. Affective disorders and circadian rhythms. **Can. J. Psychiat.** v. 31, p.259-272, 1986.
- HASHIMOTO, K., SHIMIZU, E., IYO, M. Critical role of brain-derived neurotrophic factor in mood disorders. **Brain Res.** v. 45, p.104-114, 2004.
- HERMAN, J. P., CULLINAM, W. E. Neurocircuitry of stress: central control of the hypothalamus-pituitary-adrenal axis. **Trends Neurosci.** v. 20, p.78-84, 1997.
- HERRERA, D. G., ROBERTSON, H. A. Activation of c-fos in the brain. **Prog. Neurobiol.** v. 50, p.83-107, 1996.
- HEUSER, I., BISSETTE, G., DETTLING, M., SCHWEIGER, U., GOTTHARDT, U., SCHMIDER, J., LAMMERS, C. H., NEMEROFF, C. B., HOLSBOER, F. Cerebrospinal fluid concentration of corticotropin-releasing hormone, vasopressin, and somatostatin in depressed patients and health controls: response to amitriptyline treatment. **Depress. Anxiety.** v. 8, p.71-79, 1998.
- HOFFMAN, G. E.; SMITH, M. S.; VERBALIS, J. G. c-Fos and related immediate early gene products as markers of activity in neuroendocrine systems. **Neuroendocrinol.** v. 14, p.173-213, 1993.
- HOFFMAN, G. E., LYO, D. Anatomical markers of activity in neuroendocrine system. Are we all 'Fos-ed' out? **J. Neuroendocrinol.** v. 14, p.259-268, 2002.

HOSBOER, F. Stress, hypercortisolism and corticosteroid receptors in depression: implications for therapy, **J. Affect. Disord.** v. 62, p.77-91, 2001.

IVY, A. S., RODRIGUEZ, F. G., GARCIA, C., CHEN, M. J., RUSSO-NEUSTADT, A. A. Noradrenergic and serotonergic blockade inhibits BDNF mRNA activation following exercise and antidepressant. **Pharmacol. Biochem. Behav.** v. 75, p.81-88, 2003.

JACKSON, S. W. **Melancholia & Depression.** New Haven, CT: Yale University Press, 1986.

JACOBS, B. L., AZMITIA, E.C. Structure and function of the brain serotonin system. **Physiol. Rev.** v. 72, p.165-229, 1992.

KACZMAREK, L. ROBERTSON, H. A. Immediate early genes and inducible transcription factors in mapping of the central nervous system function and dysfunction. In: **Bjorklund A., Hokfelt, T (eds) Handbook of chemical neuroanatomy.** Amsterdam: Elsevier, 2002, v. 19.

KALIA, M. Neurobiological basis of depression: an update. **Metabolism.** v. 54 (5 suppl 1), p.24-27, 2005.

KAPLAN, H., SADOCK, B. J., GREBB, J. A. **Synopsis of Psychiatry.** 7<sup>th</sup> ed. Baltimore: Williams e Wilkins, 1994.

KAPP, B. S., SUPPLE, W. F., WHALEN, P. J. Effects of electrical stimulation of the amygdaloid central nucleus on neocortical arousal in the rabbit. **Behav. Neurosci.** v. 108, p.81-93, 1994.

KENDLER, K. S., KESSLER, R. C., WALTERS, E. E., MACLEAN, C., NELAE, M. C., HESTH, A.C., EAVES, L. J. Stressful life events, genetic liability, and onset of an episode of major depression in women. **Am. J. Psych.** v. 152, p.822-842, 1995.

KENNEDY, S. H., JAVANMARD, M., VACCARINO, F. J. A review of functional neuroimaging in mood disorders: positron emission tomography and depression. **Can. J. Psychiatry.** v. 42, p.467-475, 1997.

KLUVER, H., BUCY, P. C. Preliminary analysis of functions of the temporal lobes in monkeys. **Arch. Neurol. Psychiatry.** v. 42, p.979-1000, 1939.

- KRIPKE, D. F., MULLANEY, D. J., ATKINSON, M., WOLF, S. Circadian rhythm disorders in maniac-depressives. **Biol. Psychiatry**. v. 13, p.335-351, 1978.
- LAI, T. J., PAYNE, M. A., BYRUM, C. E., STEFFENS, D. C., KRISHNAN, K. R. R. Reduction of orbital frontal cortex volume in geriatric depression. **Biol. Psychiatry**. v. 48, p.971-975, 2000.
- LeDOUX, J. E. Emotion. In: **Handbook of psychology, Section 1, The nervous system, vol. 5. F. Blum, S. R. Geirer, & V. B. Mountcastle (eds.)**. Bethesda, MD: American Physiological Society, 1987, p.419-459.
- LEGROS, J. J. Inhibitory effect of oxytocin on corticotrope function in humans: are vasopressin and oxytocin ying-yang neurohormones? **Psychoneuroendocrinology**, v. 26, p.649-655, 2001.
- LEONARD, B. E. The role of noradrenaline in depression: a review. **J. Psychopathology**. v. 11, p.S39-S47, 1997.
- LICINIO, J., WONG, M. L., The pharmacogenomics of depression. **Pharmacogenomics J**. v. 1, p.175-177, 2001.
- LIND, R. W., JOHNSON, A. K. Subfornical organ-median preoptic connections and drinking and pressor responses to angiotensin II. **J. Neurosci**. v. 2, p.1043-1051, 1982.
- LINO-de-OLIVEIRA, C., SALES, A. J., DEL BEL, E. A., SILVEIRA, M. C. I., GUIMARÃES, F. S. Effects of acute and chronic fluoxetine treatment on restraint stress-induced Fos expression. **Brain Res. Bull**. v. 55, p.747-754, 2001.
- LIU, F. C., DUNNETT, S. B., ROBERTSON, H. A., GRAYBIEL, A. M. Intrastratial grafts derived from fetal striatal primordial. **Exp. Brain Res**. v. 85, p.501-506, 1991.
- LIU, R. Y., UNMEHOPA, U. A., ZHOU, J. N., SWAAB, D. F. Glucocorticoids suppress vasopressin gene expression in human suprachiasmatic nucleus. **J. Steroid. Biochem. Mol. Biol**. v. 98, p.248-253, 2006.
- LU, B., PANG, P. T., WOO, N. H. The yin and yang of neurotrophin action. **Nat Rev Neurosci**. v. 6, p.603-614, 2005.

LUCKI, I. The forced swimming test as a model for core and component behavioral effects of antidepressant drugs. **Behav. Pharmacol.** v. 8, p.523-532, 1997.

LUCKI, I. A prescription to resist proscriptions for murine models of depression. **Psychopharmacology**, (Berl) v. 153, p.395-398, 2001.

MACIEJ KUSMIDER, J. S., PATACH, P., DZIEDZICKA-WASYLEWSKA, M. Effect of citalopram in the modified forced swim test in rats. **Pharmacological Reports**, v. 59, p.785-788, 2007.

MALBERG, J. E. Implications of adult hippocampal neurogenesis in antidepressant action. **J. Psychiatry Neurosci.** v. 29, p.196-205, 2004.

MANJI, H. K., QUIROZ, J. A., SPORN, J. Enhancing neuronal plasticity and cellular resilience to develop novel, improved therapeutics for difficult-to-treat depression. **Biol. Psychiatry.** v. 53, p.707-742, 2003.

MAS, M. Neurobiological correlates of masculine sexual behavior, **Neurosci. Biobehav. Rev.** v. 19, p.261-277, 1995.

MAYBERG, H. S., LIOTTI, M., BRANNAN, S. K., MCGINNIS, S., MAHURIN, R. K., JARABEK, P. A. Reciprocal limbic-cortical function and negative mood: converging PET findings in depression and normal sadness. **Am. J. Psychiatry.** v. 156, p.675-682, 1999.

MAYBERG, H. S., BRANNAN, S. K., TEKELL, J. L. Regional metabolic effects of fluoxetine in major depression: serial changes and relationship to clinical response. **Biol. Psychiatry.** v. 48, p.830-843, 2000.

MEANA, J.J., BARTUREN, F., GARCÍA-SEVILLA, J.A. Alpha 2-adrenoceptors in the brain of suicide victims: increased receptor density associated with major depression. **Biol. Psychiatry.** v. 31, p.471-490, 1992.

MEYNEN, G., UNMEHOPA, U. A., HOFMAN, M. A., SWAAB, D. F., HOOGENDIJK, W. J. Hypothalamic oxytocin mRNA expression and melancholic depression. **Mol. Psychiatry.** v. 12, p.118-119, 2007.

MIZOGUCHI, K., SHOJI, H., IKEDA, R., TANAKA, Y., TABIRA, T. Persistent depressive state after chronic stress in rats is accompanied by HPA axis dysregulation and reduced prefrontal dopaminergic neurotransmission. **Pharmacol. Biochem. Behav.** v. 91, p.170-5, 2008.

MOKRANI, M.C., DUVAL, F., CROCQ, M.A., BAILEY, P., MACHER, J.P. HPA axis dysfunction in depression: correlation with monoamine system abnormalities. **Psychoneuroendocrinology**, v. 22 Suppl 1, p.S63-68, 1997.

MOORE, R. Y., EICHLER, V. B. Loss of a circadian adrenal corticosterone rhythm following suprachiasmatic lesions in the rat, **Brain Res.** v. 42, p.201-206, 1972.

MORELLI, M., PINNA, A., RUIU, S., DEL ZOMPO, M. Induction of Fos-like immunoreactivity in the central extended amygdala by antidepressant drugs. **Synapse**, v. 31, p.1-4, 1999.

MORGAN, J. L., CURRAN, T. Stimulus-transcription coupling in the nervous system: Involvement of the inducible proto-oncogenes fos and jun. **Ann. Rev. Neurosci.** v. 14, p.421-451, 1991.

MORET, C., BRILEY, M. Effect of milnacipran and desipramine on noradrenergic alpha 2-autoreceptor sensitivity. **Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry.** v. 18, p.1063-72, 1994.

MORGAN, S.; GREENBERG, E. M. The regulation and function of *c-fos* and other immediate early genes in the nervous system. **Neuron**, v. 4, p.477-485, 1990.

MORINOBU, S., STRAUSBAUGH, H., TERWILLIGER, R., DUMAN, R. S. Regulation of *c-fos* and NGFI-A by antidepressant treatment. **Synapse**, v. 25, p.313-320, 1997.

MOSES, S.G., ROBINS, E. Regional distribution of norepinephrine and dopamine in brains of depressive suicides and alcoholic suicides. **Psychopharmacol. Commun.** v. 1, p.327-337, 1975.

MILLINS, U. L., GIANUTSOS, G. G., EISON, A. S. Characterization of melatonin-mediated Fos-like immunoreactivity in the ventrolateral suprachiasmatic nucleus of the rat. **J. Rec. Sig. Trans. Res.** v. 19, p.781-801, 1999.

MURPHY, F. C., RUBINSZTEIN, J. S., MICHAEL, A., ROGERS, R. D., ROBBINS, T. W., PAYKEL, E. S., SAHAKIAN, B. J. Decision-making cognition in mania and depression. **Psychol. Med.** v. 31, p.679-693, 2001.

- MUSSELMAN, D. L., NEMEROFF, C. B. The role of corticotropin-releasing factor in the pathophysiology of psychiatric disorders. **Psychiatr. Ann.** v. 23, p.676-681, 1993.
- NAIR, N. P., SHARMA, M. Neurochemical and receptor theories of depression. **Psychiat. J. Univ. Ottawa.** v. 14, p.328-341, 1989.
- NELSON, J. C., MAZURE, C. M., BOWERS, M. B. A preliminary open study of the combination of fluoxetine and desipramine for rapid treatment of major depression. **Arch. Gen. Psychiatry.** v. 48, p.303-307, 1991.
- 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.
- NIBUYA, M., NESTLER, E. J., DUMAN, R. S. Chronic antidepressant administration increases the expression of cAMP response element binding protein (CREB) in rat hippocampus. **J. Neurosci.** v. 16, p.2365-2372, 1996.
- NIERENBERG, A. A., PAPAKOSTAS, G. I., PETERSEN, T., KELLY, K. E., LACOVIELLO, B. M., WORTHINGTON, J. J., TEDLOW, J., ALPERT, J. E., FAVA, M. Nortriptyline for treatment-resistant depression. **J. Clin. Psychiatry.** v. 64, p.35-39, 2003.
- NUNES, E., LOPEZ-CORCUERA, B., VAZQUEZ, J., GIMENEZ, C., ARAGON, C. Differential effects of the tricyclic antidepressant amoxepine on glycine uptake mediated by the recombinant GLYT1 and GLYT2 glycine transporters. **Br. J. Pharmacol.** v. 129, p.200-2006, 2000.
- OLDFIELD, B. J., HARDS, D. K., McKINLEY, M. J. Neurons in the median preoptic nucleus of the rat with collateral branches to the subfornical organ and supraoptic nucleus. **Brain Res.** v. 586, p.86-90, 1992.
- O'MALLEY, P. G., JACKSON, J. L., SANTORO, J., TOMKINS, G., BALDEN, E., KROENKE, K. Antidepressant therapy for unexplained symptoms and symptoms syndromes. **J. Fam. Pract.** v. 48, p.980-990, 1999.
- ONGUR, D., PRINCE, J. L. The organization of networks within the orbital and medial prefrontal cortex of rats, monkeys and humans. **Cereb. Cortex.** v. 10, p.206-219, 2000.

- PANCRAZIO, J. J., KAMATCHI, G. L., ROSCOE, A., LYNCH, C. 3<sup>rd</sup>, inhibition of neuronal Na<sup>+</sup> channels by antidepressant drugs. **J. Pharmacol. Exp. Ther.** v. 284, p.208-241, 1998.
- PAPEZ, J. W. A proposed mechanism of emotion. **Arch. Neurol. Psychiatr.** v. 38, p.725-743, 1937.
- PAXINOS, G., WATSON, C. **Stereotaxic Atlas of the rat brain.** 4<sup>th</sup> ed., New York: Academic Press, 1998.
- PETERSEN, T., DORDING, C., NEAULT, N. B., KORNBLUH, R., ALPERT, J. E., NIERENBERG, A. A., ROSENBAUM, J. F., FAVA, M. A survey of prescribing practices in the treatment of depression. **Prog. Neuro-psychopharmacol. Biol. Psychiatry.** v. 26, p.177-187, 2002.
- PHILLIPS, M. L., DREVETS, W. C., RAUCH, S. L., LANE, R. Neurobiology of emotion perception I: The neural basis of normal emotion perception. **Biol. Psychiatry.** v. 54, p.504-514, 2003.
- PITKÄNEN, A., JOLKKONEN, E., KEMPPAINEN, S. Anatomic heterogeneity of the rat amygdaloid complex. **Folia Morphol. (Warsz)** v. 59, p.1-23, 2000.
- PORSOLT, L. D., ANTON, G., BLAVET, N., JALFRE, M. Behavioral despair in rats: a new model sensitive to antidepressant treatments. **Eur. J. Pharmacol.** v. 47, p.379-391, 1978.
- POST, R. M. Transduction of psychosocial stress into the neurobiology of recurrent affective disorder. **Am. J. Psych.** v. 149, p.999-1010, 1992.
- POWEL, K. B., MIKLOWITZ, D. J. Frontal lobe dysfunction in the affective disorders. **Clin. Psychol. Res.** v. 14, p.525-546, 1994.
- PURBA, J. S., HOOGENDIJK, W. J., HOFMAN, M. A., SWAAB, D. F. Increased number of vasopressin- and oxytocin- expressing neurons in the paraventricular nucleus of the hypothalamus in depression, **Arch. Gen. Psychiatry.** v. 53, p.137-143, 1996.
- RAADSHEER, F. C., HOOGENDIJK, W. J., STAM, F. C., TILDERS, F. J., SAAB, D. F. Increased numbers of corticotropin-releasing hormone expressing neurons in the hypothalamic paraventricular nucleus of depressed patients. **Neuroendocrinology,** v. 60, p.436-444, 1994.



- RAADSHEER, F. C., VAN HEERIKHUIZE, J. J., LUCASSEN, P. J., HOOGENDIJK, W. J., TILDERS, F. J., SAAB, D. F. Corticotropin-releasing hormone mRNA levels in the paraventricular nucleus of patients with Alzheimer's disease and depression. **Am. J. Psychiatry.** v. 152, p.1372-1376, 1995.
- RIBEIRO, M. G., PEREIRA, E. L. A., SANTOS-JESUS, R., DE-SENA, E. P., PETRIBÚ, K., DE-OLIVEIRA, I. R. Nortriptyline blood levels and clinical outcome: a meta-analysis of published studies. **Revista Brasileira de Psiquiatria**, v. 22, p.51-56, 2000.
- RICHELSON, E., NELSON, A. Antagonism by antidepressants of neurotransmitter receptors of normal human brain in vitro. **J. Pharm. Exp. Ther.** v. 230, p.94-102, 1984.
- ROLLS, E. T. **The brain and emotion.** Oxford, UK: Oxford University Press, 1999.
- SAGAR, S. M.; SHARP, F. R.; CURRAN, T. Expression of *c-fos* protein in brain: metabolic mapping at the cellular level. **Science**, v. 240, p.1328-1331, 1988.
- SAPER, C. B., LEVISOHN, D. Afferent connections of the median preoptic nucleus in the rat: anatomical evidence for a cardiovascular integrative mechanism in the anteroventral third ventricular (AV3V) region. **Brain Res.** v. 288, p.21-31, 1983.
- SCORZA, F. A. Neurogenesis and depression: etiology or a new illusion?. **Rev. Bras Psiquiatr.** p.249-253, 2005.
- SEINDENBECHER, T., LAXMI, R., STORK, O., PAPE, H. C. Amygdalar and hippocampal theta rhythm synchronization during fear memory retrieval. **Science**, v. 301, p.846-850, 2003.
- SILVA, S. M., PAULA-BARBOSA, M. M., MADEIRA, M. D. Prolonged alcohol intake leads to reversible depression of corticotrophin-releasing hormone and vasopressin immunoreactivity and mRNA levels in the parvocellular neurons of the paraventricular nucleus. **Brain Res.** v. 954, p.82-93, 2002.
- SHENG, M., GREENBERG, M. E. The regulation and function of *c-fos* and other immediated early genes in the nervous system. **Neuron**, v. 4, p.477-485, 1990.
- SHUMAKE, J., EDWARDS, E., GONZALEZ-LIMA, F. Dissociation of septo-hippocampal metabolism in the congenitally helpless rat. **Neurosci.** v. 114, p.373-377, 2002.

- SINDRUP, S. H., JENSEN, T. S. Efficacy of pharmacological treatments of neuropathic pain: an update and effect related to mechanism of drug action. **Pain**, v. 83, p.398-400, 1999.
- SLEIGHT, A.J., CAROLO, C., PETIT, N., ZWINGELSTEIN, C., BOURSON A. Identification of 5-hydroxytryptamine<sub>7</sub> receptor binding sites in rat hypothalamus: sensitivity to chronic antidepressant treatment. **Mol. Pharmacol.** v. 47, p.99-103, 1995.
- SOARES, J., MANN, J. J. The functional neuroanatomy of mood disorders. **Psychiatr. Res.** v. 31, p.393-432, 1997.
- STAHL, S. M. **Psicofarmacologia: bases neurocientíficas e aplicações clínicas**. Rio de Janeiro: MEDSI – Editora Médica e Científica Ltda, 1998.
- SZYMUSIAK, R., MCGINTY, D. Hypothalamic regulation of sleep and arousal. **Ann. N. Y. Acad. Sci.** v. 1129, p.275-286, 2008.
- SWANSON, L. W. An autoradiographic study of the efferent connections of the preoptic region in the rat. **J. Comp. Neurol.** v. 167, p.227-256, 1976.
- SWEENEY, J. A., KMIEC, J. A., KUPFER, D. J. Neuropsychologic impairments in bipolar and unipolar mood disorders on the CANTAB neurocognitive battery. **Biol. Psychiatry.** v. 48, p.674-685, 2000.
- TAPIA-ARANCIBIA, L., RAGE, F., GIVALOIS, L., ARANCIBIA, S. Physiology of BDNF: focus on hypothalamic function. **Front. Neuroendocrinol.** v. 25, p.77-107, 2004.
- TALBOTT, J., HALES, R., YUDOSKY, S. **Tratado de Psiquiatria**. Porto Alegre: Artes Médicas, 1992.
- THASE, M. E. Mood disorders: neurobiology. In: **Sadock B. J., Sadock, V. P, editors. Kaplan & Sadock's comprehensive textbook of psychiatry**. 7<sup>th</sup> ed. Philadelphia: Williams & Wilking, 1999. p.1285-1298.
- VAN DEN POL, A. N., DUDEK, F. E. Cellular communication in the circadian clock, the suprachiasmatic nucleus. **Neurosci.** v. 56, p.793-811, 1993.
- VAN ESSEVELDT, K. E. L., LEHMAN, M. N., BOER, G. J. The suprachiasmatic nucleus and the circadian time-keeping system revisited. **Brain Res.Rev.** v. 33, p.34-77, 2000.

VEIEL, H. O. A preliminary profile of neuropsychological deficits associated with major depression. **J. Clin. Exp. Neuropsychol.** v. 19, p.587-603, 1997.

WELLMAN, P. J., DAVIES, B. T., MORIEN, A., McMAHON, L. Modulation of feeding by hypothalamic paraventricular nucleus alpha 1- and alpha 2-adrenergic receptors, **Life Sci.** v. 53, p.669-679, 1993.

WEHR, T. A., WIRZ-JUSTICE, A. Circadian rhythm mechanisms in affective illness and in antidepressant drug action. **Pharmacopsychiatry**, v. 15, p.31-39, 1982.

WILLNER, P. Animals models of depression: an overview. **Pharmacology and therapeutics**, v. 45, p.425-455, 1990.

WIRZ-JUSTICE, A. Biological rhythm disturbances in mood disorders. **Int. Clin. Psychopharmacol.** v. 21, p.11-15, 2006.

WOTJAK, C. T., KUBOTA, M., LIEBSCH, G., MONTKOWSKI, A., HOLSBOER, F., NEUMANN, I., LANDGRAF, T. Release of vasopressin within the rat paraventricular nucleus in response to emotional stress: a novel mechanism of regulation adrenocorticotrophic hormone secretion? **J. Neurosci.** v. 16, p.7725-7732, 1996.

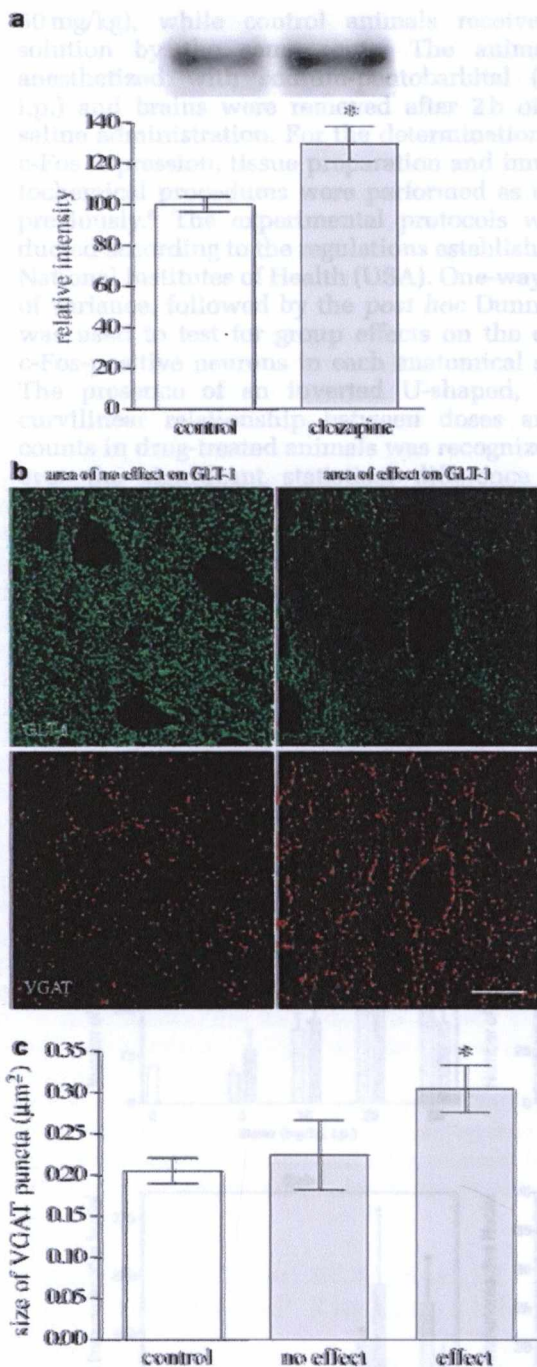
YUKIZAKI, L. M. G., VERAS, A. B., FRANCO, F. S., NOVO, L. D., RASSI, A., NARDI, A. E. Depressão maior e supressão hormonal: resposta com a nortriptilina. **Ver. Psiqu. Clin.** v. 34, p.243-245, 2007.

YOUNG, R. C., ALEXOPOULOS, G. S., SHINDLEDECKER, R., DHAR, A. K., KUTT, H. Plasma 10-hydroxynortriptyline and therapeutic response in geriatric depression. **Neuropsychopharmacology**, v. 1, p.213-215, 1988.

ZHOU, J. N., RIEMERSMA, R. F., UNMEHOPA, U. A., HOOGENDIJK, W. J., VAN HEERIKHUIZE, J. J., HOFMAN, M. A., SWAAB, D. F. Alterations in arginine vasopressin neurons in the suprachiasmatic nucleus in depression. **Arch. Gen. Psychiatry.** v. 58, p.655-662, 2001.

ZOLA-MORGAN, S., SQUIRE, L. R., ALVAREZ-ROYO, P., CLOWER, R. P. Independence of memory functions and emotional behaviour: Separate contributions of the hippocampal formation and the amygdala. **Hippocampus**, v. 1, p.207-220, 1991.

# APÊNDICES



**Figure 1** (a) Immunoblotting of VGAT (15 µg of protein) in the frontal cortex of control and clozapine-treated rats. (b) GLT-1/VGAT double-labeled section showing VGAT IR in areas where GLT-1 is downregulated by clozapine (area of effect on GLT-1) and where it is not downregulated (area of no effect on GLT-1). (c) size of VGAT+ puncta in control and treated rats. In a and c, values are expressed as mean  $\pm$  s.e.m. \* $P < 0.05$ . Scale bar: 30 µm.

L Bragina, M Melone, G Fattorini and F Conti  
 Dipartimento di Neuroscienze, Università Politecnica  
 delle Marche, Torrette di Ancona, Ancona, Italy.  
 E-mail: f.conti@univpm.it

## References

- Roth B, Sheffler DJ, Kroeze WK. *Nat Rev Drug Discov* 2004; **3**: 353–359.
- Homayoun H, Moghaddam B. *Biol Psychiatry* 2007; **61**: 679–687.
- Leveque J-C, Macias W, Rajadhyaksha A, Carlson RR, Barczak A, Kang S *et al.* *J Neurosci* 2000; **20**: 4011–4020.
- Melone M, Vitellaro-Zuccarello L, Vallejo-Illarramendi A, Perez-Samartin A, Matute C, Cozzi A *et al.* *Mol Psychiatry* 2001; **6**: 380–386.
- Lewis DA, Gonzalez-Burgos G. *Nature Med* 2006; **12**: 1016–1022.
- Wojcik SM, Katsurabayashi S, Guillemin I, Friauf E, Rosenmund C, Brose N *et al.* *Neuron* 2006; **50**: 575–587.
- De Gois S, Schafer MK, Defamie N, Chen C, Ricci A, Weihe E *et al.* *J Neurosci* 2005; **25**: 7121–7133.
- Bragina L, Melone M, Fattorini G, Torres-Ramos M, Vallejo-Illarramendi A, Matute C *et al.* *J Neurochem* 2006; **99**: 131–141.
- Chaudry FA, Reimer RJ, Bellocchio EE, Danbolt NC, Osen KK, Edwards RH *et al.* *J Neurosci* 1998; **18**: 9733–9750.
- Minelli A, Alonso-Nanclares L, Edwards RH, DeFelipe J, Conti F. *Neuroscience* 2003; **117**: 337–346.

## c-Fos expression identifies brain areas activated in response to nortriptyline

*Molecular Psychiatry* (2007) **12**, 613–615;  
 doi:10.1038/sj.mp.4001989

This study shows that the administration of nortriptyline induces a pattern of c-Fos expression in the central nervous system of rats that resembles the typical, inverted U-shaped dose–response curve observed in clinical pharmacokinetic studies in humans. This did not occur following the use of desipramine, an alternative noradrenergic antidepressant drug whose clinical efficacy is not associated with this type of dose–response relationship.

Previous studies have suggested that there is an optimum range of nortriptyline blood levels, a therapeutic window above or below which depressed patients respond poorly or do not respond to treatment.<sup>1,2</sup> Our group has demonstrated that there is a biphasic curvilinear relationship between plasma levels of nortriptyline and behavior, using the tail suspension test,<sup>3</sup> an animal model employed to screen for drugs with antidepressant effects. Although noradrenergic drugs are known to induce c-Fos expression in central neurons, only one study has investigated the effects of nortriptyline on the expression of brain c-Fos.<sup>4,5</sup> The magnitude of the therapeutic response observed with various doses of antidepressants may reflect differential activation of distinct brain areas for each dose used; therefore, we hypothesized that different doses of nortriptyline might induce different patterns of brain c-Fos expression in rats.

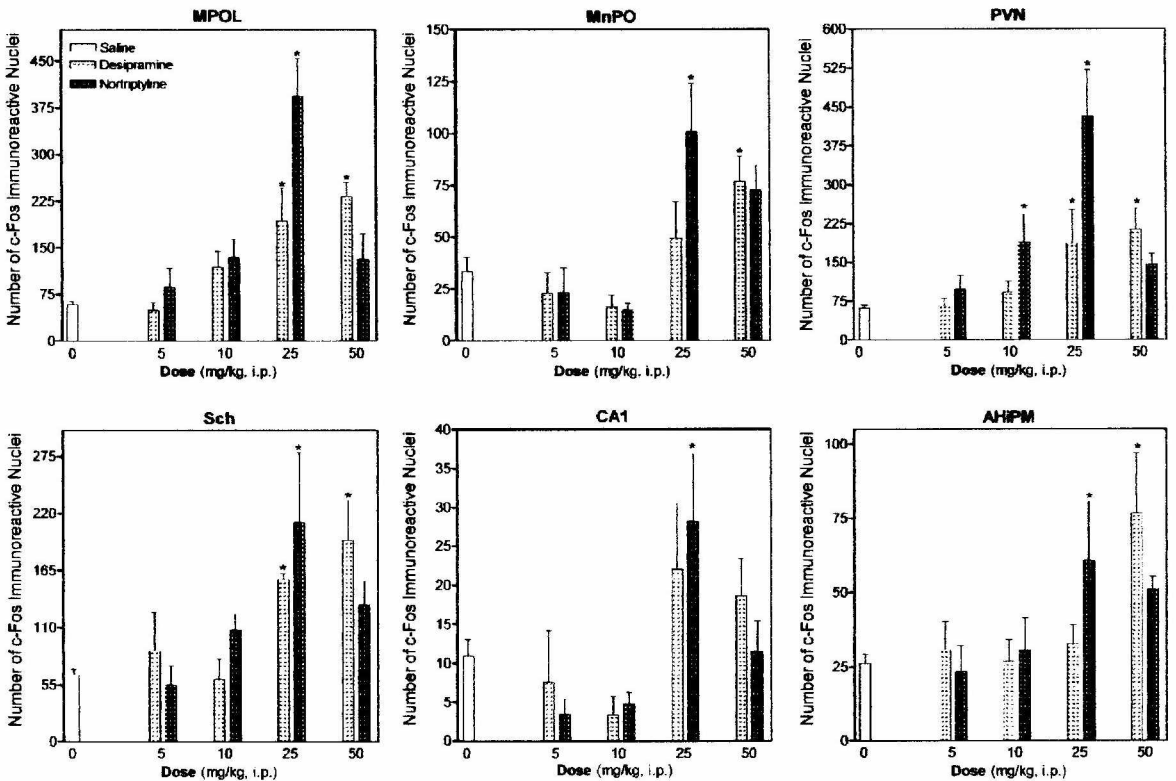
Wistar male rats received intraperitoneal injections of nortriptyline or desipramine (5, 10, 25 and

50 mg/kg), while control animals received saline solution by the same route. The animals were anesthetized with sodium-pentobarbital (40 mg/kg i.p.) and brains were removed after 2 h of drug or saline administration. For the determination of brain c-Fos expression, tissue preparation and immunohistochemical procedures were performed as described previously.<sup>6</sup> The experimental protocols were conducted according to the regulations established by the National Institutes of Health (USA). One-way analysis of variance, followed by the *post hoc* Dunnett *t*-test, was used to test for group effects on the counts of c-Fos-positive neurons in each anatomical structure. The presence of an inverted U-shaped, biphasic, curvilinear relationship between doses and c-Fos counts in drug-treated animals was recognized whenever the significant statistical difference between drug-treated and control animals, evident at the range of doses from 5 to 25 mg/kg, was no longer present at the higher dose of 50 mg/kg.

The present paper includes only the areas in which an inverted U-shaped pattern of c-Fos expression was observed. Figure 1 illustrates brain c-Fos expression after systemic administration of nortriptyline or

desipramine at different doses, or saline (controls). The following hypothalamic areas are shown: lateral medial preoptic nucleus (MPOL), median preoptic nucleus (MnPO), paraventricular nucleus (PVN) and suprachiasmatic nucleus (Sch). The hippocampal region CA1 and the posteromedial hippocampal amygdala (AHiPM) are also shown. Both nortriptyline and desipramine significantly increased c-Fos expression in all these areas. Specifically, in animals treated with nortriptyline, the increase in c-Fos expression observed after the submaximal dose used (25 mg/kg) was not observed with the maximum dose of 50 mg/kg. Conversely, this curvilinear, inverted U-shaped response was not observed with desipramine in the same areas.

Previous studies have shown that c-Fos expression increases in certain regions of the brain in response to nortriptyline and desipramine,<sup>4,5</sup> and the present study extends these findings. Our data also show that in six different areas (MPOL, MnPO, PVN, Sch, CA1, AHiPM), c-Fos activity displays a curvilinear, inverted U-shaped pattern following nortriptyline administration. Several clinical studies suggest a curvilinear, biphasic relationship between plasma



**Figure 1** Brain areas in which c-Fos expression appears as an inverted U-shape pattern following nortriptyline administration. Increased Fos-positive nuclei are associated with the use of nortriptyline at the dose of 25 mg/kg while at the highest dose (50 mg/kg) the number of Fos-positive nuclei is not different from controls. Brain c-Fos expression after desipramine administration does not follow this pattern, continuing to increase as the dose of desipramine rises. The following areas are shown: lateral medial preoptic nucleus (MPOL), median preoptic nucleus (MnPO), paraventricular nucleus (PVN), suprachiasmatic nucleus (Sch), nuclei in the posteromedial hippocampal amygdala (AHiPM) and the CA1 area of hippocampus. Data are expressed as mean  $\pm$  sem. \* $P < 0.05$ .

levels and clinical outcome in nortriptyline-treated, depressed patients. This curvilinear relationship has also been clearly demonstrated using nortriptyline (but not desipramine) in the tail suspension test, an animal model for screening antidepressant drugs, in which a self-inhibiting effect of nortriptyline is evident when high doses are used.<sup>3</sup> Thus, our findings show that the observed clinical therapeutic window found for nortriptyline is mimicked in certain brain areas at molecular level, as measured by c-Fos expression.

The mechanisms explaining the inverted U-shaped dose-response effect of nortriptyline in clinical practice require further elucidation. The occurrence of a similar phenomenon regarding c-Fos expression in the group of animals receiving nortriptyline demonstrated here also needs clarification. There is some evidence that hydroxy-metabolites may be involved in the self-inhibiting effect of nortriptyline.<sup>7</sup> Indeed, nortriptyline-treated, depressed patients with high plasma levels of E-10-OH-nortriptyline have been shown to respond poorly or not at all to the treatment. In this situation, the self-inhibitory effect of nortriptyline may be explained by the fact that, at high doses, increased plasma levels of nortriptyline hydroxy-metabolites with lower therapeutic efficacy exert a pharmacological competition with the parent compound, reducing its effect. Additionally, some of the brain areas in which the pattern of c-Fos expression appears as an inverted U-shaped dose-response curve are related to depression. Indeed, altered hippocampal volume detected by neuroimaging studies has been reported in humans.<sup>8</sup> Also, the hypothalamic areas studied here are involved in the regulation of hypothalamic-pituitary-adrenal function, a neuroendocrine axis that is closely related to the mechanisms triggering and maintaining depression.<sup>9,10</sup>

The data presented here suggest that the MPOL, MnPO, PVN, Sch, CA1 and AHIPM may be involved in depression and that functional image-based protocols should be used to scrutinize their function in depressed patients.

MG Ribeiro<sup>1</sup>, IR de Oliveira<sup>1</sup>, RC Santana<sup>2</sup>, DT Costa<sup>1</sup>,  
LC Quarantini<sup>1</sup>, E de Castro e Silva<sup>2</sup> and  
JB Fregoneze<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Department of Neuropsychiatry, School of Medicine, Federal University of Bahia, Salvador, Bahia, Brazil and <sup>2</sup>Department of Physiology, Health Sciences Institute, Federal University of Bahia, Salvador, Bahia, Brazil

E-mail: irismar.oliveira@uol.com.br

## References

- 1 Asberg M, Chronholm B, Sjoqvist F, Tuck D. *BMJ* 1971; **3**: 331–334.
- 2 Ribeiro MG, Pereira ELA, Santos-Jesus R, de-Sena EP, Petribú K, de-Oliveira IR. *Rev Br Psiq* 2000; **22**: 51–56.

- 3 De-Oliveira IR, Diquet B, Van der Meersch V, Dardennes R, Gonidec J, Prado-Lima PA. *Psychopharmacology* 1990; **102**: 553–556.
- 4 Beck CH. *J Psychiatry Neurosci* 1995; **20**: 25–32.
- 5 Dahmen N, Fehr C, Reuss S, Hiemke C. *Biol Psychiatry* 1997; **42**: 317–323.
- 6 Fraga IC, Fregoneze JB, Carvalho FLQ, Dantas KB, Azevedo CS, Pinho CB *et al.* *Neuroscience* 2005; **134**: 327–334.
- 7 Young RC, Alexopoulos GS, Shindlerdecker R, Dhar AK, Kutt H. *Neuropsychopharmacology* 1988; **1**: 213–215.
- 8 Sheline YI, Gado MH, Kraemer HC. *Am J Psychiatry* 2003; **160**: 1516–1518.
- 9 Gillespie CF, Nemeroff CB. *Psychosom Med* 2005; **67**(Suppl 1): S26–S28.
- 10 Plotsky PM, Owens MJ, Nemeroff CB. *Psychiatr Clin N Am* 1998; **21**: 293–307.

## CREB1 haplotypes and the relative reinforcing value of nicotine

*Molecular Psychiatry* (2007) **12**, 615–617;  
doi:10.1038/sj.mp.4002002

Genetic and pharmacological studies in mice have demonstrated an important role of the  $\mu$ -opioid receptor (MOR) and cAMP responsive element-binding protein (CREB) in nicotine reward/dependence. We tested for an interaction between these two genes (*OPRM1* and *CREB1*) in a human pharmacogenetic laboratory study.

Preclinical studies support the importance of both CREB and MOR in nicotine reward.<sup>1</sup> Nicotine increases phosphorylation of CREB (P-CREB) in the ventral tegmental area,<sup>1</sup> while nicotine withdrawal decreases P-CREB.<sup>2</sup> Nicotine-induced P-CREB increase is absent in MOR<sup>-/-</sup> knockout (KO) mice and is also blocked by the MOR antagonist naloxone in wild-type mice.<sup>1</sup> The MOR promoter has a cAMP-responsive element that binds P-CREB, which is thought to drive expression of MOR.<sup>1,3</sup> Finally, the CREB <sup>$\Delta$</sup> -/- KO and MOR<sup>-/-</sup> KO mice do not exhibit nicotine-conditioned place preference.<sup>1,4</sup>

We translated these findings to a human behavioral pharmacology investigation testing the role of MOR in the relative reinforcing value of nicotine.<sup>5</sup> We focused the genetic analysis on the functional *OPRM1* A118G variant in exon1, for which the G allele is associated with reduced mRNA and protein levels.<sup>6</sup> Here, we report new data on the interacting effects of *CREB1* and *OPRM1* in nicotine reward. As described previously,<sup>5</sup> 60 smokers (30 homozygous for the wild-type *OPRM1* A118G A/A and 30 with at least one *OPRM1* G allele) participated in a within-subject, double-blind investigation of effects of the MOR antagonist naltrexone (NTX) vs placebo on the relative reinforcing value of nicotine. We used a