

EGBERTO MUNHOZ

**Administração subcrônica de nicotina modifica
as respostas neuroendócrina e neuroquímica
induzidas pelo teste de natação forçada**

Tese apresentada ao Programa
Interinstitucional de Pós-graduação em
Ciências Fisiológicas – PIPGCF
UFSCar/UNESP, como parte dos
requisitos para obtenção do título de
Doutor em Ciências Fisiológicas

Área de concentração:
neuropsicofarmacologia

Orientadora: Profa. Dra. Cleopatra da
Silva Planeta

Araraquara

2010

Autorizo a reprodução e divulgação total ou parcial deste trabalho, por qualquer meio convencional ou eletrônico, para fins de estudo e pesquisa, desde que citada a fonte.

Ficha Catalográfica

Elaborada Pelo Serviço Técnico de Biblioteca e Documentação
Faculdade de Ciências Farmacêuticas
UNESP – Campus de Araraquara

M966 a Munhoz, Egberto
 Administração subcrônica de nicotina modifica as respostas
 neuroendócrina e neuroquímica induzidas pelo teste de natação forçada /
 Egberto Munhoz. – São Carlos, 2010
 92 f.

 Tese (Doutorado) – Universidade Federal de São Carlos. Programa
 Interinstitucional de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas Associação
 ampla UFSCar / Unesp
 Orientador: Cleópatra da Silva Planeta

 1. Natação forçada. 2. Nicotina. I. Planeta, Cleópatra da Silva. orient. II.
 Título.

MUNHOZ, E. **Administração subcrônica de nicotina modifica as respostas neuroendócrina e neuroquímica induzidas pelo teste de natação forçada.** Tese apresentada ao Programa Interinstitucional de Pós-graduação em Ciências Fisiológicas – Associação Ampla UFSCar/UNESP para obtenção do título de Doutor em Ciências Fisiológicas.

Aprovado em: 13 de dezembro de 2010

Banca Examinadora

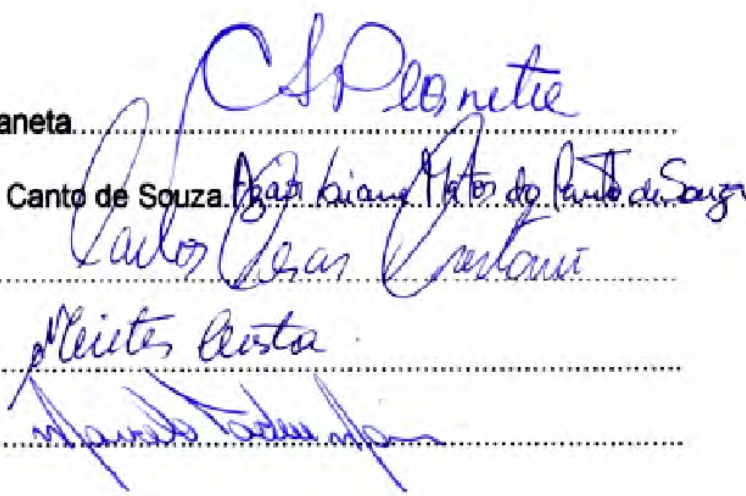
Prof^ª. Dr^ª. Cleopatra da Silva Planeta.....

Prof^ª. Dr^ª. Azair Liane Matos do Canto de Souza.....

Prof. Dr. Carlos César Crestani.....

Prof^ª. Dr^ª. Mirtes Costa.....

Prof. Dr. Marcelo Tadeu Marin.....



Dedicatória

Aos meus pais, a quem dedico todo este trabalho.

“O valor das coisas não está no tempo em que elas duram,
mas na intensidade com que acontecem.
Por isso existem momentos inesquecíveis,
coisas inexplicáveis e pessoas incomparáveis”.

Fernando Pessoa

Agradecimentos

A **Deus**, pela vida, pela grandeza de suas criações, fontes inesgotáveis de nossas pesquisas que revelam a lição de harmonia com que nos rege e nos relaciona, e por seus ensinamentos, alimentos da alma.

Aos meu pais, **Rubens e Cida**, que sempre muito presentes em minha vida, constituem meu suporte fundamental e incondicional à conquista das minhas realizações. Sou grato aos preceitos que me inculcaram, na labuta diária da educação firme misturada ao carinho paternal. Meu eterno agradecimento pela sorte de tê-los como meus pais !

Aos meus irmãos, **Valery, Everton e Maurício**, assim como os mais novos trazidos com os casamentos, **Fernando, Carina e Clari**. Sou grato pelas palavras de apoio e otimismo que me impulsionaram ao longo destes anos de trabalho. Que a distância que nossas profissões obrigam nunca nos separe ou quebre os elos que mantém nossa família exemplarmente unida... Aos meus sobrinhos, **Isadora, Eduardo, Vitória, Beatriz, Marina e Júlia**, que a vida trouxe em pequeninos pacotes de alegrias e bênçãos.

A **Lilian Ferreira de Lima**, que personifica o significado de amigo incondicional e onipresente.

De maneira muito carinhosa, agradeço minha orientadora **Cleopatra da Silva Planeta**. Profissional de competência exemplar, nestes anos de convivência não pude deixar de notar sua intensa dedicação e rigor ao papel de orientadora e pesquisadora, sem deixar de lado a educação, o fino trato e o coleguismo, que a faz singular. Agradeço sua paciência e, principalmente, a compreensão para permitir

que me eu me afastasse do laboratório para assumir a vaga do concurso de Londrina. Agradeço também esta oportunidade de doutoramento e por ter creditado em mim a responsabilidade deste trabalho. Saiba que levarei comigo as melhores recordações e a terei como um grande exemplo de sucesso para as minhas tentativas de professor e pesquisador !

Aos amigos de laboratório, **Fábio, Marcelo, Rodrigo, Paulo, Roberta, Ana Paula, Karina, Tarciso, Alianda, Paulo José, Leonardo, Lyane, Ana Cláudia, Bruna, Thiago, Renata, Crusca** e várias outras pessoas que fizeram destes quatro anos momentos mais agradáveis e “suportáveis”. Em especial, gostaria de agradecer três amigas que guardarei no coração de forma bastante carinhosa: **Yara**, pela companhia agradável, pelos risos e pelo coração enorme; **Joyce**, pela idoneidade moral e princípios e, é claro, por repartir comigo a paixão pelo tango; **Vanessa**, pela presença constante nas alegrias e pelas sábias palavras de apoio e incentivo que me orientaram a melhor enfrentar as angústias da pós-graduação e da vida de professor.

Aos professores do laboratório **Ricardo L. Nunes de Souza, Francisco Fracasso, Maria do Carmo Longo** pela amizade e pelo incentivo.

As técnicas do laboratório de farmacologia **Bete e Rosana**. Além da ajuda fundamental na realização dos experimentos deste trabalho, agradeço a amizade, a generosidade e o carinho que me deram nestes anos de convivência. Também agradeço a eficiente **Tirene**. Sempre prestativa e muito dedicada, não me esquecerei da sua forma despojada de levar a vida !

Agradeço os professores do Laboratório de Toxicologia e do Laboratório de Biologia Molecular por disponibilizarem seus laboratórios à realização dos experimentos. Também agradeço a equipe técnica do Biotério da UNESP/Campus Araraquara.

A **FAPESP**, pelo apoio financeiro.

E a todos que comigo conviveram e colaboraram para a conclusão de mais esta etapa.

Meus sinceros agradecimentos,

Egberto

RESUMO

MUNHOZ, E. **Administração subcrônica de nicotina modifica as respostas neuroendócrina e neuroquímica induzidas pelo teste de natação forçada**. 2010. 92 f. Tese (Doutorado) – Programa Interinstitucional de Pós-graduação em Ciências Fisiológicas UFSCar/UNESP, Araraquara, 2010.

O estresse, atualmente, é considerado um fator importante na fisiopatologia de muitos distúrbios psiquiátricos. Embora os efeitos do estresse agudo possam ser contrabalanceados por respostas adaptativas, o estresse intenso, repetido ou prolongado pode eliciar alterações neuronais duradouras que constituirão as bases de doenças psiquiátricas, como a depressão. Levantamentos epidemiológicos também mostram elevada prevalência de tabagistas entre pacientes com depressão maior. Estas altas taxas de comorbidade sugerem uma provável relação causal: pacientes com depressão proeminente procurariam a nicotina para alívio dos sintomas. Assim, este trabalho investigou as alterações neuroquímicas e neuroendócrinas mediadas pela nicotina na resposta de adaptação ao estresse, utilizando-se, para tanto, o teste modificado da natação forçada (TNF). Para tanto, ratos Wistar machos foram submetidos ao TNF (30 cm de água, $24 \pm 1^\circ\text{C}$) por 15 min e tratados (1, 19 e 23h) com nicotina (NIC: 0,5 mg/kg, sc), imipramina (IMI: 15 mg/kg, ip) ou salina (SAL). Uma hora após a última injeção, os animais foram reexpostos (5 min) à mesma cuba. Imediatamente após o teste, os animais foram sacrificados; o hipocampo dorsal (HD) e ventral (HV), hipotálamo (HT) e os núcleos dorsal (DR) e mediano (MR) da rafe foram coletados por punch para quantificação de 5-HT, 5-HIAA e NA por HPLC e o sangue, para quantificação da corticosterona plasmática por radioimunoensaio. O hipocampo total também foi utilizado para avaliar a expressão do receptor serotoninérgico 5-HT_{1A} e do glicorreceptor (GR) por *western blot*. Ainda, avaliou-se o efeito da prazosina nas alterações neuroquímicas induzidas pelo TNF. O tratamento subcrônico com NIC e IMI reduziu em 39% e 50%, respectivamente, o parâmetro de imobilidade e aumentou em 52% e 66%, respectivamente, as contagens de escalada, em relação ao grupo SAL. No HV, HD e

HT, a NIC e a IMI não alteraram o aumento do conteúdo tecidual de 5-HT e 5-HIAA induzido pelo TNF. No DR, a NIC reduziu em 38% e 30% o conteúdo de 5-HT e NA, respectivamente, nos animais expostos ao TNF. O tratamento com NIC também reduziu em 51,4% o aumento de 336% da corticosterona basal após exposição ao TNF. A IMI, por outro lado, não alterou significativamente a hipercorticosterolemia induzida pelo TNF. Ambos os tratamentos não alteraram a expressão do receptor 5-HT_{1A} nos animais expostos ao TNF. No entanto, nos animais tratados com NIC e sem exposição ao TNF, a expressão do GR foi reduzida em aproximadamente 78%. A administração prévia de prazosina promoveu queda de 38% e 63% no conteúdo de NA no MR e DR, respectivamente. Foi possível verificar também pequena diminuição no conteúdo de 5-HT no DR e HD. Estes dados sugerem que a nicotina é capaz de contrabalancear as alterações neuroendócrinas induzidas pelo estresse de natação forçada via modulação da liberação de 5-HT e NA em regiões como hipocampo, hipotálamo e rafe. Ainda, os dados sugerem que a nicotina e a imipramina afetam de formas distintas as alterações neuroquímicas induzidas pelo TNF.

Palavras-chaves: Natação forçada. Nicotina.

ABSTRACT

MUNHOZ, E. **Subchronic nicotine administration modifies the forced swimming test induced-neuroendocrine and neurochemical responses.** 2010. 92 f. Tese (Doutorado) – Programa Interinstitucional de Pós-graduação em Ciências Fisiológicas UFSCar/UNESP, Araraquara, 2010.

Stress is considered a key component in the pathophysiology of several psychiatric diseases. Although the effects of acute stress can be counterbalanced by adaptative responses, intense, repeated or prolonged stress can elicit long lasting neuronal alterations that are related to the occurrence of psychiatric disorders, such as depression. Epidemiological studies have also identified a high prevalence of smokers among depressive patients. These observations suggest a causal relationship: smoking is a self-medication effort to alleviate some symptoms of depression by nicotine. Then, this study investigated nicotine mediated-neurochemical and neuroendocrine alterations in the adaptation response to stress. The modified forced swimming test (FST), a protocol originally employed for screening new antidepressant drugs, was employed. Male Wistar rats were placed individually into a container (30-cm of water, $24\pm 1^{\circ}\text{C}$, 15 min - pretest). Then animals received nicotine (0.5 mg/kg, s.c.), imipramine (15 mg/kg, i.p.) or saline injections at 1, 19 and 23h after the pretest. One hour after the injections, animals were placed in the same container for 5 min. Immediately after, the animals were sacrificed; dorsal (DH) and ventral (VH) hippocampus, hypothalamus (HT) and dorsal (DR) and median (MR) raphe nuclei were collected by punch for measurement of 5-HT, 5-HIAA and NA by HPLC (expressed in ng/mg tissue). Blood samples were collected for determination of plasma corticosterone levels by radioimmunoassay. The whole hippocampus was also used to evaluate the expression of the 5-HT_{1A} serotonergic receptor and glucocorticoid receptor by western blot. The effects of prazosin in TNF induced-neurochemical alterations was also evaluated. Nicotine and imipramine decreased in 39% and 50%, respectively, the immobility behavior and increased in 52% and 66%, respectively, the climbing scores, in relation to saline group. In the

DH, VH and HT, neither nicotine nor imipramine modified the FST induced-increase in 5-HT and 5-HIAA tissue content. In the DR, nicotine decreased in 38% and 30%, respectively, the 5-HT and NA content in the animals exposed to FST. Nicotine also reduced in 51,4% the increase (336%) in the basal corticosterone after exposition to FST. On the other hand, imipramine did not change the FST induced-high levels of corticosterone. Both treatments did not alter the 5-HT_{1A} expression in the animals exposed to FST. However, in the nicotine-treated animals, which were not exposed to stress, glucocorticoid receptor expression was decreased by 78%. Previous administration of prazosin decreased in 38% and 63% the NA content in the MR and DR, respectively. It was also detected a decrease in the 5-HT content in the DR and DH. The data suggest that the neuroendocrine effects of nicotine are related to the NA modulation of 5-HT release in DR, hippocampus and hypothalamus. The data also suggest that nicotine and imipramine display distinct effects on FST-induced neurochemical changes.

Keywords: Forced swimming. Nicotine.

Lista de Ilustrações

Figura 1 - Eixo hipotálamo-hipófise-adrenal, evidenciando o mecanismo de retroalimentação negativa (setas tracejadas) dos glicocorticóides sobre sua própria liberação.....	21
Figura 2 - Mecanismos intracelulares da ação dos glicorreceptores	23
Figura 3 - Representação esquemática dos dois subtipos mais comuns de nAChRs no SNC	31
Figura 4 - Comportamentos exibidos pelos ratos quando submetidos ao teste modificado da natação forçada: imobilidade, natação e escalada	39
Figura 5 - Banda referente à detecção do receptor serotoninérgico 5-HT _{1A}	42
Figura 6 - Exemplos da fluorescência detectada para o GR e β -actina	44
Figura 7 - Estruturas encefálicas obtidas por minipunches com suas respectivas coordenadas	47
Figura 8 - Comportamentos de imobilidade, natação e escalada a cada 5 segundos no teste de 5 minutos do TNF, após o tratamento subcrônico com nicotina (0,5 mg/kg, s.c.) ou imipramina (15 mg/kg, i.p.)	54
Figura 9 - Efeitos do tratamento subcrônico com nicotina ou imipramina nas concentrações teciduais de 5-HT (A), 5-HIAA (B) e no turnover (C) após a exposição ao estresse de natação forçada no hipocampo dorsal (HD), ventral (HV) e hipotálamo (HT)	56
Figura 10 - Efeitos do tratamento subcrônico com nicotina ou imipramina nas concentrações teciduais de 5-HT (A), 5-HIAA (B) e no turnover (C) após	

exposição ao estresse de natação forçada no núcleo dorsal (DR) e mediano (MR) da rafe	58
Figura 11 - Efeitos do tratamento subcrônico com nicotina ou imipramina nas concentrações teciduais de NA no hipocampo dorsal (HD), ventral (HV) e hipotálamo (HT) (A) e núcleo dorsal (DR) e mediano (MR) da rafe (B), após exposição ao estresse de natação forçada	60
Figura 12 - Concentrações plasmáticas de corticosterona após o tratamento subcrônico com nicotina (NIC 0,5 mg/kg, s.c.), imipramina (IMI 15 mg/kg, i.p.) ou salina (SAL), com (barras escuras) ou sem (barras claras) exposição ao TNF	62
Figura 13 - Efeitos da adrenalectomia na resposta neuroquímica ao tratamento subcrônico com nicotina ou imipramina e exposição a natação forçada	63
Figura 14 - Efeitos do tratamento subcrônico com nicotina ou imipramina e exposição à natação forçada na densidade do receptor 5-HT _{1A} no hipocampo total	64
Figura 15 - Alterações da ativação do GR induzidas pelo tratamento subcrônico com nicotina ou imipramina e/ou TNF	65
Figura 16 - Efeitos da prazosina nas concentrações teciduais de 5-HT, 5-HIAA e noradrenalina induzidas pelo TNF, no hipocampo dorsal (HD), ventral (HV), hipotálamo (HT) e núcleo dorsal (DR) e mediano (MR) da rafe	66

Lista de Abreviaturas e Siglas

5-HIAA: ácido 5-hidroxiindoleacético

5-HT: serotonina (5-hidroxitriptamina)

ACTH: hormônio adrenocorticotrópico

ADX: adrenalectomia

AP-1: activator protein 1

BDNF: brain-derived neurotrophic factor

CREB: cAMP response element-binding

CRH: hormônio liberador da corticotropina

DR: núcleo dorsal da rafe

FGF: *fibroblast growth factor*

GR: glicorreceptor

GRE: elementos de resposta a glicocorticóide

HD: hipocampo dorsal

HPA: eixo hipotálamo-hipófise-adrenal

HPLC: cromatografia líquida de alta performance

HSP: proteínas de choque térmico

HT: hipotálamo

HV: hipocampo ventral

i.m.: intramuscular

i.p.: intraperitoneal

IMI: grupo imipramina

MAO: monoaminoxidase

MR: núcleo mediano da rafe

NA: noradrenalina

nAChR: receptor colinérgico nicotínico neuronal

NF- κ B: nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells

NIC: grupo nicotina

POMC: proopiomelanocortina

PVN: núcleo paraventricular do hipotálamo

SAL: grupo salina

SNC: sistema nervoso central

TNF: teste de natação forçada

v.o.: via oral

Sumário

1 Introdução	18
1.1 Mecanismos hormonais e neuroquímicos de adaptação ao estresse	20
1.2 Consequências da mal-adaptação ao estresse	25
1.3 Estresse, depressão e a relação com a dependência à nicotina	30
2 Objetivos	35
3 Material e métodos	37
3.1 Animais	38
3.2 Fármacos	38
3.3 Teste de natação forçada	38
3.4 Determinação de 5-HT, 5-HIAA e NA por HPLC	39
3.5 Determinação de corticosterona	40
3.6 Adrenalectomia	41
3.7 Ensaio de Western Blotting para o receptor 5-HT _{1A}	41
3.8 Ensaio de Western Blotting para a fração nuclear glicorreceptor	43
4 Delineamento experimental	45
4.1 Efeito do tratamento subcrônico com nicotina ou imipramina nos parâmetros comportamentais do TNF	46
4.2 Avaliação das alterações neuroquímicas após tratamento subcrônico com nicotina ou imipramina e exposição ao TNF	46
4.3 Avaliação das alterações da concentração plasmática de corticosterona após tratamento subcrônico com nicotina ou imipramina e exposição ao TNF.....	49
4.4 Avaliação das alterações na transmissão serotoninérgica, após exposição ao TNF e tratamento subcrônico com nicotina ou imipramina e adrenalectomia	49
4.5 Avaliação das alterações do receptor serotoninérgico 5-HT _{1A} induzidas pelo TNF e pelo tratamento subcrônico com nicotina ou imipramina	50

4.6	Avaliação das alterações na expressão do GR induzidas pelo TNF e pelo tratamento subcrônico com nicotina ou imipramina	50
4.7	Avaliação do efeito do prazosina nas alterações neuroquímicas induzidas pelo TNF	51
4.8	Análise estatística	51
5	Resultados	53
5.1	Efeito do tratamento subcrônico com nicotina ou imipramina nos parâmetros comportamentais do TNF	54
5.2	Avaliação das alterações neuroquímicas após tratamento subcrônico com nicotina ou imipramina e exposição ao TNF	55
5.3	Avaliação das alterações da concentração plasmática de corticosterona após tratamento subcrônico com nicotina ou imipramina e exposição ao TNF	62
5.4	Avaliação das alterações na transmissão serotoninérgica após exposição ao TNF e tratamento subcrônico com nicotina ou imipramina e adrenalectomia	63
5.5	Avaliação das alterações do receptor serotoninérgico 5-HT _{1A} induzidas pelo TNF e pelo tratamento subcrônico com nicotina ou imipramina	64
5.6	Avaliação das alterações na expressão do GR induzidas pelo TNF e pelo tratamento subcrônico com nicotina ou imipramina	64
5.7	Avaliação do efeito da prazosina nas alterações neuroquímicas induzidas pelo TNF	65
6	Discussão	68
6.1	Natação forçada como modelo de estresse	69
6.2	Alterações neuroquímicas e neuroendócrinas induzidas pela natação forçada	71
6.3	Efeitos da nicotina nas alterações neuroquímicas e neuroendócrinas induzidas pela natação forçada	76
6.4	Efeitos da imipramina nas alterações neuroquímicas e neuroendócrinas induzidas pela natação forçada	78

7 Conclusões	80
Referências bibliográficas	82

1 Introdução

*A*tualmente, o estresse é considerado por estudiosos e clínicos o grande mal do século, principalmente em uma sociedade em mutação como a nossa, na qual as mudanças surgem de forma frenética e, muitas vezes, demasiadamente rápido para permitirem aos indivíduos a incorporação do seu ritmo e do seu significado.

Toda mudança que exija adaptação por parte do organismo causa um certo nível de estresse. Além das causas externas de estresse, muitas vezes facilmente reconhecidas, existem causas internas, nem sempre tão perceptíveis por serem consideradas atributos da própria personalidade. Expectativas, desejos, auto-cobrança, ansiedade são estados emocionais que podem assumir a função de geradores de estados tensionais. Ainda, a determinação do nível de estresse que será experimentado também é mediada por dois outros fatores importantes: o repertório de estratégias de *coping* e a vulnerabilidade individual ao estresse (LIPP, 2001).

Em certas circunstâncias, abalos da resistência física e mental do indivíduo podem ocorrer, dando origem a inúmeras doenças psicofisiológicas que podem ser interpretadas como tendo em sua gênese o estresse excessivo. Desta forma, o papel do estresse no estabelecimento de comorbidades, a exemplo da dependência a substâncias psicoativas, tem sido largamente reconhecido na rotina das clínicas psiquiátricas e tem se tornado alvo de muitas pesquisas.

1.1 Mecanismos hormonais e neuroquímicos de adaptação ao estresse

Estresse, segundo Hans Selye (1936), pode ser definido como uma síndrome de adaptação generalizada que surge em resposta a situações adversas potenciais ou reais. Neste contexto, inclui-se a liberação de substâncias, moléculas mediadoras da resposta ao estresse, que podem atuar em populações neuronais específicas desencadeando uma complexa cascata de efeitos orgânicos e comportamentais que permitem a adaptação e sobrevivência às condições adversas desencadeantes e a restauração da homeostasia.

As respostas adaptativas aos estressores são determinadas levando-se em conta tanto as características do estressor (tipo, duração, intensidade, etc) quanto as características do indivíduo (idade, sexo, genética, contexto social, etc). Essa gama de parâmetros que perfazem o evento estressor determina a participação de diferentes mediadores que, ao ativar circuitos neuronais distintos, geram respostas diferentes (JOËLS; BARAM, 2009). Entre os mediadores da resposta ao estresse, destacam-se os neurotransmissores, peptídeos como o hormônio liberador da corticotropina (CRH) e os hormônios esteróides cortisol e corticosterona.

A primeira etapa da resposta neuroendócrina ao estresse compreende a liberação de adrenalina pela medula adrenal e glicocorticóides, via ativação do eixo hipotálamo-hipófise-adrenal (HPA). A atividade do eixo HPA é governada pela secreção de CRH e vasopressina no núcleo paraventricular do hipotálamo (PVN) após estímulo pelo evento estressante. A vasopressina, via ativação de receptores V1b, exerce fraca estimulação das células corticotróficas, porém potencia marcadamente os efeitos do CRH (ARMARIO, 2010). Assim, por sua vez, o CRH ativa a secreção de proopiomelanocortina (POMC) pelas células corticotróficas da hipófise anterior. A POMC, por ação de endopeptidases, é clivada, dando origem ao

hormônio adrenocorticotrófico (ACTH), que então, na circulação periférica, estimula a secreção de glicocorticóides pelo córtex da glândula adrenal. Embora os glicocorticóides regulem a função de quase todos os tecidos do corpo, o efeito fisiológico mais conhecido desses hormônios é a auto-regulação negativa do próprio eixo HPA (figura 1). Assim, a princípio, a resposta adaptativa ao estresse e o restabelecimento da homeostasia compreendem uma ativação aguda ou de duração limitada do eixo HPA (JURUENA; CLEARE; PARIANTE, 2004; LANFUMEY et al., 2008).

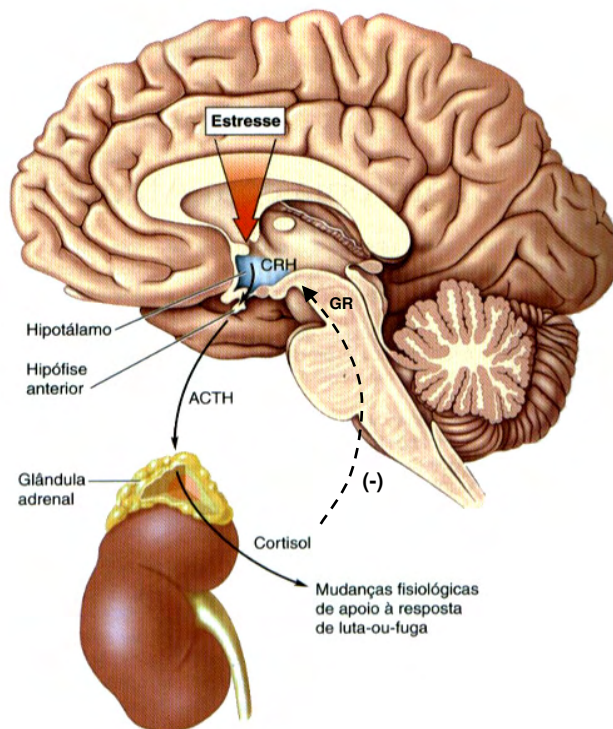


Figura 1 - Eixo hipotálamo-hipófise-adrenal, evidenciando o mecanismo de retroalimentação negativa (setas tracejadas) dos glicocorticóides sobre sua própria liberação.

(Fonte: <http://www.psiquiatriageral.com.br/cerebro/texto13.htm>, data de acesso: 25/05/2010)

Os corticosteróides são altamente lipossolúveis e se difundem rapidamente pelas membranas celulares, promovendo o restabelecimento da homeostasia via ativação de dois tipos de receptores intracelulares: os mineralorreceptores e os glicorreceptores (GR) (LANFUMEY et al., 2008; SPIGA; LIGHTMAN et al., 2009).

No sistema nervoso central, os mineralorreceptores são encontrados principalmente na formação hipocampal, septo lateral, amígdala, núcleo paraventricular do hipotálamo (PVN) e *locus coeruleus* e possuem alta afinidade por corticosteróides, estando predominantemente ocupados (90%) mesmo frente a concentração hormonais basais. Por outro lado, os GRs apresentam afinidade dez vezes menor ($K_d \sim 5nM$), sendo ocupados somente em situações em que os corticosteróides circulantes encontram-se bastante elevados, tal como no pico diurno do ciclo circadiano ou após exposição a eventos estressantes. Os GRs apresentam distribuição mais ampla no encéfalo, com altas densidades no hipocampo, PVN, *locus coeruleus* e o núcleo dorsal da rafe. No hipocampo, os GRs são encontrados principalmente nas regiões CA1 e CA2 (LANFUMEY et al., 2008; JOËLS; BARAM, 2009) e a alta densidade desse receptor faz dessa estrutura um ponto crítico da regulação da própria liberação dos glicocorticóides, via eixo HPA.

Na ausência do ligante endógeno, a forma inativa do GR reside essencialmente no citoplasma em associação com um complexo multimérico de proteínas chaperonas moleculares, incluindo diversas proteínas de choque térmico (HSPs) e imunofilina. Após ser acoplado ao esteróide, o GR sofre uma alteração de conformação, dissocia-se do complexo das proteínas chaperonas, dimeriza-se e é translocado do citoplasma para o núcleo. No núcleo, o GR medeia a regulação transcricional através da ligação a sequências específicas de DNA denominadas elementos de resposta a glicocorticóide (GRE), processo denominado trans-ativação (figura 2). O efeito transcricional pode ser tanto o aumento quanto a repressão da expressão gênica se o GR se liga a GREs positivos ou negativos, respectivamente. GRs também atuam indiretamente através da modulação da expressão gênica de fatores transcricionais, como por exemplo o NF- κ B, AP-1 e CREB (HEITZER et al., 2007, LANFUMEY et al., 2008). Desta forma, a ativação de GRs no hipocampo causa alterações na expressão de diversos genes responsáveis pelo metabolismo celular, estrutura e transmissão sináptica.

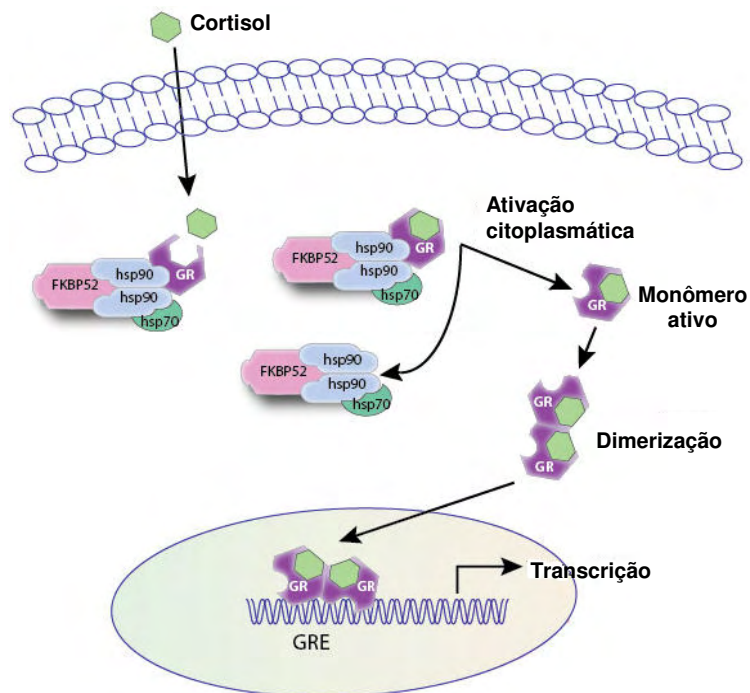


Figura 2 - Mecanismos intracelulares da ação dos glicocorticóides (GR).
(Fonte: <http://elegans.uky.edu/blog/?p=168>, data de acesso: 25/05/2010)

Regiões límbicas, como o hipocampo, também são abundantemente inervadas por projeções serotoninérgicas e são, como mencionado acima, particularmente sensíveis às ações dos corticosteróides. Esta interação entre o sistema serotoninérgico e o eixo HPA tem sido alvo de muitos estudos.

Diferentes condições estressantes, como choque elétrico nas patas, frio e sessões de imobilização, promovem aumento significativo da síntese e liberação de serotonina (CLEMENT et al., 1993; INOUE; TSUCHIYA; KOYAMA et al., 1994) via ativação das projeções serotoninérgicas do núcleo dorsal da rafe, como indicada pelo aumento da expressão de cFos nestes neurônios (GREENWOOD et al., 2003). Singh et al. (1990) demonstraram a regulação destes efeitos serotoninérgicos pela corticosterona, ao evidenciar o papel estimulatório do hormônio adrenal na atividade da triptofano hidroxilase, principal enzima da síntese da serotonina (5-HT).

Reciprocamente, muitas evidências têm mostrado que a 5-HT também influencia a secreção de corticosteróides. Estudos imuno-histoquímicos demonstraram a presença do receptor serotoninérgico 5-HT_{1A} nos neurônios do

núcleo paraventricular do hipotálamo e também que microinjeções de 8-OH-DPAT neste núcleo hipotalâmico acarretam liberação de ACTH e cortisol (OSEI-OWUSU et al., 2005). Sémont et al. (2000) demonstraram também que a expressão de GRs hipocampais e hipotalâmicos é regulada negativamente pela 5-HT através de um mecanismo independente dos corticosteróides (provavelmente, via ativação de receptores 5-HT₂).

O receptor serotoninérgico 5-HT_{1A} hipocampal também é essencial na resposta adaptativa ao estresse. Apesar do mecanismo ainda ser desconhecido, uma possibilidade para esta importância pode ser a atenuação do impacto emocional ao estímulo aversivo e conseqüentemente a inibição da consolidação da memória ao estresse (GUIMARÃES et al., 1993). Outra possibilidade é que o receptor 5-HT_{1A} possa atenuar a hiperatividade hipocampal decorrente do estresse (SHUMAKE; EDWARDS; GONZALEZ-LIMA et al., 2002) e, ainda, mediar alguns efeitos tróficos atribuídos à 5-HT, como o aumento da neurogênese e a liberação de fatores tróficos, protegendo a circuitaria hipocampal dos efeitos deletérios da exposição repetida ao estresse e aos glicocorticóides (JOCA; FERREIRA; GUIMARÃES et al., 2007).

Porém, diferentes tipos de estressores severos ou exposição repetida ao estresse podem induzir *downregulation* dos receptores 5-HT_{1A} hipocampais, predispondo ao desenvolvimento de déficits comportamentais. Estudos mostram que a modulação do receptor serotoninérgico é dependente dos corticosteróides visto que a transcrição do gene do receptor serotoninérgico 5-HT_{1A} é negativamente regulada pelo glicocorticóide circulante, especialmente no hipocampo (CHARLMERS et al., 1993). A região promotora do gene do receptor 5-HT_{1A} não contém nenhum GRE, porém apresenta sequências reconhecidas por outros fatores de transcrição como o NF-κB (subunidade p65) e SP1. Os corticosteróides, via ativação de GR, são capazes de reprimir a atividade destas regiões promotoras ao inibir os efeitos do NF-κB (MEIJER et al., 1997).

Outro importante modulador da ativação do eixo HPA é o neurotransmissor noradrenalina. Os neurônios CRFérgicos do núcleo paraventricular do hipotálamo, envolvidos com a ativação do eixo HPA, recebem projeções noradrenérgicas oriundas do *locus coeruleus*, núcleo do trato solitário e medula ventrolateral (MORILAK et al., 2005; ARMARIO, 2010) e a exposição ao estresse é capaz de aumentar tanto a expressão de c-Fos (PIRNIK et al., 2004) quanto a transcrição da

tirosina hidroxilase (CHANG et al., 2000), enzima limitante da síntese de noradrenalina, naquele núcleo.

O substrato neuronal para a ativação do *locus coeruleus* pelo estresse ainda não está totalmente esclarecido, porém mostrou-se que o *locus coeruleus* recebe projeções CRFérgicas e que microinfusões intra-*locus coeruleus* de CRF aumentam de forma dose-dependente a taxa de disparo no *locus coeruleus* e os níveis de noradrenalina no córtex frontal (CURTIS et al., 1997). Ainda, Ziegler, Cass e Herman (1999) demonstraram que a lesão do *locus coeruleus* com 6-OHDA diminuiu a liberação de ACTH e corticosterona induzida pelo estresse de contenção, sugerindo que o *locus coeruleus* regularia positivamente a ativação do eixo HPA.

Ainda, Kabba et al. (1995) demonstraram que a noradrenalina exerce controles distintos nos GRs. Segundo estes autores, os receptores noradrenérgicos α e β possuem efeitos opostos na expressão dos GRs hipocâmpais. Enquanto o tratamento com salbutamol (agonista do receptor β_2) aumenta o número de GRs no hipocampo, a fenilefrina (agonista do receptor noradrenérgico α_1) os diminuem. Ainda, estes efeitos distintos provavelmente são decorrentes da ativação diferencial dos processos de fosforilação/defosforilação pelos dois tipos de receptores noradrenérgicos, pois estes processos fosforilativos estão envolvidos na modulação da função do receptor esteróide.

Assim, estes dados sugerem a interação entre os sistemas monoaminérgicos e os GRs e ainda evidenciam o papel dos GRs em eventos como desregulação neuroendócrina, psicopatologias relacionadas ao estresse (p.ex., depressão) e sensibilização a substâncias psicoativas (JURUENA; CLEARE; PARIANTE, 2004; LANFUMEY et al., 2008).

1.2 Consequências da má adaptação ao estresse

Atualmente, é bem conhecido o papel do estresse como precipitante de episódios de transtornos psiquiátricos em indivíduos predispostos. Como comentado anteriormente, na resposta adaptativa ao estresse, o eixo HPA tem sido o mais amplamente estudado. Este eixo exerce um papel fundamental na resposta aos estímulos externos e internos, incluindo os estressores psicológicos, e anormalidades na sua função têm sido descritas em um espectro de transtornos

psiquiátricos, incluindo anorexia nervosa, transtorno obsessivo-compulsivo, pânico, dependência a substâncias psicoativas de abuso e depressão maior (JURUENA; CLEARE; PARIANTE, 2004).

Segundo dados da Associação Brasileira de Psiquiatria, a prevalência anual da depressão na população em geral oscila entre 3% e 11%, podendo este valor variar de acordo com a população estudada e com a conduta no diagnóstico. Porém, em pacientes internados por qualquer doença física, a prevalência de depressão eleva-se entre 22% a 33%.

Para a compreensão da intrincada associação entre estresse e depressão maior faz-se necessário uma breve revisão das teorias que foram elaboradas na tentativa de explicar os mecanismos fisiopatológicos da depressão.

A origem neuroquímica da depressão foi estabelecida por volta de 1950, a partir do estudo do mecanismo de ação dos primeiros fármacos antidepressivos. Desta época datam, por exemplo, a iproniazida, que, inicialmente desenvolvida para tratamento de tuberculose, deu origem à classe dos inibidores da monoaminoxidase (MAO). Também vale ressaltar a descoberta “acidental” dos efeitos antidepressivos da imipramina, a partir do protótipo antipsicótico clorpromazina, que determinou então o surgimento da importante classe dos antidepressivos tricíclicos, utilizados clinicamente até hoje (BERTON; NESTLER, 2006).

Em geral, estes fármacos antidepressivos aumentam prontamente a concentração dos neurotransmissores na fenda sináptica, por bloqueio do metabolismo intraneuronal das monoaminas pela MAO ou inibição da recaptação das monoaminas cerebrais. Entretanto, alguns antidepressivos, denominados antidepressivos atípicos, apresentam mecanismos diferenciados, como o caso da mirtazapina, cujo efeito antidepressivo é decorrente do bloqueio direto de autorreceptores adrenérgicos inibitórios pré-sinápticos do subtipo α_2 . Essas primeiras evidências constituíram a base da primeira teoria da depressão, a teoria das monoaminas (formulada paulatinamente por Schildkraut, Bunney e Davis, em 1965; Van Praag e Korf, em 1971 e Paul Willner, em 1990), que relacionava a fisiopatogenia da depressão à deficiência de monoaminas cerebrais (serotonina, noradrenalina e dopamina) (ELHWUEGI, 2004).

Entretanto, essa teoria foi bastante contestada em virtude de não esclarecer várias dúvidas. A exemplo, substâncias que sabidamente aumentavam a atividade monoaminérgica (p.ex., cocaína, anfetamina) não eram clinicamente eficazes como

antidepressivos. Pacientes não respondiam igualmente ao mesmo tratamento antidepressivo. E, o mais importante, as alterações nos níveis de monoaminas na fenda sináptica ocorrem em poucas horas após a administração de antidepressivos, enquanto a resposta terapêutica é somente observada após o uso contínuo do fármaco por várias semanas.

Essas observações influenciaram a reformulação e complementação da teoria das monoaminas. Segundo a nova hipótese, o rápido aumento das monoaminas na sinapse seria somente a etapa inicial da complexa cascata de eventos que culminariam na atividade antidepressiva. Estes eventos incluiriam a subsensibilidade de auto- e heterorreceptores inibitórios em certas regiões encefálicas, um processo de neuroplasticidade a longo prazo que coincidiria com o aparecimento dos efeitos terapêuticos. Como exemplo de neuroplasticidade, vale ressaltar a *down-regulation* do receptor β -adrenérgico pós-sináptico no córtex de ratos e a subsensibilidade dos receptores 5-HT_{1A} no núcleo dorsal da rafe e hipotálamo (ver ELHWUEGI, 2004 para revisão completa).

Devido à natureza incompleta da teoria das monoaminas, pesquisas envolvendo outros sistemas de neurotransmissão têm sido objeto de muito estudo. Um dos achados mais consistentes em pacientes deprimidos é a hiperatividade do eixo HPA, demonstrado pelo aumento do cortisol plasmático e do CRH no líquido, hipertrofia da hipófise e glândula adrenal e reduzida habilidade de supressão do eixo HPA com dexametasona. Esses dados revelam falhas na alça de retroalimentação negativa do eixo HPA, sugerindo prováveis alterações da função dos GRs nos pacientes com depressão (SLATTERY; HUDSON; NUTT, 2004). Assim, estes achados permitiram a formulação de uma outra teoria da depressão envolvendo também o eixo HPA e os GRs.

Embora a ativação do eixo HPA e os processos mediados pelos glicocorticóides sejam adaptativos por natureza, a exposição repetida a altas concentrações de glicocorticóides pode ser deletéria à estrutura e função do hipocampo, pois se observou redução significativa do volume hipocampal nos pacientes com depressão. Além disso, a normalização do eixo HPA pode ser uma etapa necessária à remissão dos sintomas da depressão (MAYER et al., 2006; JOCA; FERREIRA; GUIMARÃES et al., 2007).

O hipocampo e o córtex frontal foram até o momento as regiões mais estudadas, particularmente em modelos animais de depressão. Estas regiões estão

particularmente associadas com as anormalidades cognitivas observadas em muitos pacientes com depressão. Porém, a amígdala, em seu papel de estabelecer associações entre estímulos aversivos e recompensatórios, também está implicada. A denominada via de recompensa – que compreende os neurônios dopaminérgicos da área tegmental ventral e o *nucleus accumbens* – também está envolvida com a manifestação da anedonia, principal sintoma clínico da depressão. E ainda, anormalidades do apetite, sono e ritmo circadiano também sugerem a participação do hipotálamo na fisiopatologia da depressão (BERTON; NESTLER, 2006).

Em modelos animais, foi demonstrado que a hipercortisolemia pode acarretar excitotoxicidade aos neurônios piramidais hipocâmpais (vista pela atrofia dos dendritos, perda das conexões sinápticas e inibição ou morte de novos neurônios no giro dentado), pois o bloqueio das ações do hormônio esteroideal previne estes danos à neurogênese (MAYER et al., 2006). Desta forma, o excesso de glicocorticóides pode ser o fator causal da redução do tamanho do hipocampo observada em pacientes com depressão ou estresse pós-traumático. Vale ressaltar que o dano hipocâmpal pode acarretar, por consequência, prejuízo adicional ao controle do eixo HPA e, portanto, mais liberação de glicocorticóides (BERTON; NESTLER, 2006).

Assim, o estudo da relação existente entre estresse e depressão possibilitou a formulação da hipótese mais atual da depressão, a hipótese neurotrófica. Demonstrou-se que o estresse diminui a expressão de BDNF (*brain derived neurotrophic factor*), uma pequena proteína de 14 kDa envolvida com a neurogênese e plasticidade das conexões neuronais (manutenção da morfologia sináptica e excitabilidade da membrana neuronal) (DUMAN; MONTEGGIA, 2006). Um provável mecanismo pelo qual o BDNF promove estes efeitos seria a indução da expressão da proteína anti-apoptótica Bcl-2, após ativação dos seus receptores TrkB - MAP kinase. A Bcl-2 impede a morte celular por vários mecanismos, incluindo a diminuição da liberação de cálcio e citocromo c, bloqueio de enzimas caspases e aumento da recaptção mitocondrial de cálcio (MANJI; DREVETS; CHARNEY, 2001).

Neste contexto, Duman, Malberg e Nakagawa (2000) demonstraram que no hipocampo e córtex a cascata cAMP-CREB encontra-se ativada pelo tratamento antidepressivo. CREB é um componente final da cascata do cAMP envolvido com a expressão do gene do BDNF. Desta forma, é possível associar os níveis de CREB e BDNF ao efeito terapêutico dos antidepressivos. Ainda, demonstrou-se que muitos

antidepressivos são capazes de restaurar o mecanismo de retroalimentação negativa do eixo HPA através do aumento da expressão de GRs no hipocampo, por exemplo, minimizando a hipersecreção de glicocorticóides (BARDEN, 2004; DE KLOET; JOELS; HOLSHOER, 2005).

Porém, existem outros pontos que também não são esclarecidos pela hipótese neurotrófica da depressão. Por exemplo, o estresse aumenta a expressão de BDNF na área tegmental ventral e *nucleus accumbens* e, nestas regiões, o BDNF apresenta efeito pró-depressão, o que sugere que os efeitos neuroplásticos do BDNF são região-específicos (EISCH et al., 2003; KRISHNAN et al., 2007; KRISHNAN; NESTLER, 2008). O mecanismo pelo qual a neurogênese induzida pelo BDNF promove melhora do humor é completamente desconhecida. Outros fatores neurotróficos têm merecido consideração como potenciais alvos para o desenvolvimento de novos antidepressivos, a exemplo do FGF (*fibroblast growth factor*), um importante regulador endógeno da neurogênese no hipocampo de ratos adultos (BERTON; NESTLER, 2006). E ainda, pouca atenção tem sido dada à heterogeneidade da resposta ao estresse, isto é, o estudo de como muitos indivíduos conseguem se adaptar bem (i.e., são resilientes) às adversidades.

Outro ponto que tem sido atualmente alvo de crescentes estudos é o papel da neurotransmissão colinérgica na depressão. O aumento do tônus colinérgico central tem sido associado a sintomas depressivos em humanos (hipótese colinérgica da depressão). Esta hipótese advém, por exemplo, de observações clínicas de que a fisostigmina, um potente inibidor da acetilcolinesterase, exacerba distúrbios do humor. Evidências clínicas também tem sugerido que antagonistas de nAChRs possuem efeitos antidepressivos e muitos fármacos antidepressivos (a exemplo da bupropiona, utilizada no manejo da abstinência ao cigarro) atuam como antagonistas não-seletivos de nAChRs (PICCIOTTO et al., 2008; ANDREASEN et al., 2009) .

Assim, a todo instante novas perspectivas da fisiopatologia da depressão são levantadas. Por fim, é bastante difícil tentar definir a complexidade da depressão em uma única teoria e mesmo a mais recente delas, a hipótese neurotrófica, não consegue esclarecer todas as dúvidas. Porém, com os avanços da neurobiologia e dos estudos moleculares, novos horizontes vêm se abrindo tanto na elucidação da fisiopatologia da depressão quanto aos novos substratos para desenvolvimento de fármacos.

1.3 Estresse, depressão e a relação com a dependência à nicotina

Atualmente, o tabagismo é considerado pela Organização Mundial da Saúde (OMS) a principal causa de morte evitável em todo o mundo. A OMS estima que um terço da população mundial adulta, isto é, 1 bilhão e 200 milhões de pessoas, sejam fumantes. Pesquisas comprovam que aproximadamente 47% de toda a população masculina e 12% da população feminina no mundo fumam. O total de mortes devido ao uso do tabaco atingiu a cifra de 4,9 milhões de mortes anuais, o que corresponde a mais de 10 mil mortes por dia.

No Brasil, estima-se que aproximadamente um terço da população adulta fuma, sendo aproximadamente 11 milhões de mulheres e 16 milhões de homens. O maior número de fumantes está concentrado na faixa etária dos 20 aos 49 anos (INSTITUTO NACIONAL DO CÂNCER, 2005). A severidade da dependência ao tabaco é evidenciada por estimativas que revelam que, apesar de 80% dos fumantes regulares manifestarem o desejo de parar de fumar, menos de 5% são bem sucedidos e abandonam o tabaco sem ajuda especializada (O'BRIEN, 2001).

A fumaça do cigarro contém mais de 4000 substâncias químicas, contudo, a maioria dos estudos pré-clínicos e clínicos demonstram que a nicotina, um alcalóide extraído das folhas de *Nicotiana tabacum*, é o principal agente responsável pelo desenvolvimento da dependência ao tabaco (STOLERMAN; JARVIS, 1995). Após fumar um cigarro, a concentração da nicotina na corrente sanguínea atinge picos entre 0,5 μM e 1,0 μM . Entretanto, a sua distribuição entre os compartimentos corporais é bastante irregular. No SNC, por exemplo, estima-se que a concentração da nicotina seja ao menos cinco vezes maior do que aquela alcançada no soro (SHAMA; VIJAYARAGHAVAN, 2008).

A nicotina, em virtude de seu pequeno tamanho e de suas características lipofílicas, é capaz de atravessar a barreira hematoencefálica e promover seus efeitos ao interagir com receptores colinérgicos nicotínicos neuronais (nAChR), mimetizando os efeitos da acetilcolina endógena (NEWMAN et al., 2001).

No SNC, os nAChRs neuronais pertencem à família dos canais iônicos ligante-dependentes e a ligação da nicotina a estes receptores, que são proteínas integrais de membrana, pentaméricas, promove alterações conformacionais que permitem o fluxo de cátions (Na^+ , K^+ , Ca^{2+}) pelo canal iônico delimitado pelas diferentes

combinações das cadeias polipeptídicas, denominadas α e β , que compõem o receptor (ALBUQUERQUE, 2000; PICCIOTTO et al., 2000).

Os subtipos de nAChRs mais freqüentes no sistema nervoso central (SNC) são o $\alpha 4\beta 2$ e o $\alpha 7$ (figura 3). O $\alpha 4\beta 2$ tem distribuição ampla e o subtipo $\alpha 7$ é concentrado nas áreas corticais, hipotálamo, hipocampo, ponte e neurônios ganglionares, incluindo as células cromafins da medula supra-renal (HILL et al., 1993; MCGEHEE, 1999). O nAChR do tipo $\alpha 3\beta 4$, apesar de ser predominante no sistema nervoso periférico, também é encontrado em certas regiões do sistema nervoso central como habenula medial e dorsal, no núcleo interpeduncular e no *locus coeruleus* (ZAREI et al., 1999; JENSEN et al., 2005).

Pela sua localização predominantemente pré-sináptica nos corpos celulares e terminais dos axônios, tem sido proposto que o papel do nAChR seja o de modular direta ou indiretamente a liberação de vários neurotransmissores, como a acetilcolina, a dopamina, a serotonina (5-HT) e o glutamato (PICCIOTTO et al., 2000; SCHAPIRA; ABAGYAN; TOTROV, 2002; ZANARDI et al., 2002). Seth et al. (2000) ressaltam a complexa interação entre os sistemas colinérgico e serotoninérgico, sendo que em várias regiões encefálicas, o efeito final da nicotina seria resultado da somatória dos efeitos nos dois sistemas.

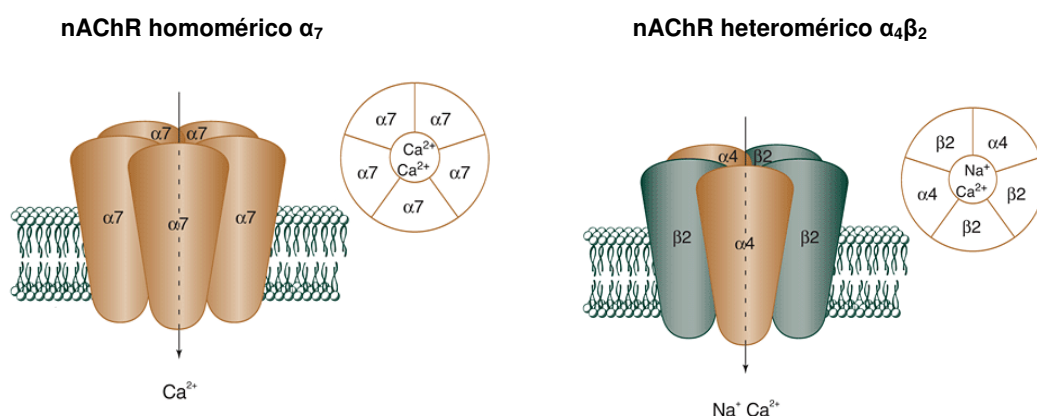


Figura 3 - Representação esquemática dos dois subtipos mais comuns de nAChRs no SNC (fonte: <http://www.niaaa.nih.gov/Resources/GraphicsGallery/Neuroscience>)

Um ponto interessante observado nas estatísticas da dependência a nicotina é a clara relação existente entre as oscilações do humor e a iniciação e/ou continuação do uso do tabaco.

Neste contexto, levantamentos epidemiológicos mostram elevada prevalência de tabagistas entre pacientes com depressão maior e também maior probabilidade de pacientes com depressão se tornarem tabagistas em relação à população em geral. Ainda, outro dado interessante é a manifestação de depressão na síndrome de abstinência a nicotina, revertida tanto pela reintrodução do uso do tabaco como pelo tratamento antidepressivo (PATERSON; MARKOU, 2007).

Destes dados é possível concluir que pacientes com depressão proeminente procurariam a nicotina para alívio dos sintomas (teoria da auto-medicação), o que conduziria a um quadro de dependência mantido tanto pelo reforço positivo da substância psicoativa de abuso quanto pelos efeitos reforçadores negativos da síndrome de abstinência (BALFOUR; RIDLEY, 2000; PATERSON; MARKOU, 2007).

Embora a base neurobiológica desta associação não esteja esclarecida, um provável constructo teórico desta hipótese se basearia no papel modulador dos nAChRs, como comentado anteriormente. Assim, a princípio, pela ação nos nAChRs, a nicotina estimularia a liberação de vários neurotransmissores em diferentes regiões cerebrais e as adaptações neuroquímicas decorrentes da exposição a nicotina estariam associadas ao possível efeito “antidepressivo” detectado, inclusive, em vários modelos animais de depressão (SALIN-PASCUAL; DRUCKER-COLIN, 1998; TIZABI et al., 1999; FERGUSON et al., 2000; VÁZQUEZ-PALACIOS; BONILLA-JAIME; VELÁZQUES-MOCTEZUMA, 2004; MANNUCCI et al., 2006). Utilizando-se de ratos da linhagem FSL (*flinders sensitive line*), um modelo animal geneticamente modificado que expressa comportamentos que mimetizam aspectos da depressão humana (NISHI; KANEMARU; DIKSIC et al., 2009), Tizabi et al. (2000) demonstraram que o efeito antidepressivo da nicotina é completamente bloqueado pela mecamilamina, um antagonista nicotínico, confirmando o envolvimento de nAChRs nos efeitos da nicotina.

Obviamente, estes dados não pretendem fazer apologia ao uso do cigarro (sabidamente maléfico à saúde), mas levantam uma nova questão a partir dos estudos clínicos: o papel do nAChR na fisiopatologia e tratamento da depressão. Porém associar este possível efeito “antidepressivo” a simples oscilações nos níveis

dos neurotransmissores seria incorrer nos mesmos problemas das primeiras teorias da depressão.

Ainda, como comentado no capítulo anterior, muitos casos de depressão têm sua gênese na mal-adaptação ao estresse. Contudo, o estresse em si é capaz de induzir um estado emocional negativo que induz o indivíduo a buscar o alívio desses sintomas nas substâncias psicoativas de abuso. Isto é, o estresse é um importante motivador tanto para o desenvolvimento da dependência a nicotina quanto para a recaída. Estudos clínicos tem comprovado esta relação.

Balk, Lynskey e Agrawal (2009) ao analisarem uma amostra de 18.013 americanos, mostraram que a prevalência da dependência a nicotina aumentava em quase 40% entre aqueles que passavam por três os mais eventos estressantes ao ano. Childs e Wit (2010) demonstraram que em fumantes regulares, o estresse psicossocial foi capaz de aumentar o desejo de fumar. Dagher et al. (2009) também observaram, por meio de ressonância magnética funcional, que a associação de estresse psicossocial e exposição a vídeos de fumantes foi capaz de induzir a ativação de áreas envolvidas com a atenção e motivação (como o *nucleus accumbens* e caudado, córtex pré-frontal, amígdala, hipocampo e tálamo dorsomedial) em fumantes regulares. O estresse, então, é capaz de promover o aumento da saliência motivacional das pistas ambientais.

Os efeitos comportamentais da nicotina também parecem se relacionar à habilidade dessa substância em ativar a resposta ao estresse mediada pelo eixo HPA. A administração aguda de nicotina a animais de laboratório promove aumento dos níveis séricos do hormônio adrenocorticotrófico e corticosterona (BALFOUR, 1989; MATTA et al., 1998). O aumento do cortisol plasmático também foi observado em fumantes e, embora o papel do cortisol na dependência à nicotina não esteja claro, o decréscimo do cortisol após cessação do ato de fumar é um preditor de risco de recaída (MENDELSON et al., 2005). Ainda, agudamente, a nicotina é capaz de aumentar as concentrações plasmáticas de β -endorfina, um peptídeo derivado da POMC, o que pode estar relacionado aos efeitos prazerosos do cigarro relatados por muitos fumantes (KOZLOWSKI et al., 1989).

Koob e Le Moal (1997) propuseram que o estresse promoveria alterações no circuito de recompensa cerebral que o tornaria mais susceptível às propriedades reforçadoras das substâncias psicoativas, particularmente naqueles indivíduos mais vulneráveis (sensibilização comportamental). Isto é, o estresse é capaz de modular a

atividade neuronal de regiões como amígdala, hipocampo, córtex pré-frontal e estriado assim como modificar, via sistema mesocorticolímbico, a relação entre motivação e abuso de drogas (DAGHER et al., 2009).

Por fim, o entendimento da dependência a substâncias psicoativas é um fenômeno bastante complexo e os estudos mais atuais mostram que as bases neurobiológicas deste processo vão além do conceito inicial de ativação das vias de recompensa cerebral. Desta forma, a avaliação das adaptações neuronais subjacentes aos efeitos da nicotina ainda não estão completamente elucidadas e o estudo dos substratos neurobiológicos da interação nicotina-estresse continuam sendo objeto de muitas pesquisas.

2 Objetivos

O presente trabalho teve por objetivos investigar:

→ as alterações neuroquímicas, neuroendócrinas e moleculares induzidas pela exposição ao estresse de natação forçada;

→ o papel da nicotina nas alterações induzidas pela exposição ao estresse de natação forçada.

3 Material e Métodos

3.1 Animais

Foram utilizados ratos Wistar machos, adultos (200-250g), provenientes do biotério central da Universidade Estadual Paulista - UNESP. Os animais foram transferidos para o biotério do Laboratório de Farmacologia do Departamento de Princípios Ativos Naturais e Toxicologia da UNESP/Araraquara e mantidos em condições controladas de temperatura ($23 \pm 1^\circ\text{C}$), umidade ($55 \pm 5\%$) e luz (ciclo 12/12 h, luzes acesas às 07:00h), tendo livre acesso a alimento e água, até o início dos experimentos. Os experimentos foram realizados entre 10:00 e 15:00 para evitar influência do ritmo circadiano. Os protocolos experimentais foram, previamente, aprovados pelo Comitê de Ética da Faculdade de Ciências Farmacêuticas – UNESP/Araraquara (CEP nº 41/2006).

3.2 Fármacos

- (-)-nicotina (Sigma®)
- cloridrato de imipramina (Sigma®)
- cloridrato de prazosina (Sigma®)

3.3 Teste da Natação Forçada (TNF)

O protocolo de natação forçada seguiu o modelo proposto por Porsolt, Le Pichon e Jalfre (1977) e modificado por Cryan, Markou e Lucki (2002). Para tanto, foi utilizada uma cuba (20 x 20 x 50 cm) contendo 30 cm de água a $24 \pm 1^\circ\text{C}$. Após habituação de 1h na sala de experimento (ambiente claro e climatizado), os animais foram colocados na cuba por 15 min (pré-teste). A água foi trocada após cada animal. Após esta primeira sessão, os animais foram secados e devolvidos ao biotério. Vinte e quatro horas após, os animais foram trazidos à sala de experimentos e recolocados na cuba por 5 min apenas (teste). Os seguintes comportamentos (figura 4) foram analisados posteriormente na filmagem da sessão de 5 minutos do TNF:

- imobilidade: rato flutua passivamente fazendo movimentos mínimos para manter a cabeça fora d'água;
- natação: rato executa movimentos de nado ativo, além dos necessários para manter a cabeça fora d'água (p.ex., se mover ao redor da cuba);
- escalada: rato executa movimentos ativos com as patas, dentro e fora d'água, geralmente direcionadas contra as paredes da cuba.

Estes parâmetros foram analisados pelo registro dos comportamentos exibidos a cada 5 segundos, no período total dos 5 minutos.

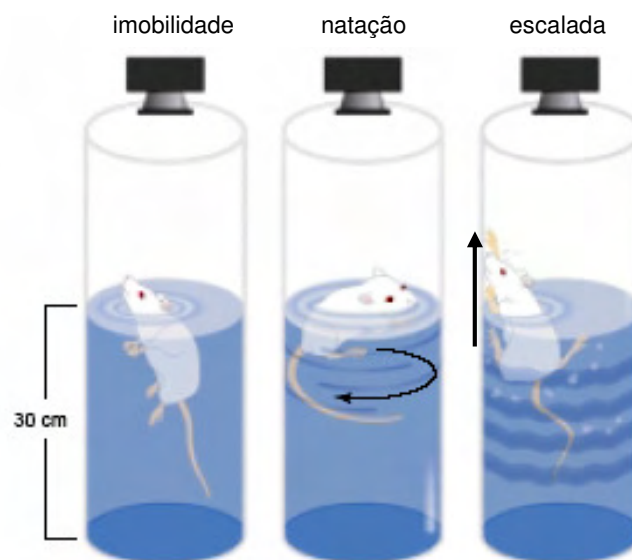


Figura 4 - Comportamentos exibidos pelos ratos quando submetidos ao teste modificado da natação forçada: imobilidade, natação e escalada (figura extraída de Cryan, Markou e Lucki, 2002).

3.4 Determinação de serotonina (5-HT), ácido 5-hidroxiindoleacético (5-HIAA) e noradrenalina por cromatografia líquida de alta performance (HPLC)

As amostras teciduais foram obtidas por “minipunches”. Para tanto, os encéfalos congelados foram fatiados a -20°C segundo as descrições de Paxinos e Watson (2007). Amostras das estruturas encefálicas foram obtidas por *punches* de

15 gauges e, a seguir, foram pesadas e homogeneizadas por ultra-som em 100 µl de ácido perclórico 0,1M gelado. Os homogenatos foram centrifugados a 13000 rpm por 10 min a 4°C. Trinta microlitros do sobrenadante foram injetados automaticamente no sistema HPLC. O sistema HPLC consistia de uma coluna de separação de fase reversa (SYMMETRY® C18, 5 µm, 150 mm X 4,6 mm) e um cromatógrafo (WATERS® Alliance 2465) acoplado ao detector eletroquímico, com eletrodo de carbono. O potencial foi ajustado a 800 mV. A fase móvel contendo ácido cítrico 50 mM, KCl 2 mM, ácido heptasulfônico 1,2 mM, metanol 9,86% e acetonitrila 2,11%, pH 3,2, foi filtrada a vácuo e degaseificada por ultra-som e bombeada no sistema a um fluxo de 0,8 mL/min. O conteúdo dos neurotransmissores e de seus metabólitos foi quantificado comparando-se as áreas dos picos com curvas-padrão de cada substância. Os resultados foram expressos em ng/mg de tecido. Os limites de detecção para 5-HT, 5-HIAA e NA foram, respectivamente, 1,0, 1,3 e 0,76 ng/ml. Os limites de quantificação para 5-HT, 5-HIAA e NA foram, respectivamente, 3,5, 4,3 e 2,54 ng/ml.

3.5 Determinação da corticosterona

O teste de quantificação de corticosterona (radioimunoensaio) foi realizado em duplicata, usando anticorpos da Sigma e (³H)-corticosterona da New England Nuclear (BOSTON, MA). O método foi adaptado de Sarnyai et al. (1992). Em resumo, 20 µl de plasma foram diluídos 50 vezes em tampão fosfato 0,01M e deixados em banho (75°C) por 1h. Cem microlitros da solução de anticorpo e (³H)-corticosterona (10.000 a 20.000 cpm/ml) foram adicionados a cada amostra, que foi incubada *overnight* a 4 °C. Partículas de carvão ativado foram usadas para adsorção do esteróide livre após incubação. Os tubos foram centrifugados a 2000×g, por 15 min, a 4°C. Ao sobrenadante de cada tubo foi adicionado o líquido de cintilação e a radioatividade foi quantificada por espectrometria de cintilação líquida. Curvas-padrão foram realizadas usando 10, 25, 50, 100, 250, 500, 750, 1000 e 2000 pg/100 µl de corticosterona (SIGMA®). As variações inter- e intra-teste foram, respectivamente, de 4,0% e 7,2%.

3.6 Adrenalectomia

Após anestesia com ketamina e xilazina, a glândula adrenal foi retirada através de uma pequena incisão no dorso dos animais. Após sutura, os animais receberam pentabiótico 17 mg/ml (i.m.) e paracetamol (v.o.). Após a cirurgia e durante todo o período experimental, a alimentação dos animais foi *ad libitum*. Entretanto, aos animais adrenalectomizados foram fornecidos dois bebedouros contendo, separadamente, água e salina (0,9%); aos animais *sham*-operados, duas mamadeiras contendo água somente. Após sete dias de recuperação, os animais foram submetidos ao protocolo do TNF.

3.7 Ensaio de Western Blotting para o receptor 5-HT_{1A}

O conteúdo de proteínas nas amostras foi determinado por método colorimétrico semelhante ao de Lowry. O ajuste da quantidade de proteínas aplicada foi determinado em ensaios preliminares utilizando-se quantidades situadas dentro da faixa de linearidade de detecção.

As amostras homogeneizadas foram misturadas com tampão de amostra (62,5mM Tris, 2% SDS, 10% glicerol, 0,1M DTT e 0,01% azul de bromofenol, pH 6,8) e fervidas por 5 minutos. Alíquotas de 15µl foram submetidas à eletroforese por 80 minutos a 130V em gel de SDS-poliacrilamida (7,5% acrilamida, 0,20% metilbisacrilamida, 10% SDS). No mesmo gel sempre foi adicionado um padrão de peso molecular conhecido.

Ao final da separação, as proteínas foram transferidas eletroforicamente (100V por 2:30h) do gel para uma membrana de PVDF (AMERSHAM BIOSCIENCES). Após a transferência, as membranas foram incubadas (1 h) sob agitação constante em solução bloqueadora (TTBS: 100mM Tris/HCl, 0,9% NaCl, 0,1% de Tween-20, pH 7,5 e 5% de leite em pó desnatado) e lavadas (5 X) por 5 minutos em TTBS.

Após essa etapa, as membranas foram, primeiramente, incubadas por 4h com o anticorpo primário anti-5-HT_{1A} (1:2000, SANTA CRUZ BIOTECHNOLOGY) diluído em TTBS e, após cinco lavagens com TTBS, incubadas com o anticorpo secundário conjugado com "horseradish" peroxidase (1:2000, AMERSHAM BIOSCIENCES) por

1h. A revelação destas membranas foi realizada por meio do kit de quimioluminescência ECL-Amersham[®]. A luminescência foi detectada indiretamente por meio do filme Kodak Biomax Light[®]. Por fim, os filmes foram escaneados em modo transparência e a intensidade das bandas foi quantificada utilizando-se o programa Image-Master[®] (AMERSHAM PHARMACIA BIOTECH) com subtração da marcação de fundo (figura 5). A seguir, após ressondagem e lavagem da membrana, a mesma foi incubada por 4 horas com o anticorpo primário anti- β -actina (1:200, SANTA CRUZ BIOTECHNOLOGY) diluído em TTBS. As membranas foram então novamente lavadas e incubadas com o anticorpo secundário conjugado com “horseradish” peroxidase (1:200, AMERSHAM BIOSCIENCES) por 1 hora e, submetidas, então, à revelação como mencionada anteriormente.

Após as revelações, as membranas foram coradas com solução de Azul de Coomassie (1% de Azul de Coomassie; 10% ácido acético; 50% metanol) por 1 minuto e lavadas em solução descorante (5% ác. acético; 40% metanol) por 2 minutos sob agitação. Esse procedimento de coloração da membrana é útil para a visualização de amostras não separadas adequadamente pelo gel ou que apresentaram falhas na transferência.

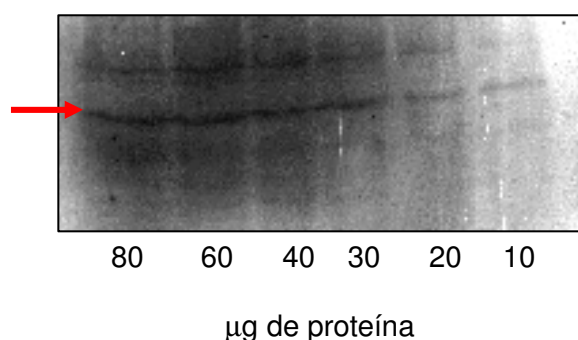


Figura 5 - Banda referente à detecção do receptor serotoninérgico 5-HT_{1A} (seta vermelha) em hipocampo total de ratos.

3.8 Ensaio de Western Blotting para a fração nuclear glicorreceptor (GR)

O protocolo abaixo se baseou, com algumas modificações, nas técnicas descrita por Spencer et al. (2000) e Racca et al. (2005). Para tanto, o hipocampo total foi retirado sobre placa de gelo e mantido a -80°C . Posteriormente, o tecido foi pesado e homogeneizado (em gelo) na proporção 0,5 ml tampão/100 mg tecido, utilizando-se homogeneizador tipo Potter (20 *strokes*, pistilo A, 4°C). O tampão de homogeneização era composto de 1250 μl de tampão Tris/HCl pH 8,0 1,0M, 500 μl de EDTA 100 mM, 50 μl de PMSF 100 mM, 100 μl de leupeptina 50x, 100 μl de pepstatina A 50x e 3 mL água destilada.

Em seguida, o homogenato foi centrifugado (4400 rpm, 4°C , 5 min), o pellet obtido foi lavado duas vezes (dois ciclos de ressuspensão em tampão e centrifugação) e, por fim, ressuspensão em 100 μl de tampão enriquecido com 0,5M de NaCl (extrato salino). Após 1 hora no gelo (com agitações freqüentes), o homogenato foi novamente centrifugado (8800 rpm, 10 min, 4°C) e o sobrenadante final separado (fração nuclear).

O conteúdo de proteínas no sobrenadante foi determinado por método colorimétrico. O ajuste da quantidade de proteína aplicada (15 μg) e a concentração dos anticorpos foram determinados em ensaios preliminares utilizando-se quantidades situadas dentro da faixa de linearidade de detecção.

As amostras, então, foram misturadas com tampão de amostra (62,5mM Tris, 2% SDS, 10% glicerol, 0,1M DTT e 0,01% azul de bromofenol, pH 6,8) e fervidas por 5 minutos. Alíquotas de 20 μl foram submetidas à eletroforese por aproximadamente 50 minutos a 160V em gel de SDS-poliacrilamida (7,5% acrilamida, 0,20% metilbisacrilamida, 10% SDS). No mesmo gel sempre foi adicionado um padrão de peso molecular conhecido.

Ao final da separação, as proteínas foram transferidas eletroforéticamente (100V por 2:30h) do gel para uma membrana de PVDF (AMERSHAM BIOSCIENCES). Após a transferência, as membranas foram incubadas (1 h) sob agitação constante em solução bloqueadora (TTBS: 100mM Tris/HCl, 0,9% NaCl, 0,1% de Tween-20, pH 7,5 e 5% de leite em pó desnatado) e lavadas (5 vezes) por 5 minutos em TTBS.

Após essa etapa, as membranas foram, primeiramente, incubadas *overnight* com o anticorpo primário anti-GR M-20 SC 1004 (1:200, SANTA CRUZ

BIOTECHNOLOGY) diluído em TTBS e, após cinco lavagens com TTBS, incubadas com o conjugado fluorescente (Cy5 anti-rabbit 1:2000, AMERSHAM BIOSCIENCES) por 1 hora, sempre na ausência de luz, agitação constante e a baixas temperaturas.

As membranas foram escaneadas utilizando-se o aparelho Typhoon® (figura 6) e a intensidade da fluorescência das bandas foi quantificada através do programa ImageQuant TL, com subtração da marcação de fundo.

A seguir, após ressondagem, lavagem da membrana e novo bloqueio, a mesma foi incubada *overnight* com o anticorpo primário anti- β -actina (1:500, SANTA CRUZ BIOTECHNOLOGY) diluído em TTBS. As membranas foram então novamente lavadas e incubadas com o anticorpo secundário (Cy5 1:2000, AMERSAHM BIOSCIENCES) por 1 hora (sempre com agitação constante e a baixas temperaturas) e submetidas, então, à leitura como mencionada anteriormente.

Após as incubações e leituras, as membranas foram coradas com solução de Azul de Coomassie (1% de Azul de Coomassie; 10% ácido acético; 50% metanol) por 1 minuto e lavadas em solução descorante (5% ác. acético; 40% metanol) por 2 minutos sob agitação. Esse procedimento de coloração da membrana é útil para a visualização de amostras não separadas adequadamente pelo gel ou que apresentaram falhas na transferência.

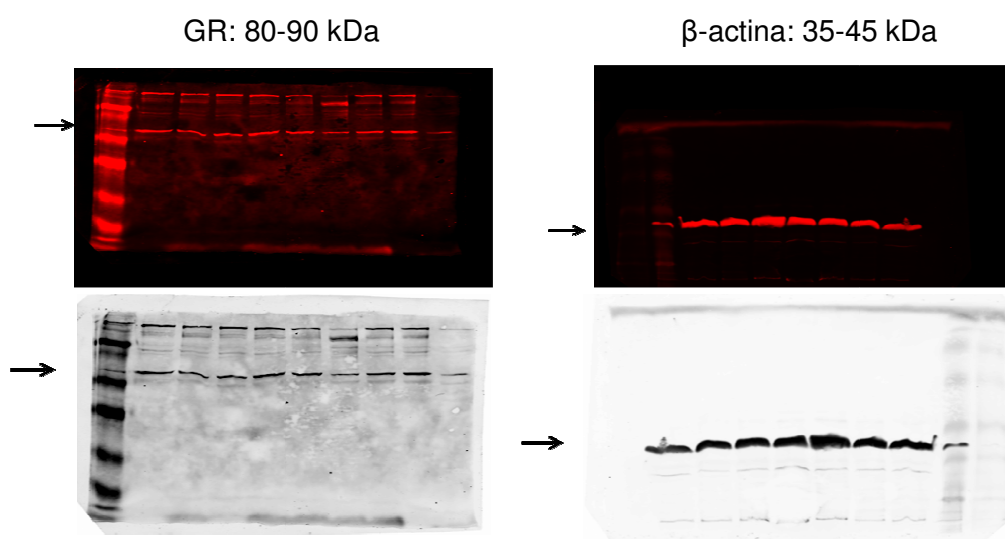


Figura 6 - Exemplos da fluorescência detectada para o GR (fração nuclear) e β -actina

4 Delineamento Experimental

4.1 Efeito do tratamento subcrônico com nicotina ou imipramina nos parâmetros comportamentais do TNF

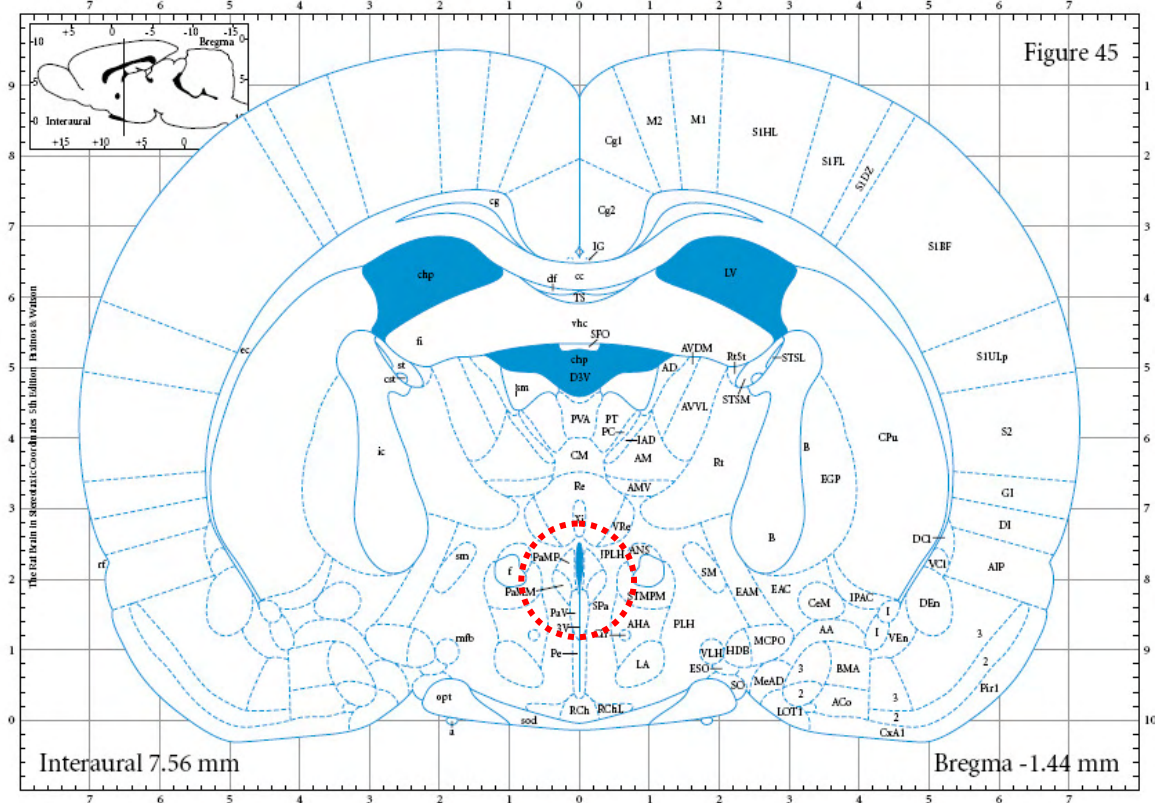
Duas sessões de natação forçada foram realizadas: uma exposição inicial (pré-teste) de 15 minutos, 24 horas antes do teste de 5 minutos. Uma, 19 e 23 horas após o pré-teste, os animais foram tratados com nicotina (NIC) (0,5 mg/kg; s.c.), imipramina (IMI) (um antidepressivo tricíclico de referência) (15 mg/kg; i.p.) ou salina (SAL) (1 mL/kg; s.c.). Uma hora após a última injeção, os animais foram colocados individualmente na cuba e os comportamentos de imobilidade, natação ou escalada foram analisados na filmagem do teste de 5 minutos, conforme explicado no item 3.3.

4.2 Avaliação das alterações neuroquímicas após tratamento subcrônico com nicotina ou imipramina e exposição ao TNF

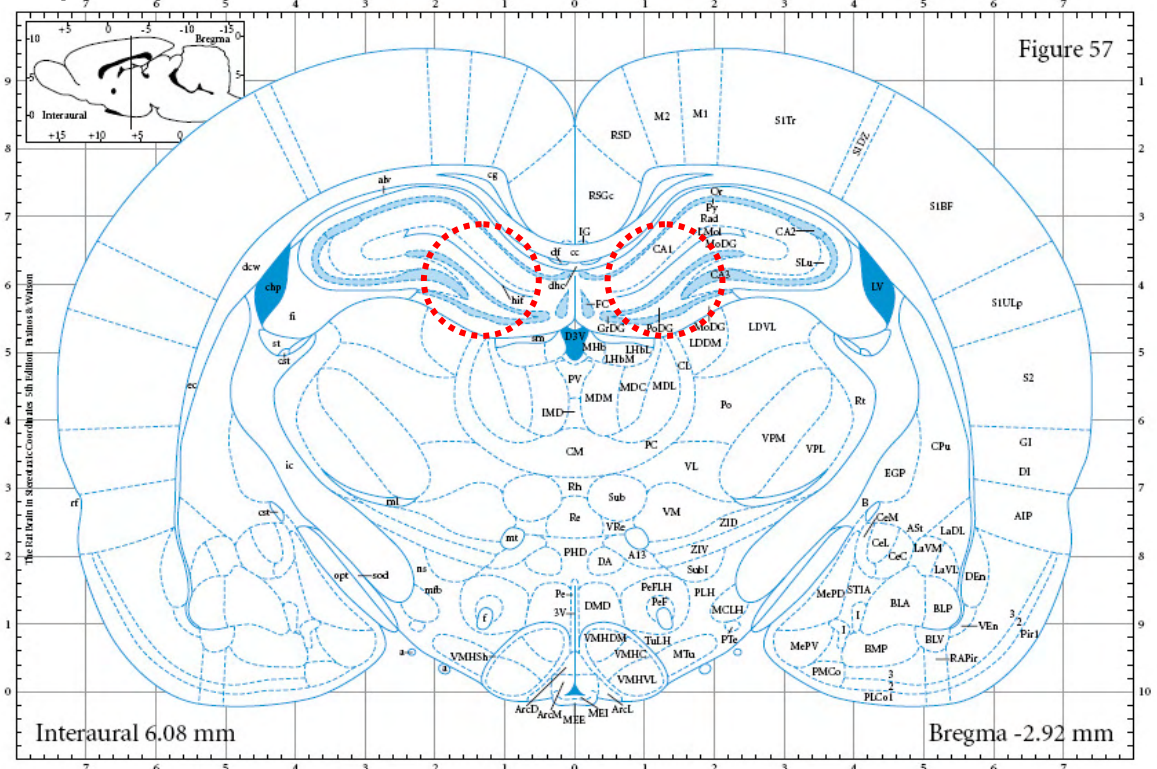
Conforme explicado no item 3.3, duas sessões de natação forçada foram realizadas: uma exposição inicial (pré-teste) de 15 minutos, 24h antes do teste de 5 minutos. Uma, 19 e 23 horas após o pré-teste, os animais foram tratados com nicotina (NIC) (0,5 mg/kg; s.c.) ou imipramina (IMI) (um antidepressivo tricíclico de referência) (15 mg/kg; i.p.) ou salina (SAL) (1 mL/kg, s.c.). Uma hora após a última injeção, os animais foram colocados individualmente na cuba (teste).

Imediatamente (grupos SAL + TNF, NIC + TNF, IMI + TNF) e 30 minutos após o teste (grupos SAL pós-TNF, NIC pós-TNF, IMI pós-TNF), os animais foram decapitados e o encéfalo foi rapidamente retirado sobre placa de gelo e congelado em solução de isopentano em caixa térmica contendo gelo seco e mantido a -80°C. Posteriormente, o encéfalo foi fatiado (fatias de 50 µm) em criostato (temperatura de trabalho: -20°C) segundo as coordenadas registradas por Paxinos e Watson (2007). As estruturas obtidas por punch de 15 gauges (círculos vermelhos), com suas respectivas coordenadas, são mostradas na figura 7. Após coleta, os punches foram homogeneizados e os neurotransmissores (5-HT, 5-HIAA e noradrenalina) quantificados por HPLC, como descrito no item 3.4.

Hipotálamo (HT):



Hipocampo Dorsal (HD):



4.3 Avaliação das alterações da concentração plasmática de corticosterona após tratamento subcrônico com nicotina ou imipramina e exposição ao TNF

Conforme explicado no item 2.3, duas sessões de natação forçada foram realizadas: uma exposição inicial (pré-teste) de 15 minutos, 24h antes do teste de 5 minutos. Uma, 19 e 23 horas após o pré-teste, os animais foram tratados com nicotina (NIC) (0,5 mg/kg; s.c.), imipramina (IMI) (um antidepressivo tricíclico de referência) (15 mg/kg; i.p.) ou salina (SAL) (1 mL/kg; s.c.). Uma hora após a última injeção, os animais foram colocados individualmente na cuba (teste). Em paralelo, outro grupo de animais foi submetido ao mesmo esquema de tratamento subcrônico mas não foi exposto ao TNF.

Imediatamente após o teste ou uma hora após a última injeção de nicotina ou imipramina, os animais foram decapitados e o sangue foi coletado em eppendorfs heparinizados. Posteriormente, as amostras foram centrifugadas a 13.200 rpm por 10 min a 4°C. O plasma foi separado e congelado a -80°C até a quantificação da corticosterona, conforme descrito no item 3.5. As coletas de sangue foram realizadas entre 11:00 e 14:00 para evitar variações circadianas da corticosterolemia.

4.4 Avaliação das alterações na transmissão serotoninérgica, após exposição ao TNF e tratamento subcrônico com nicotina ou imipramina e adrenalectomia

Para este protocolo foram utilizados dois grupos de ratos: animais adrenalectomizados (grupos: SAL + ADX, NIC + ADX, IMI + ADX) e animais não adrenalectomizados, mas submetidos ao mesmo estresse cirúrgico (grupos SHAM: SAL, NIC, IMI). Após a recuperação da cirurgia (descrita no item 3.6), todos os animais foram submetidos ao TNF. Uma, 19 e 23 horas após o pré-teste, os animais foram tratados com nicotina (NIC) (0,5 mg/kg; s.c.), imipramina (IMI) (um antidepressivo tricíclico de referência) (15 mg/kg; i.p.) ou salina (SAL) (1 mL/kg; s.c.). Imediatamente após o teste, realizado 1 hora após a última injeção, os animais foram decapitados e o encéfalo coletado sobre placa de gelo. O hipocampo total foi dissecado e congelado a -80°C para posterior determinação das concentrações de

serotonina (5-HT) e seu metabólito (5-HIAA) por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC), conforme descrito no item 3.4.

4.5 Avaliação das alterações do receptor serotoninérgico 5-HT_{1A} induzidas pelo TNF e pelo tratamento subcrônico com nicotina ou imipramina

Uma, 19 e 23 horas após o pré-teste de 15 minutos, os animais foram tratados com nicotina (NIC) (0,5 mg/kg; s.c.), imipramina (IMI) (um antidepressivo tricíclico de referência) (15 mg/kg; i.p.) ou salina (SAL) (1 mL/kg; s.c.). Imediatamente após o teste de 5 minutos, realizado 1h após a última injeção, os animais foram decapitados e o encéfalo retirado sobre placa de gelo. O hipocampo total foi dissecado e congelado (-80°C) para posterior determinação do receptor 5-HT_{1A} pela técnica de *western blotting*, conforme descrito no item 3.7.

4.6 Avaliação das alterações da ativação do GR induzidas pelo TNF e pelo tratamento subcrônico com nicotina ou imipramina

Segundo o protocolo do TNF, descrito no item 3.3, 1, 19 e 23 horas após o pré-teste, os animais foram tratados com nicotina (NIC) (0,5 mg/kg; s.c.), imipramina (IMI) (um antidepressivo tricíclico de referência (15 mg/kg; i.p.) ou salina (SAL) (1 mL/kg; s.c.). Imediatamente após o teste de 5 minutos, realizado 1 hora após a última injeção, os animais foram decapitados. Em paralelo, outro grupo de animais foi tratado com nicotina, imipramina ou salina, mas não foi exposto à natação forçada. Estes animais foram sacrificados 1 hora após a última injeção. O encéfalo, então, foi retirado sobre placa de gelo e o hipocampo total foi dissecado e congelado (-80°C) para posterior determinação do GR pela técnica de *western blotting*, conforme descrito no item 3.8.

4.7 Avaliação do efeito do prazosina nas alterações neuroquímicas induzidas pelo TNF

Conforme explicado no item 2.3, duas sessões de natação forçada foram realizadas: uma exposição inicial (pré-teste) de 15 minutos, 24h antes do teste de 5 minutos. Uma hora antes do teste de 5 minutos, um grupo recebeu salina enquanto outro recebeu prazosina 1 mg/kg (i.p.).

Os animais foram colocados individualmente na cuba e imediatamente após o teste de 5 minutos foram decapitados e o encéfalo foi rapidamente retirado sobre placa de gelo e congelado em solução de isopentano em caixa térmica contendo gelo seco e mantido a -80°C. Posteriormente, os encéfalos foram fatiados (fatias de 50 µm) em criostato (temperatura de trabalho: -20°C) segundo as coordenadas registradas por Paxinos e Watson (2007). As estruturas obtidas por minipunches (hipotálamo, hipocampo dorsal e ventral e núcleo dorsal e mediano da rafe), com suas respectivas coordenadas, são mostradas na figura 4. Após coleta, os minipunches foram homogeneizados e os neurotransmissores (5-HT, 5-HIAA e noradrenalina) quantificados por HPLC, como descrito no item 3.4.

4.8 Análise estatística

Os efeitos do tratamento subcrônico com nicotina, imipramina ou prazosina nos parâmetros comportamentais do TNF assim como as alterações do receptor 5-HT_{1A} induzidas pelo TNF e pelo tratamento subcrônico com nicotina ou imipramina foram analisados por ANOVA unifatorial. Quando as diferenças encontradas foram consideradas significativas ($p \leq 0,05$), o teste de *Duncan* foi utilizado.

As alterações neuroquímicas, da corticosterolemia e da quantificação de GR induzidas pelo tratamento subcrônico com nicotina ou imipramina e exposição ao TNF foram analisadas por ANOVA bifatorial (fator 1-tratamento, fator 2-TNF). Os efeitos da adrenalectomia no tratamento subcrônico com nicotina ou imipramina também foram analisados por ANOVA bifatorial (fator 1-tratamento, fator 2-adrenalectomia). Quando as diferenças encontradas foram consideradas significativas ($p \leq 0,05$), o teste-F de comparações planejadas foi aplicado.

Os dados foram expressos como média \pm erro padrão da média (e.p.m.). Para a confecção dos gráficos, utilizou-se o programa Excel e a análise estatística foi realizada pelo programa Statistica AX, versão 5.5.

5 Resultados

5.1 Efeito do tratamento subcrônico com nicotina ou imipramina nos parâmetros comportamentais do TNF

A figura 8 mostra os efeitos do tratamento subcrônico com nicotina e com imipramina nos parâmetros comportamentais do TNF. ANOVA mostrou diferenças significativas ($F_{(2,23)}=5,453$, $p=0,011$) no parâmetro imobilidade entre os grupos ($n=8-9$ /grupo) tratados e salina. A nicotina e a imipramina reduziram em 39% ($p=0,025$) e 50% ($p=0,014$), respectivamente, as contagens de imobilidade em relação ao grupo salina ($22,4 \pm 2,6$ contagens/5 min). Por outro lado, ANOVA mostrou não haver diferenças ($F_{(2,23)}=2,812$, $p=0,081$) entre os grupos quanto as contagens de natação (SAL: $13,40 \pm 1,90$; NIC: $7,9 \pm 1,90$; IMI: $7,00 \pm 2,40$). Em relação às contagens de escalada, ANOVA mostrou haver diferenças estatísticas entre os grupos tratados e o grupo salina ($F_{(2,23)}=6,509$, $p=0,006$), sendo que o tratamento subcrônico com nicotina e imipramina aumentou em 52% ($38,5 \pm 4,4$; $p=0,014$) e 66% ($41,90 \pm 3,30$; $p=0,007$), respectivamente, as contagens de escalada em relação ao grupo salina ($25,30 \pm 2,70$).

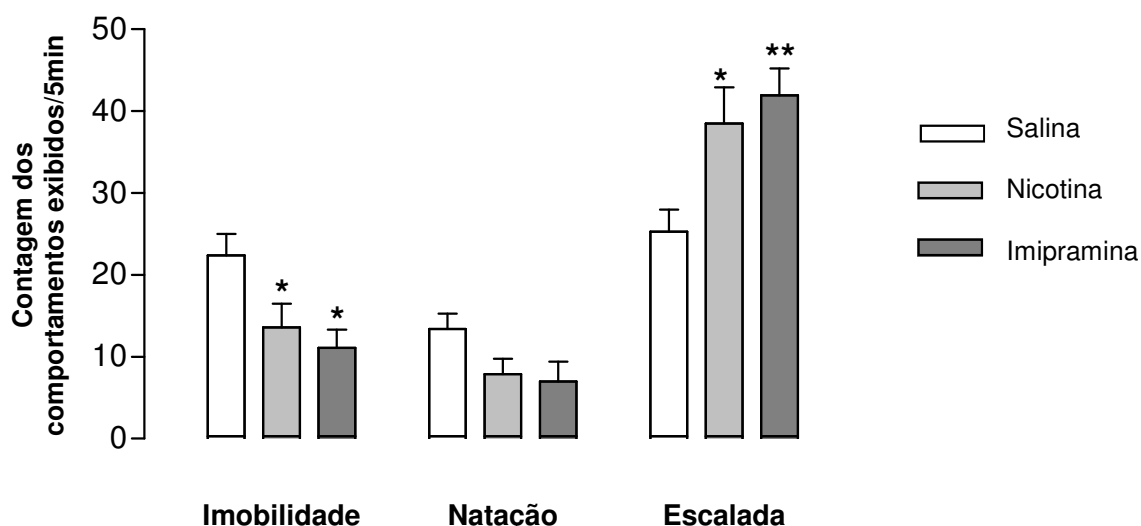


Figura 8 - Comportamentos de imobilidade, natação e escalada a cada 5 segundos no teste de 5 minutos do TNF, após o tratamento subcrônico com nicotina (0,5 mg/kg, s.c.) ou imipramina (15 mg/kg, i.p.). As barras representam média \pm e.p.m. ($n=9-14$ animais/grupo). * $p<0,05$ em relação ao grupo salina, ** $p<0,01$ em relação ao grupo salina.

5.2 Avaliação das alterações neuroquímicas após tratamento subcrônico com nicotina ou imipramina e exposição ao TNF

A figura 9 mostra os efeitos do tratamento subcrônico com nicotina e com imipramina nas concentrações teciduais de 5-HT (9A), 5-HIAA (9B) e no *turnover* da 5-HT (9C) após exposição ao TNF.

O estresse de natação forçada *per se* aumentou em 91,2% ($452,13 \pm 63,73$ ng/mg tecido; $F_{(3,36)} = 3,68$, $p < 0,05$), 100,3% ($206,56 \pm 42,64$ ng/mg tecido; $F_{(3,36)} = 3,77$, $p > 0,05$) e 153,3% ($382,82 \pm 39,55$ ng/mg tecido; $F_{(3,36)} = 4,48$, $p < 0,01$) o conteúdo de 5-HT no hipocampo ventral (HV), hipocampo dorsal (HD) e hipotálamo (HT), respectivamente, em relação ao grupo SAL sem TNF (HV: $452,13 \pm 63,73$ ng/mg tecido; HD: $103,08 \pm 16,5$ ng/mg tecido; HT: $150,8 \pm 41,66$ ng/mg tecido).

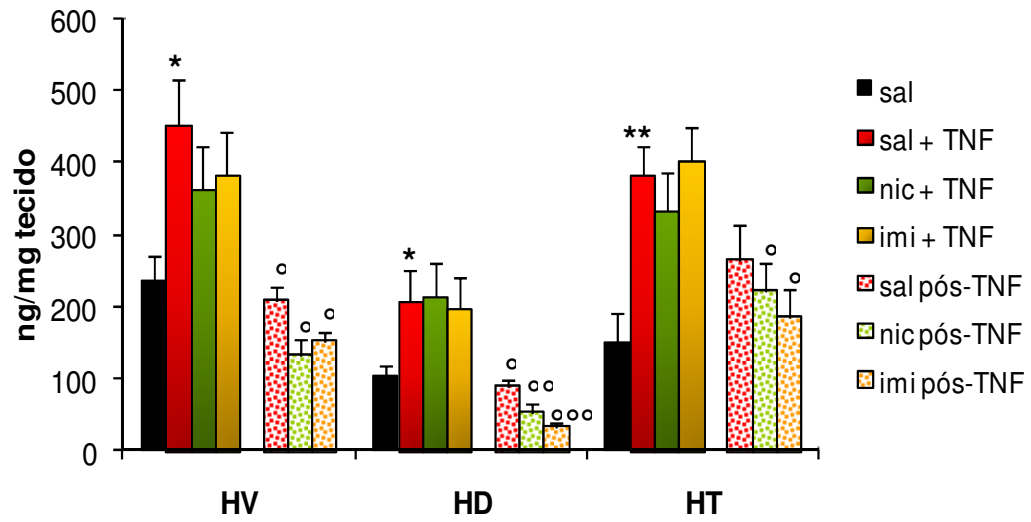
Quanto ao conteúdo do metabólito da 5-HT, o 5-HIAA, o estresse de natação também promoveu aumento de 109,7% ($1138,10 \pm 133,16$ ng/mg tecido; $F_{(3,46)} = 5,59$, $p < 0,01$), 113,9% ($807,80 \pm 107,25$ ng/mg tecido; $F_{(3,38)} = 4,44$, $p < 0,01$) e 116,8% ($982,3 \pm 111,07$ ng/mg tecido; $F_{(3,36)} = 3,67$, $p < 0,05$) no HV, HD e HT, respectivamente, em relação ao grupo SAL sem TNF (HV: $542,73 \pm 27,34$ ng/mg tecido, HD: $377,61 \pm 34,64$ ng/mg tecido, HT: $453,0 \pm 67,45$ ng/mg tecido).

ANOVA mostrou não haver diferenças significativas no *turnover* da 5-HT entre os grupos SAL sem TNF e o grupo SAL+TNF nas três estruturas avaliadas (HV: $F_{(3,15)} = 0,0015$, $p > 0,05$; HD: $F_{(3,21)} = 0,413$, $p > 0,05$; HT: $F_{(3,19)} = 2,476$, $p > 0,05$).

Em relação ao grupo SAL+TNF, o tratamento subcrônico com nicotina não reverteu significativamente as alterações no conteúdo tecidual de 5-HT (HV: $F_{(3,26)} = 1,025$, $p > 0,05$; HD: $F_{(3,17)} = 0,543$, $p > 0,05$; HT: $F_{(3,21)} = 0,204$, $p > 0,05$) ou 5-HIAA (HV: $F_{(3,26)} = 0,002$, $p > 0,05$; HD: $F_{(3,17)} = 0,118$, $p > 0,05$; HT: $F_{(3,21)} = 0,504$, $p > 0,05$) induzidas pelo estresse de natação forçada. A imipramina também não reverteu significativamente as alterações no conteúdo tecidual de 5-HT (HV: $F_{(3,25)} = 0,622$, $p > 0,05$; HD: $F_{(3,20)} = 0,097$, $p > 0,05$; HT: $F_{(3,24)} = 0,174$, $p > 0,05$) ou 5-HIAA (HV: $F_{(3,25)} = 0,025$, $p > 0,05$; HD: $F_{(3,20)} = 0,352$, $p > 0,05$; HT: $F_{(3,24)} = 0,388$, $p > 0,05$) induzidas pelo estresse de natação forçada.

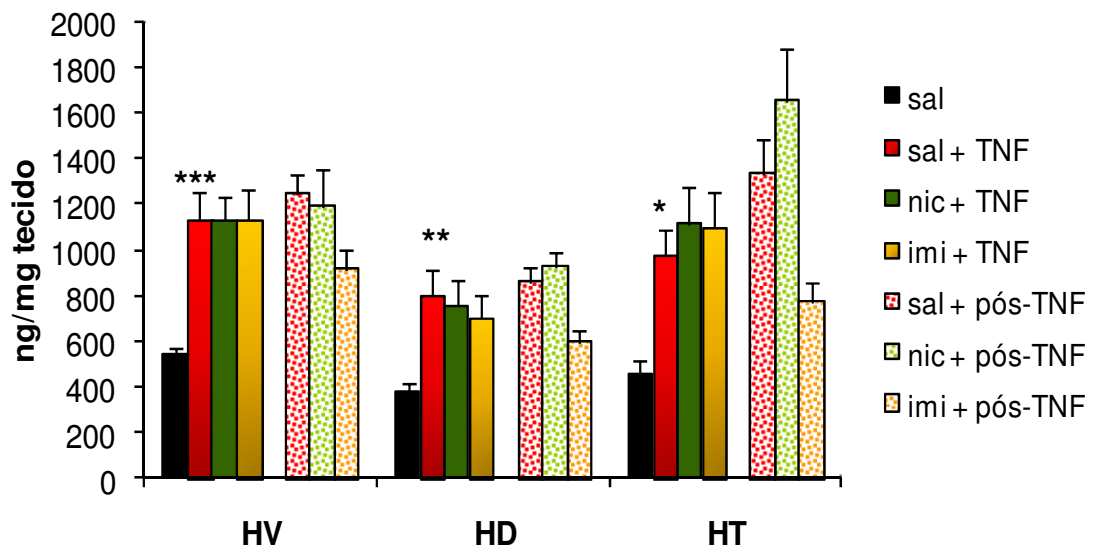
5-HT

A



5-HIAA

B



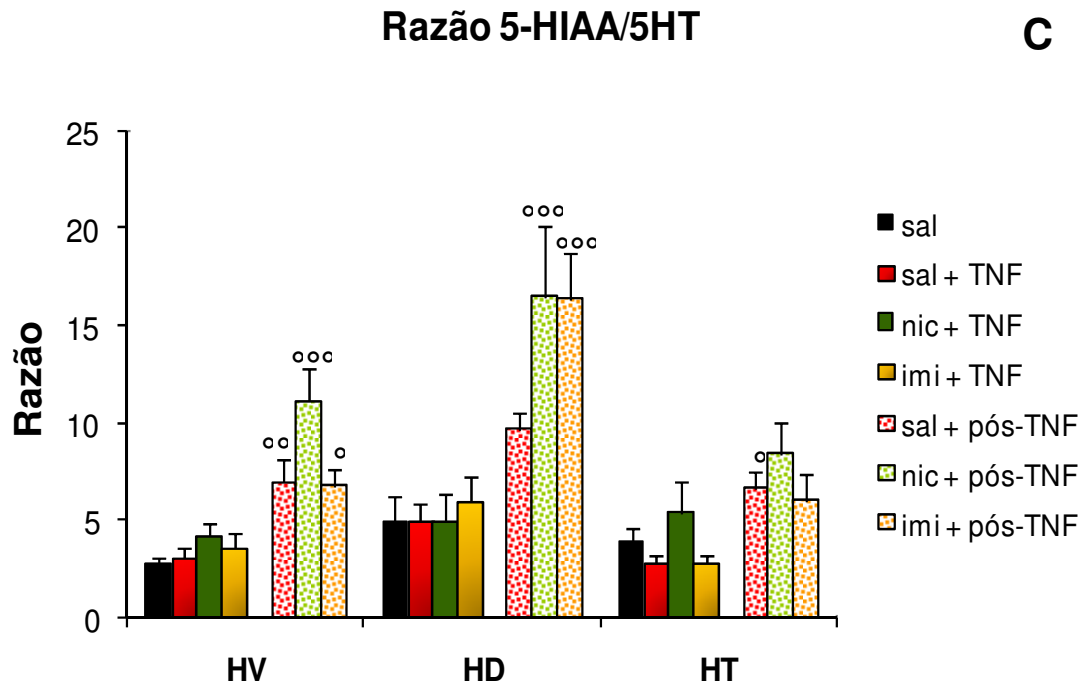
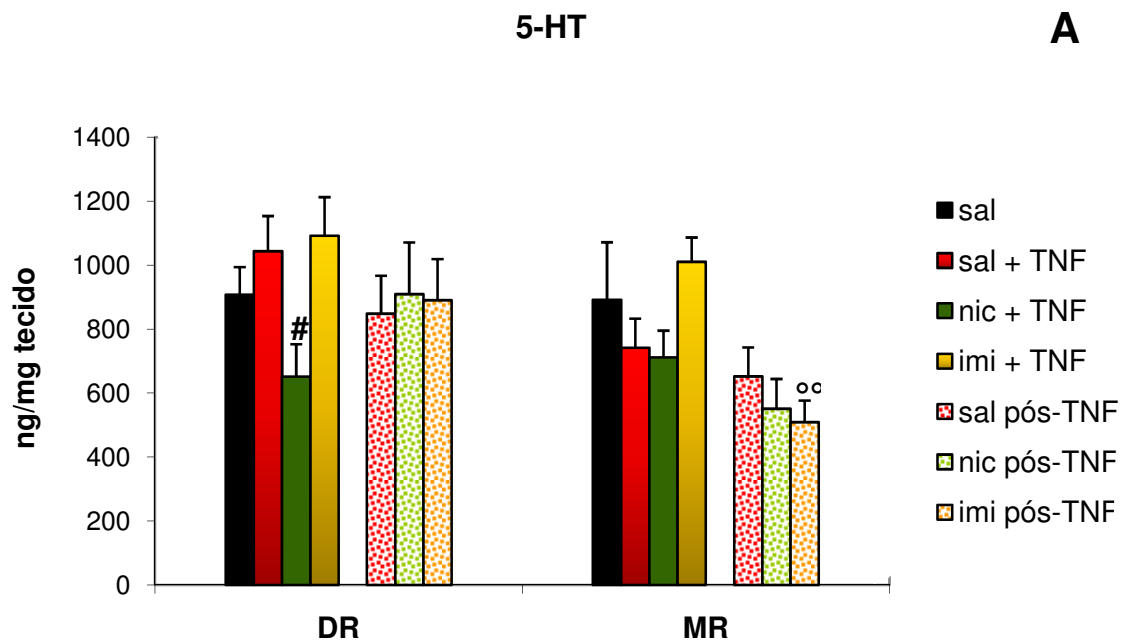


Figura 9 - Efeitos do tratamento subcrônico com nicotina ou imipramina nas concentrações teciduais de 5-HT (A), 5-HIAA (B) e no *turnover* (C) após a exposição ao estresse de natação forçada no hipocampo dorsal (HD), ventral (HV) e hipotálamo (HT). As barras lisas e hachuradas correspondem aos animais sacrificados imediatamente e 30 min após o TNF, respectivamente (n=9-14 animais/grupo). * p<0,05 em relação ao grupo sal, ** p<0,01 em relação ao grupo SAL, ***p<0,001 em relação ao grupo SAL, °p<0,05 em relação ao respectivo grupo + TNF, °°p<0,01 em relação ao respectivo grupo + TNF, °°°p<0,001 em relação ao respectivo grupo + TNF

Em relação ao grupo SAL, no núcleo dorsal da rafe (DR), o estresse de natação forçada *per se* não promoveu alterações estatisticamente significativas no conteúdo de 5-HT ($F_{(3,28)}=0,91$, $p>0,05$) ou no *turnover* da 5-HT ($F_{(3,28)}=3,22$, $p>0,05$), mas alterou significativamente o conteúdo tecidual de 5-HIAA ($F_{(3,28)}=5,81$, $p<0,05$). No núcleo mediano da rafe (MR), o estresse de natação forçada *per se* não promoveu alterações estatisticamente significativas no conteúdo de 5-HT ($F_{(3,28)}=0,54$, $p>0,05$), mas alterou significativamente o conteúdo tecidual de 5-HIAA ($F_{(3,28)}=5,12$, $p<0,05$) e o *turnover* da 5-HT ($F_{(3,28)}=4,59$, $p>0,05$).

O tratamento subcrônico com nicotina reduziu em 38% o conteúdo de 5-HT no DR ($650,90 \pm 102,31$ ng/mg tecido; $F_{(3,28)} = 3,46$, $p < 0,05$), em relação ao grupo de animais submetidos ao TNF ($1043,93 \pm 110,3$ ng/mg tecido). Não foi observada alteração significativa no conteúdo de 5-HIAA e no *turnover* da 5-HT. O tratamento subcrônico com imipramina aumentou o conteúdo de 5-HIAA tanto na DR ($3173,99 \pm 283,20$ ng/mg tecido; $F_{(3,28)} = 3,52$, $p < 0,05$) quanto no MR ($3166,42 \pm 421,32$ ng/mg tecido; $F_{(3,30)} = 4,37$, $p < 0,05$) em relação ao grupo SAL, sem alteração concomitante no conteúdo de 5-HT (figura 10A, 10B e 10C).



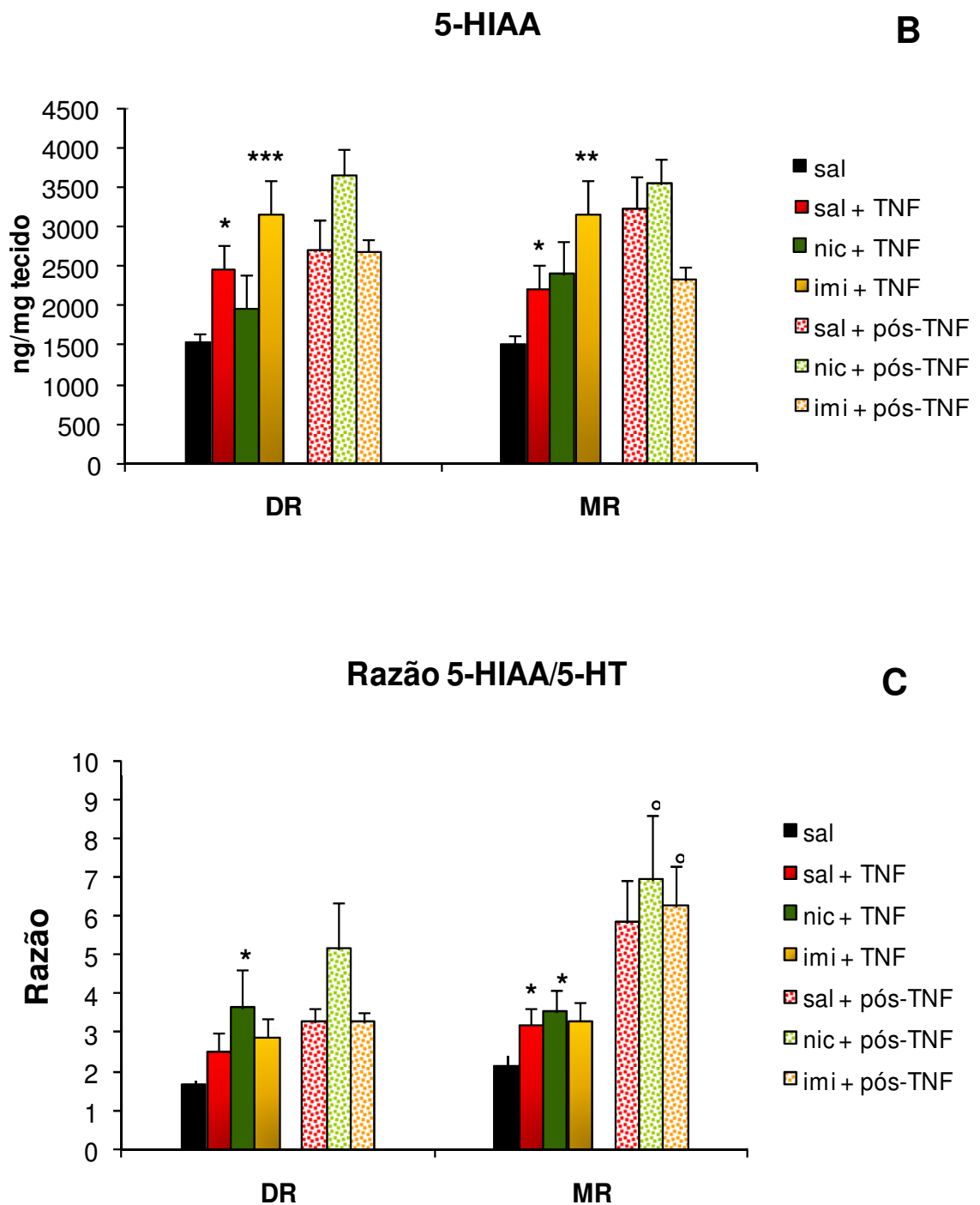
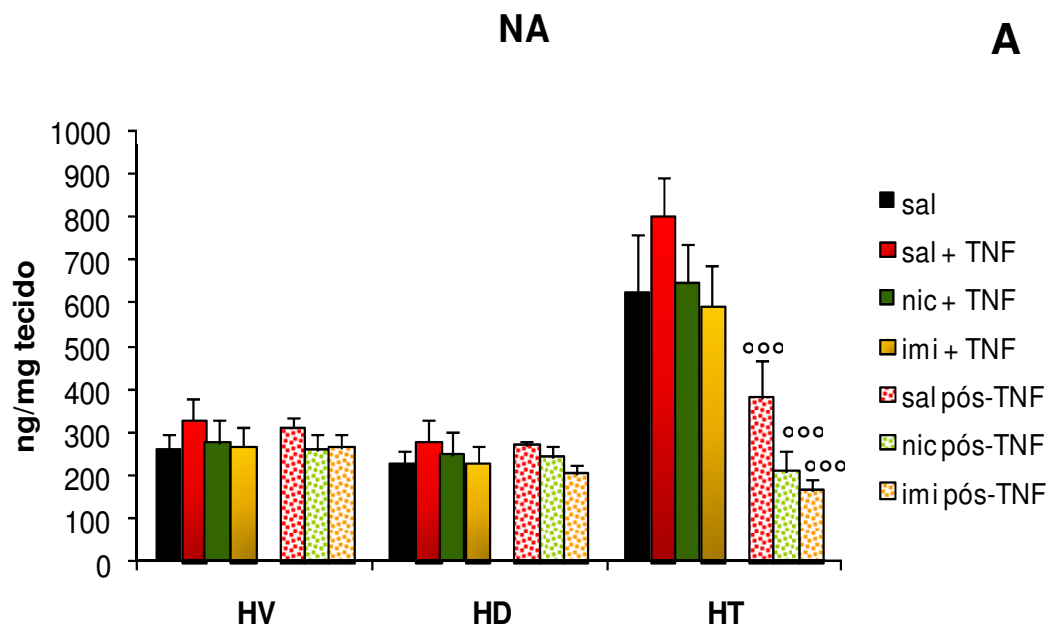


Figura 10 - Efeitos do tratamento subcrônico com nicotina ou imipramina nas concentrações teciduais de 5-HT (A), 5-HIAA (B) e no *turnover* (C) após exposição ao estresse de natação forçada no núcleo dorsal (DR) e mediano (MR) da rafe. As barras lisas e hachuradas correspondem aos animais sacrificados imediatamente e 30 min após o TNF, respectivamente (n=9-14 animais/grupo). *p<0,05 em relação ao grupo sal, **p<0,01 em relação ao grupo sal, ***p<0,001 em relação ao grupo sal, °p<0,05 em relação ao respectivo grupo + TNF, °°p<0,01 em relação ao respectivo grupo + TNF, #p<0,05 em relação ao grupo sal + TNF

Em relação às alterações no conteúdo de noradrenalina (NA), estas foram mais evidentes no HT e DR. O estresse de natação *per se* aumentou em 62,5% ($1351,32 \pm 166,79$ ng/mg tecido; $F_{(3,28)} = 3,25$, $p < 0,05$) o conteúdo de NA no DR, em relação ao grupo de animais não submetidos ao TNF ($831,71 \pm 72,48$ ng/mg tecido). O tratamento subcrônico com nicotina ou imipramina reverteu em 29,63% ($915,22 \pm 113,45$ ng/mg tecido; $F_{(3,28)} = 3,34$, $p < 0,05$) e 21,2% ($1065,0 \pm 141,14$ ng/mg tecido; não significativo), respectivamente, o aumento da NA induzido pelo TNF (comparação com o grupo SAL+TNF). Quanto ao hipotálamo, foi observado um padrão similar de efeitos, mas que não foram estatisticamente significativos (figura 11A, 11B).



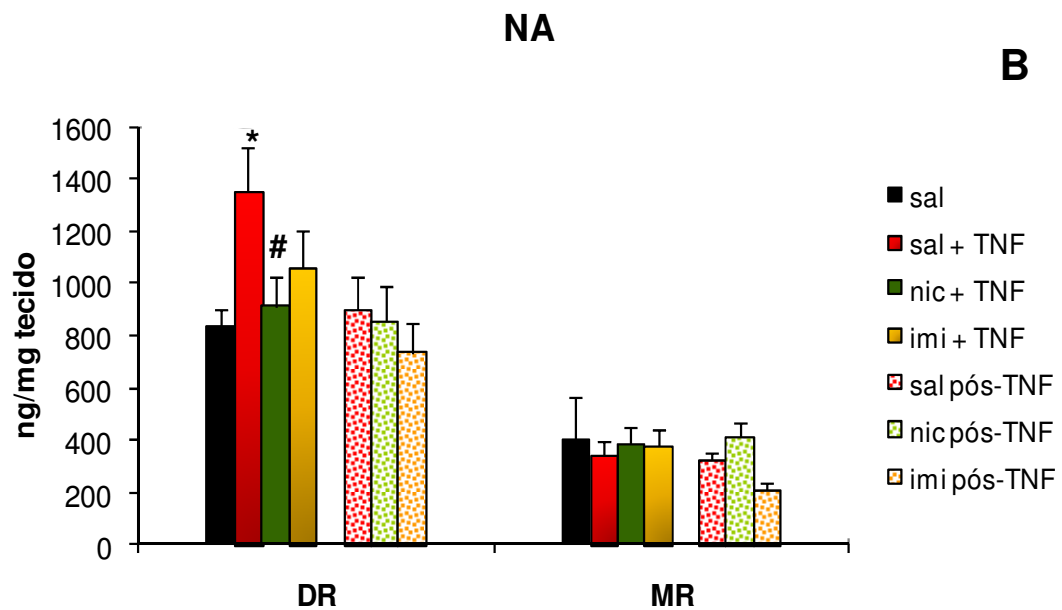


Figura 11 - Efeitos do tratamento subcrônico com nicotina ou imipramina nas concentrações teciduais de NA no hipocampo dorsal (HD), ventral (HV) e hipotálamo (HT) (A) e núcleo dorsal (DR) e mediano (MR) da rafe (B) após exposição ao estresse de natação forçada. As barras lisas e hachuradas correspondem aos animais sacrificados imediatamente e 30 min após o TNF, respectivamente (n=9-14 animais por grupo). * $p < 0,05$ em relação ao grupo sal, # $p < 0,05$ em relação ao grupo sal+TNF, °° $p < 0,001$ em relação ao respectivo grupo +TNF

Em relação aos valores obtidos após 30 minutos do TNF, no HV e no HD, ANOVA mostrou haver diferenças significativas no conteúdo tecidual de 5-HT (HV: $F_{(5,68)}=6,99$, $p < 0,05$; HD: $F_{(5,56)}=5,52$, $p < 0,05$) e no *turnover* da 5-HT (HV: $F_{(5,68)}=8,69$, $p < 0,05$, HD: $F_{(5,56)}=8,11$, $p < 0,05$) no HV. No HT, houve diferenças significativas no conteúdo tecidual de 5-HT ($F_{(5,65)}=3,56$, $p < 0,05$), 5-HIAA ($F_{(5,65)}=3,85$, $p < 0,05$) e no *turnover* da 5-HT ($F_{(5,65)}=4,18$, $p < 0,05$). No DR, ANOVA não mostrou diferenças significativas no conteúdo de 5-HT, 5-HIAA ou no *turnover* da 5-HT. No MR, houve diferenças significativas somente no conteúdo tecidual do 5-HIAA ($F_{(5,51)}=4,14$, $p < 0,05$) e no *turnover* da 5-HT ($F_{(5,51)}=3,28$, $p < 0,05$). Quanto à quantificação tecidual de NA, ANOVA mostrou haver alterações significativas somente no HT ($F_{(5,65)}=9,91$, $p < 0,001$).

5.3 Avaliação das alterações da concentração plasmática de corticosterona após tratamento subcrônico com nicotina ou imipramina e exposição ao TNF

A figura 12 mostra os efeitos do tratamento subcrônico com nicotina ou imipramina no aumento da corticosterolemia induzida pelo TNF. O nível basal de corticosterona (grupo SAL sem TNF) foi de $7,95 \pm 2,08 \mu\text{g}/100 \text{ mL}$. ANOVA bifatorial mostrou efeito significativo da natação forçada ($F_{(1,57)}=18,380$, $p=0,000071$) e do tratamento ($F_{(2,57)}=6,217$, $p=0,0036$). Ainda, houve interação significativa entre os dois fatores ($F_{(2,57)}=3,652$, $p=0,0322$).

O teste F de comparações planejadas mostrou que o tratamento com nicotina não promoveu alterações significativas da corticosterolemia basal ($p=0,7845$). Por outro lado, o aumento de 336% da corticosterona basal após exposição ao TNF ($34,71 \pm 3,53 \mu\text{g}/100 \text{ mL}$; $p=0,000013$) foi reduzido em 51,4% após tratamento com nicotina ($17,85 \pm 2,5 \mu\text{g}/100 \text{ mL}$; $p=0,00484$). O tratamento *per se* com imipramina, por outro lado, promoveu aumento de 206% da corticosterona basal ($24,38 \pm 6,44 \mu\text{g}/100 \text{ mL}$; $p=0,00594$), não reduzindo significativamente a hipercortisolemia induzida pelo TNF ($31,94 \pm 6,19 \mu\text{g}/100 \text{ mL}$; $p=0,6321$).

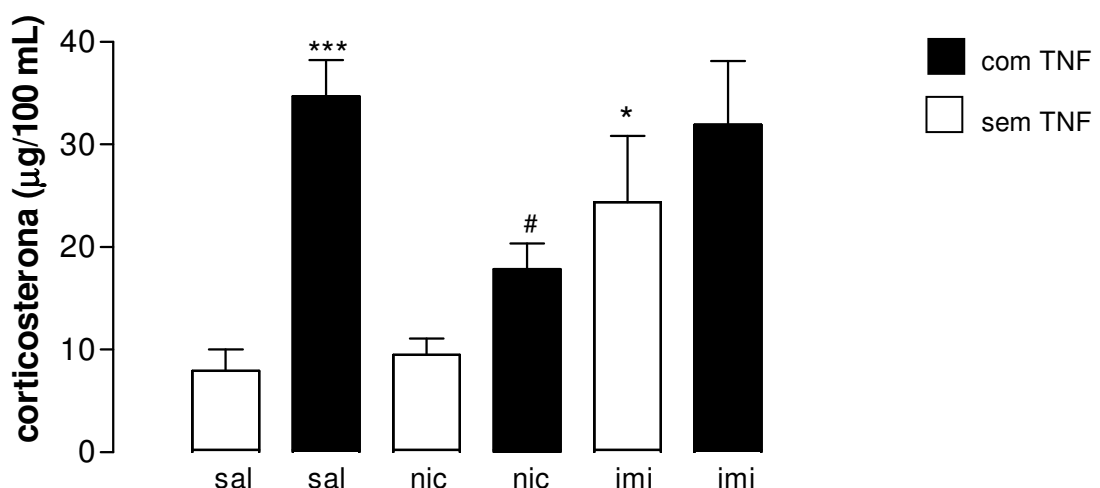


Figura 12 - Concentrações plasmáticas de corticosterona após o tratamento subcrônico com nicotina (NIC 0,5 mg/kg, s.c.), imipramina (IMI 15 mg/kg, i.p.) ou salina (SAL), com (barras escuras) ou sem (barras claras) exposição ao TNF (n=6-7 animais/grupo). As barras representam média \pm e.p.m.. * $p<0,05$ em relação aos grupos SAL sem TNF e NIC sem TNF, *** $p<0,001$ em relação ao grupo SAL sem TNF, # $p<0,05$ em relação ao grupo SAL com TNF.

5.4 Avaliação das alterações na transmissão serotoninérgica após exposição ao TNF e tratamento subcrônico com nicotina ou imipramina e adrenalectomia

ANOVA bifatorial do *turnover* da serotonina (razão 5-HIAA/5-HT), usada como índice de atividade serotoninérgica, mostrou efeito significativo do tratamento subcrônico ($F_{(2,49)}=21,29$, $p<0,001$) e da adrenalectomia ($F_{(1,49)}=8,96$, $p<0,01$), mas não houve interação significativa entre os dois fatores ($F_{(2,49)}=0,4112$, $p>0,05$). A adrenalectomia *per se* não alterou o *turnover* da 5-HT induzido pela natação forçada nem a resposta neuroquímica ao tratamento com imipramina. Por outro lado, aumentou discretamente o *turnover* da 5-HT no grupo tratado com nicotina (figura 13).

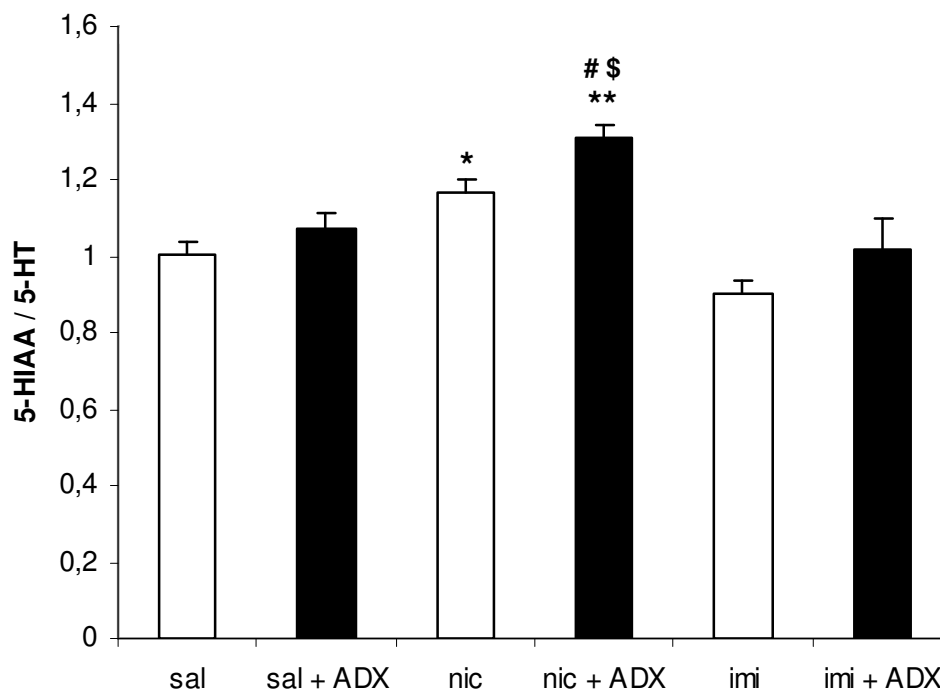


Figura 13 - Efeitos da adrenalectomia (ADX) na resposta neuroquímica ao tratamento subcrônico com nicotina e imipramina e exposição a natação forçada (n=8-10 animais/grupo). * $p<0,05$ em relação ao grupo sal/sham, # $p<0,05$ em relação ao grupo nic/sham, ** $p<0,01$ em relação ao grupo sal/adx, \$ $p<0,001$ em relação ao grupo imi/adx

5.5 Avaliação das alterações do receptor serotoninérgico 5-HT_{1A} induzidas pelo TNF e pelo tratamento subcrônico com nicotina ou imipramina

Não houve alterações estatisticamente significantes na densidade do receptor serotoninérgico 5-HT_{1A} após o tratamento subcrônico com nicotina ou imipramina e exposição à natação forçada (figura 14).

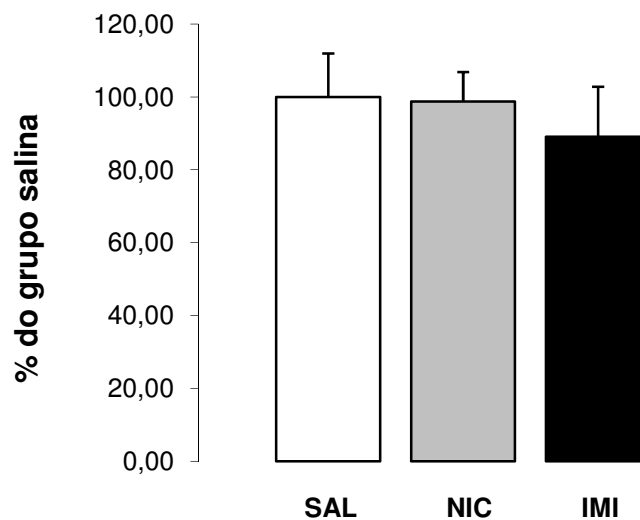


Figura 14 - Efeitos do tratamento subcrônico com nicotina ou imipramina e exposição à natação forçada na densidade do receptor 5-HT_{1A} no hipocampo total (n=9-10 animais/grupo).

5.6 Avaliação das alterações da ativação do GR induzidas pelo TNF e pelo tratamento subcrônico com nicotina ou imipramina

ANOVA bifatorial mostrou efeito significativo do tratamento subcrônico ($F_{(2,18)}=7,64$, $p<0,05$) e da exposição à natação forçada ($F_{(2,18)}=11,01$, $p<0,05$), mas não houve interação significativa entre os dois fatores ($F_{(2,18)}=2,22$, $p>0,05$).

Em relação ao grupo SAL, a exposição dos animais por 5 minutos à natação forçada não promoveu alterações significativas na expressão do GR ($p=0,845$). Em relação ao grupo SAL+TNF, o tratamento subcrônico com nicotina (1,5 mg/kg/24 horas) ou imipramina (45 mg/kg/24 horas) também não alterou a expressão do GR induzida pelo estresse de natação forçada (nic+TNF: $p=0,181$ e imi+TNF: $p=0,615$).

Por outro lado, nos animais tratados com nicotina e sem exposição à natação forçada (grupo nic), a expressão do GR foi reduzida em aproximadamente 78% ($F_{(1,22)}=8,42$, $p<0,01$) (figura 15).

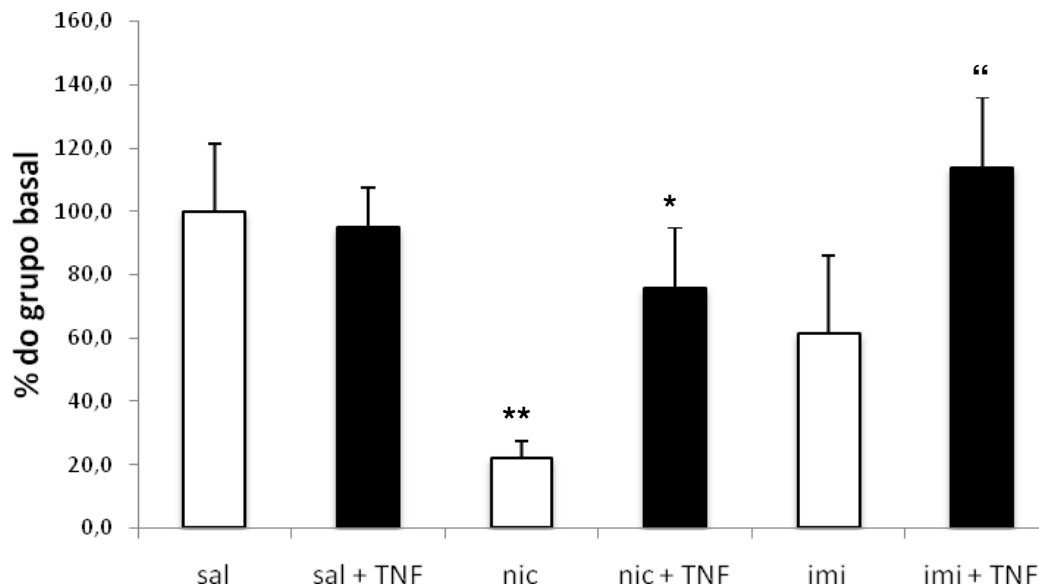
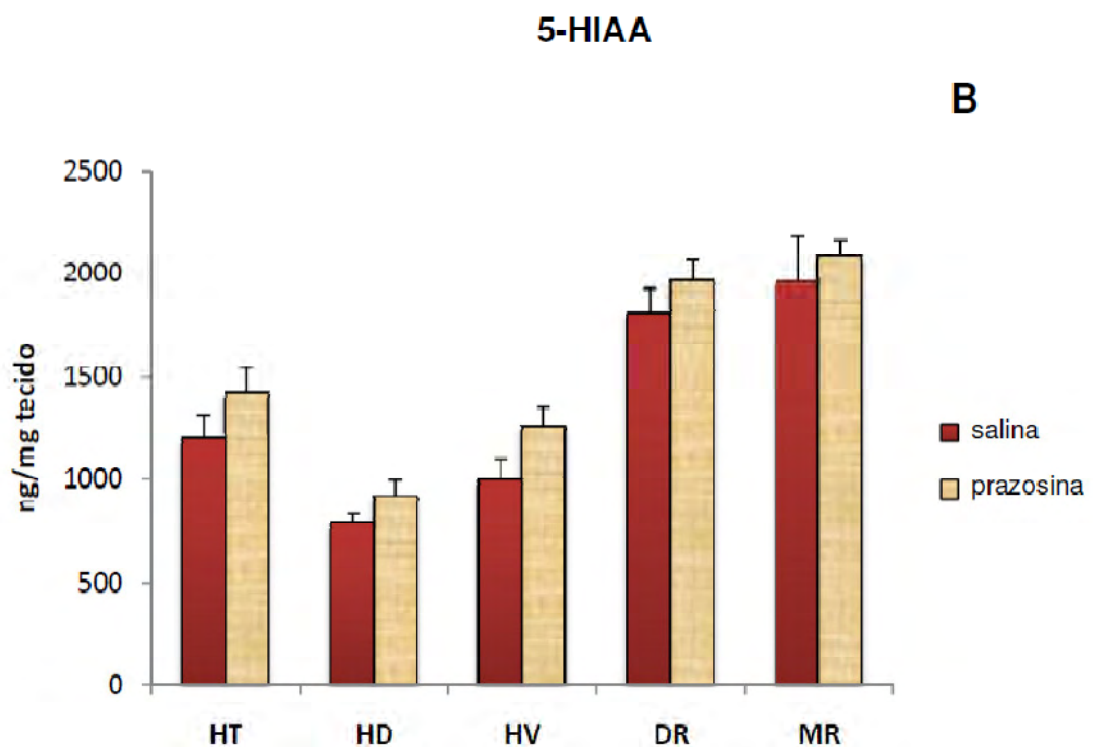
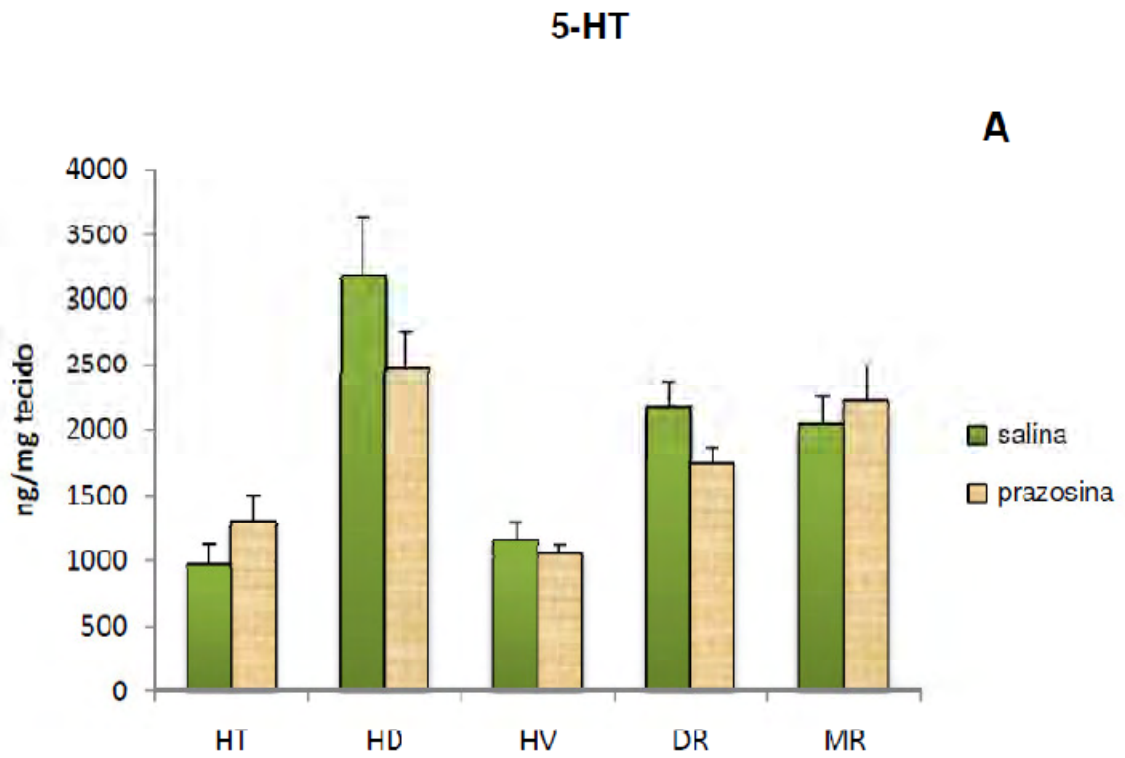


Figura 15 - Alterações da ativação do GR induzidas pelo tratamento subcrônico com nicotina ou imipramina e/ou pelo TNF. Os animais ($n=5$ animais/grupo) foram tratados com nicotina ou imipramina e submetidos (barras escuras) ou não (barras claras) ao TNF por 5 minutos. * $p<0,05$ em relação ao grupo nic, ** $p<0,01$ em relação ao grupo sal, “ $p<0,05$ em relação ao grupo imi

5.7 Avaliação do efeito da prazosina nas alterações neuroquímicas induzidas pelo TNF

ANOVA mostrou que o tratamento prévio com prazosina (1 mg/kg) promoveu diminuição de 38% no conteúdo tecidual de NA no MR ($114,26 \pm 18,6$ ng/mg tecido, $F_{(1,10)}=26,81$, $p<0,001$), em relação ao grupo salina ($309,6 \pm 32,8$ ng/mg tecido). Apesar de não ser estatisticamente significativa, foi possível verificar ainda pequena diminuição no conteúdo de 5-HT no DR e HD e de NA nas demais estruturas analisadas, sendo a redução de 63% no conteúdo de NA no DR ($584,3 \pm 96,1$ ng/mg

tecido, $p=0,116$), em relação ao grupo salina ($941,7 \pm 194,8$ ng/mg tecido), uma das mais proeminentes (figura 16).



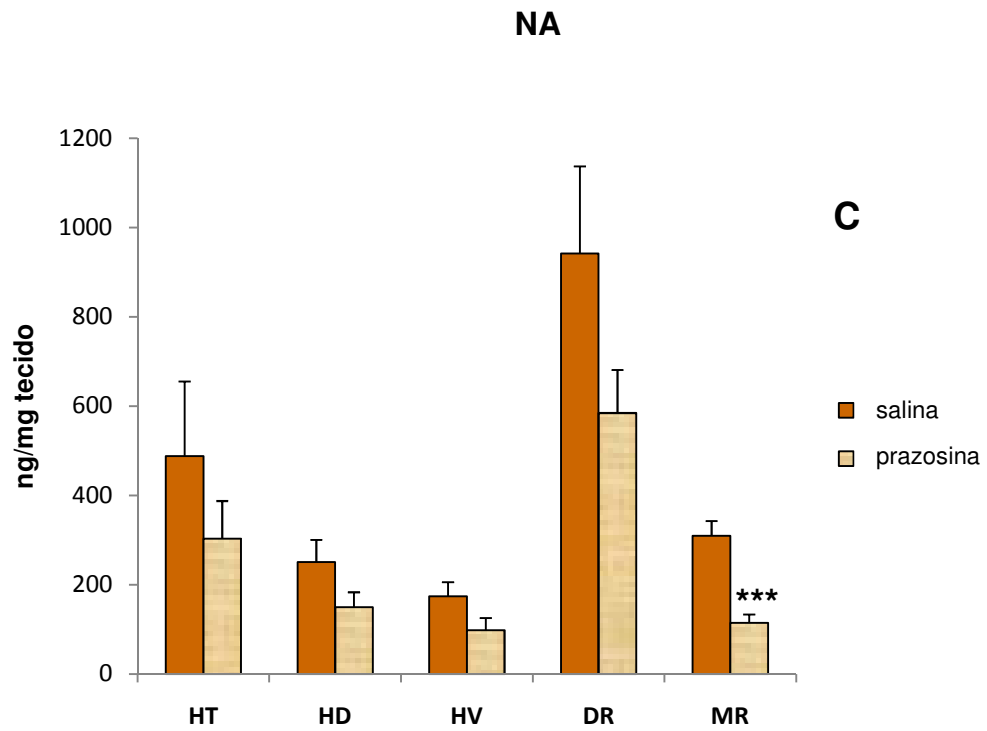


Figura 16 - Efeitos da prazosina nas concentrações teciduais de 5-HT (16A), 5-HIAA (16B) e noradrenalina (16C) induzidas pelo TNF, no hipocampo dorsal (HD), hipocampo ventral (HV), hipotálamo (HT) e núcleo dorsal (DR) e mediano (MR) da rafe. Os animais foram tratados com prazosina 1 mg/kg (barras claras) ou salina (barras escuras) 1h antes do teste de 5 min do protocolo do TNF (n=5-6 animais/grupo). ***p<0,001 em relação ao grupo salina

6 Discussão

O estresse, atualmente, é considerado um fator importante na fisiopatologia de muitos distúrbios psiquiátricos. Embora os efeitos do estresse agudo possam ser contrabalanceados por respostas adaptativas, o estresse intenso, repetido e prolongado pode eliciar alterações neuronais duradouras que constituirão as bases de doenças psiquiátricas, como a depressão.

Outra observação relevante refere-se aos levantamentos epidemiológicos que mostram elevada prevalência de tabagistas entre pacientes com depressão maior. Estas altas taxas de comorbidade sugerem uma provável relação causal: pacientes com depressão proeminente procurariam a nicotina para alívio dos sintomas (BALFOUR; RIDLEY, 2000).

Neste contexto, este trabalho teve por objetivo investigar as alterações neuroendócrinas e moleculares mediadas pela nicotina na resposta de adaptação ao estresse de natação forçada.

6.1 Natação forçada como modelo de estresse

Um modelo experimental de estresse é a natação forçada em roedores, base do modelo clássico de *screening* de antidepressivos, validado inicialmente por Porsolt, Le Pichon e Jalfre (1977). O Teste de Natação Forçada (TNF) consiste em colocar o animal numa cuba com água, de modo que ele seja forçado a nadar numa situação em que não há escape. Após várias tentativas de escapar, o animal finalmente cessa a movimentação, realizando somente movimentos mínimos necessários para manter-se com a cabeça fora da água, o que foi denominado de imobilidade. Nesse modelo, uma pré-exposição de 15 minutos à natação forçada reduz a latência para a imobilidade e aumenta o tempo de permanência nesta postura durante a maior parte do tempo, no teste subsequente de 5 minutos. A imobilidade é interpretada, segundo seus autores, com um estado de desamparo comportamental, refletindo a desistência do animal em assumir formas ativas de lidar com o estímulo estressor. Neste modelo, a maioria dos antidepressivos reduz o tempo de imobilidade, estimulando comportamentos ativos (PORSOLT; LE PICHON; JALFRE, 1977).

Visando à melhora na detecção da classe dos antidepressivos inibidores seletivos da recaptção de serotonina, Lucki (1997) e Cryan, Markou e Lucki (2002)

propuseram alterações (adotadas neste trabalho) ao modelo padronizado por Porsolt, Le Pichon e Jalfre (1977): aumento da coluna de água de 15-18 cm para 30 cm e uma nova técnica de análise do comportamento (agora desmembrada em natação, escalada e imobilidade) em intervalos de 5 segundos, nos 5 minutos da segunda exposição à natação. Neste TNF modificado, o tratamento com antidepressivos inibidores seletivos da recaptação de noradrenalina diminuiria a imobilidade com concomitante aumento da escalada e o tratamento com antidepressivos inibidores seletivos da recaptação de serotonina diminuiria a imobilidade com concomitante aumento da natação.

No presente estudo foi possível observar uma diminuição do tempo de imobilidade no teste da natação forçada após a administração subcrônica de imipramina (45 mg/kg/24 horas, i.p.), um antidepressivo tricíclico de referência, e nicotina (1,5 mg/kg/24 horas, s.c.), sugerindo, então, que a nicotina possuiria um potencial “efeito antidepressivo”. É sabido que agudamente a nicotina induz aumento da atividade locomotora (CRUZ; DELUCIA; PLANETA, 2005, 2008). Entretanto, vale ressaltar que o efeito comportamental da nicotina foi observado 1 hora após a última injeção. Após este intervalo de tempo, próprio do modelo de natação forçada adotado, a nicotina não mais produz alterações da atividade locomotora do animais.

Embora a relação entre estresse e depressão ainda não esteja totalmente compreendida, a maioria dos modelos animais para estudo da depressão e/ou dos antidepressivos envolve a exposição de animais saudáveis a combinações de condições ambientais aversivas (imobilização, choque nas patas, natação, separação materna, isolamento social, estresse imprevisível crônico). Dentre estes modelos destaca-se o Teste de Natação Forçada, dada a facilidade de seu uso e a validade preditiva consistente, discriminando inclusive os fármacos antidepressivos dos neurolépticos e ansiolíticos (CRYAN; MARKOU; LUCKI, 2002).

Contudo, a grande ressalva ao TNF reside no fato de que este não seria um modelo experimental para o estudo da depressão, mas sim um modelo animal de estresse que responderia agudamente a fármacos com potencial ação antidepressiva. Segundo Bruner & Vargas (1994), nesta visão do TNF como um modelo de estresse por natação, a movimentação do animal na água parece estar negativamente correlacionada com suas chances de sobrevivência. Assim sendo, a adoção da imobilidade seria interpretada como uma resposta adaptativa ao agente estressor e não como desamparo aprendido.

Calil et al. (2002) observaram que a alteração da coluna de água de 15-18 cm para 30 cm (como proposto por Cryan, Markou e Lucki, 2002) promoveu um decréscimo de 74% no tempo de imobilidade, com aumento concomitante da mobilização do glicogênio hepático e muscular, compatível com o aumento da atividade física. Estes autores observaram, então, que o aumento da altura da coluna de água é um fator determinante sobre o tempo de imobilidade dos animais. Esta modificação do modelo proposto por Porsolt, Le Pichon e Jalfre (1977) seria uma situação muito mais aversiva e a imobilidade nesta situação poderia representar mais claramente uma resposta adaptativa. Dessa forma, é possível concluir que protocolos experimentais diferentes induzem respostas fisiológicas diferentes, influenciando, portanto, a interpretação do tempo de imobilidade.

6.2 Alterações neuroquímicas e neuroendócrinas induzidas pela natação forçada

O sistema serotoninérgico parece ter um papel relevante no mecanismo neuroadaptativo ao estresse e ao tratamento antidepressivo. Esta hipótese é sustentada por evidências como: a) inibidores seletivos da recaptação de serotonina (5-HT) são tão eficazes no tratamento da depressão unipolar quanto os antidepressivos não-seletivos; b) a atividade terapêutica de alguns antidepressivos é reduzida pelo tratamento com para-clorofenilalanina (PCPA), um inibidor da síntese de 5-HT, mas não com alfa-metilparatirosina, um inibidor da síntese de catecolaminas; c) dietas livres de triptofano, o precursor da 5-HT, promove rebaixamento do humor; e d) os núcleos da rafe, sítio de origem da neurotransmissão serotoninérgica, são dramaticamente afetados pelo estresse de natação forçada (BORSINI, 1995; ADELL; CASANOVAS; ARTIGAS, 1997; KIRBY et al., 1997; ROCHE et al., 2003).

Entretanto, vale ressaltar que, apesar dos estudos exaustivos sobre os efeitos do estresse na neurotransmissão monoaminérgica, ainda não existe consenso, pois diferentes estressores produzem mudanças neuroquímicas distintas e sítio-específicas (ADELL; CASANOVAS; ARTIGAS, 1997; KIRBY et al., 1997). Essa heterogeneidade nas respostas dos sistemas neurotransmissores aos estressores

específicos pode ser fruto do envolvimento de neuromoduladores ou mesmo da interação entre os sistemas neurotransmissores (PRICE et al., 2002).

Assim, para a compreensão das alterações neuroquímicas e endócrinas subjacentes à resposta adaptativa ao estresse de natação e aos efeitos da nicotina e imipramina, os ratos foram decapitados após o teste da natação forçada e o conteúdo de serotonina, noradrenalina e metabólitos quantificado no hipocampo dorsal e ventral, hipotálamo, núcleo dorsal e mediano da rafe e a corticosterona, no plasma. Adell, Casanovas e Artigas (1997) e Kirby et al. (1997), salvo algumas diferenças nos protocolos empregados, observaram, pela técnica de microdiálise, uma resposta máxima da concentração da 5-HT em 40 minutos após o início da sessão de natação forçada. Desta forma, empregando-se a técnica de quantificação tecidual de neurotransmissores, avaliamos as alterações neuroquímicas (5-HT, 5-HIAA e NA) imediatamente e 30 minutos após o segundo teste de 5 minutos da natação forçada.

Entretanto, vale ressaltar que o perfil das alterações neuroquímicas observado nos experimentos 30 minutos após o estresse de natação ou se aproximaram bastante dos valores basais (comparação ao grupo salina sem exposição ao TNF) ou mimetizavam o perfil de alterações neuroquímicas dos grupos imediatamente após o TNF. Ou seja, para efeito de interpretação dos fenômenos envolvidos, estes dados não trouxeram maiores esclarecimentos. Desta forma, a discussão que se segue concentrou-se nos dados coletados imediatamente após a segunda sessão do TNF.

A quantificação do conteúdo de neurotransmissores em tecidos coletados *post-mortem*, diferentemente da técnica de microdiálise, além de pontual, não é capaz de diferenciar o *pool* intraneuronal de neurotransmissor do *pool* extracelular, menor, porém funcionalmente mais relevante (KIRBY et al., 1997). Na tentativa de superar este problema técnico das quantificações teciduais, além da concentração do neurotransmissor e seu metabólito, utilizamos em algumas análises a razão entre o metabólito (5-HIAA) e seu neurotransmissor (5-HT), denominada *turnover*, para estimar indiretamente a utilização do neurotransmissor e a atividade serotoninérgica (SUMMERS et al., 2003; PIERUCCI et al., 2009). Vale ressaltar também que devido às concentrações teciduais dos metabólitos da NA estarem muito próximas ao limite de detecção do método cromatográfico, problema técnico também descrito na

literatura científica (ANTKIEWICZ-MICHALUK et al., 2006; YALCIN et al., 2008), não foi possível quantificá-los.

Em linhas gerais, as concentrações extracelulares de 5-HT são influenciadas predominantemente pela liberação neuronal. Entretanto, outros fatores também podem contribuir para mudanças na 5-HT extracelular, tais como a taxa de síntese de 5-HT e a disponibilidade de triptofano, o aminoácido precursor da 5-HT. Também se destaca a regulação da liberação da 5-HT via autorreceptores localizados nos corpos celulares ou terminais serotoninérgicos, mecanismos de recaptação ou então pela taxa de metabolismo intraneuronal pela monoamino oxidase (MAO) (KIRBY et al., 1997). Ainda, mudanças na 5-HT extracelular podem ser produzidas por outros neurotransmissores que modulam a atividade serotoninérgica ou a liberação de 5-HT, a exemplo da interação 5-HT e adrenoceptores α -2 no hipocampo (O'LEARY et al., 2007) e 5-HT-GABA-CRF no núcleo da rafe (ROCHE et al., 2003).

Nos animais submetidos às duas sessões de natação forçada, em relação ao grupo controle salina, houve aumento significativo do *turnover* da 5-HT e do conteúdo de NA principalmente no núcleo dorsal da rafe (DR). Em paralelo, pode-se observar um aumento do conteúdo de 5-HT e da 5-HIAA no hipocampo ventral (HV), hipocampo dorsal (HD) e hipotálamo (HT). Sendo os núcleos da rafe a principal origem da inervação serotoninérgica a estruturas límbicas como hipocampo e hipotálamo (CHAOULOFF, 2000), os dados sugerem que o estresse de natação forçada foi capaz de ativar os núcleos da rafe, induzindo a liberação de 5-HT nas estruturas por eles inervados.

A ativação dos núcleos da rafe induzida pelo estresse de natação poderia resultar da interação com outras vias de neurotransmissão. Roche et al. (2003) demonstraram que o estresse de natação forçada aumenta a expressão de *c-fos* nos neurônios do *locus coeruleus*. Ambos os núcleos da rafe recebem projeções noradrenérgicas originadas desta região, sendo que os neurônios serotoninérgicos do DR estão sobre controle excitatório por adrenoceptores α -1 (O'LEARY et al., 2007). Desta forma, com base na via descrita pelos autores, poderia se supor que o aumento da NA no DR, via estimulação de adrenoceptores α -1 localizados nos corpos celulares dos neurônios do DR, poderia ocasionar a ativação da via serotoninérgica e, conseqüentemente, a liberação de 5-HT nas estruturas límbicas. A diminuição do conteúdo de NA no DR e de 5-HT no HD, HV e DR após tratamento

prévio dos animais com prazosina (um antagonista α_1 -adrenérgico) parece confirmar a participação deste receptor na resposta ao estresse de natação forçada.

Em relação ao papel fisiológico da 5-HT no hipocampo e hipotálamo em situações de estresse, Lanfumey et al. (2008), em sua extensa revisão sobre o assunto, mostraram haver uma interação recíproca entre o sistema serotoninérgico e o eixo hipotálamo-hipófise-adrenal (HPA).

A ativação apropriada do eixo hipotálamo-pituitária-adrenal (HPA) é a principal resposta adaptativa aguda ao estresse. A atividade deste eixo é governada pela secreção do fator de liberação da corticotropina (CRF) pelo hipotálamo, o qual, por sua vez, ativa a secreção do hormônio adrenocorticotrópico (ACTH) pela hipófise, que finalmente estimula a secreção de glicocorticóides (corticosterona) pelo córtex adrenal. Os glicocorticóides, por outro lado, podem interagir com seus receptores em múltiplos tecidos-alvo, incluindo o próprio eixo HPA, onde são responsáveis pela retroalimentação negativa da secreção de ACTH pela hipófise e do CRF a partir do hipotálamo (JURUENA; CLEARE; PARIANTE, 2004).

Assim, por um lado, o estresse exerceria influência estimulatória na atividade da triptofano hidroxilase e, portanto, no *turnover* de 5-HT. Dependendo da intensidade do estímulo estressor, este aumento pode ser mediado diretamente pela corticosterona ou pode também envolver outros fatores já mencionados acima, como o CRH e NA, pois o aumento do tônus noradrenérgico na DR em situação de estresse ocorre mesmo em ratos adrenalectomizados (CHAMAS et al., 2004). Nos resultados apresentados, a adrenalectomia não alterou o *turnover* da 5-HT no hipocampo total, o que sugere que a liberação de 5-HT induzida pelo estresse de natação não seria dependente da atuação direta da corticosterona mas do aumento do tônus noradrenérgico já comentado.

Por outro lado, existem muitas evidências de que a 5-HT exerce forte influência na secreção de corticosterona. Investigações imuno-histoquímicas demonstraram a presença de receptores 5-HT_{1A} nos neurônios do núcleo paraventricular do hipotálamo, região envolvida na integração da resposta hormonal (ativação do eixo HPA) e comportamental ao estresse. Outra evidência é a observação de que microinjeções de 8-OH-DPAT neste núcleo hipotalâmico desencadeia a secreção de ACTH através da ativação do receptor 5-HT_{1A} local (OSEI-OWUSU et al., 2005).

Netto e Guimarães (1996), Graeff et al. (1996) e Joca, Ferreira e Guimarães (2007) ressaltam também a participação dos receptores 5-HT_{1A} hipocámpais na atenuação do impacto emocional do estímulo aversivo e na consolidação da memória ao evento estressante. Essa tolerância comportamental e fisiológica ao estímulo estressor poderia ocorrer através da facilitação da expressão de receptores para corticosterona no hipocampo (BALFOUR; RIDLEY, 2000). Estes últimos, ao regularem a própria ativação do eixo HPA, facilitariam a atenuação da hipercortisolemia induzida pelo estresse, parte da resposta de habituação ao estressor (JURUENA; CLEARE; PARIANTE, 2004). Além do 5-HT_{1A}, alguns estudos mostram também que os receptores 5-HT_{2C} parecem ser importantes na mediação dos efeitos da regulação serotoninérgica do eixo HPA (LANFUMEY et al., 2008).

O núcleo paraventricular do hipotálamo também recebe densa inervação catecolaminérgica. Segundo a literatura, a NA regularia a liberação de corticosterona tanto pela estimulação direta dos neurônios CRFérgicos deste núcleo, via α -adrenoceptores, quanto indiretamente, induzindo a liberação de glutamato ou inibindo a liberação de GABA, via ações pré-sinápticas (HERMAN et al., 2002; MORILAK et al., 2005).

Assim, com base no exposto, o aumento de 336% da corticosterona basal detectado nos animais após exposição a natação forçada poderia também estar correlacionado ao aumento de 5-HT e NA observado no hipotálamo dos ratos expostos. Em relação à expressão de GR avaliado por *western blot*, a exposição de 5 minutos à natação forçada (segunda parte do TNF) não produziu alterações significativas no conteúdo de GR na fração nuclear. Assim, apesar da marcante alteração hormonal (hipercortisolemia), nos experimentos realizados, o tempo de 5 minutos de exposição à natação forçada foi insuficiente para promover alterações moleculares, isto é, na expressão e ativação do GR.

Segundo Droste et al. (2008), a administração subcutânea de corticosterona resulta em níveis plasmáticos máximos após 25 minutos, enquanto os níveis máximos no sistema nervoso central (SNC) são alcançados somente após 40 minutos. Estes mesmos autores, utilizando-se da técnica de microdiálise, observaram que 15 minutos de natação forçada promoveram aos 50 minutos um aumento significativo na concentração de corticosterona livre no hipocampo, retornando aos valores basais somente 110 minutos após o início do estímulo estressor. Ainda, em virtude das alterações moleculares serem um fenômeno tardio,

estes dados da literatura fazem acreditar que se a análise da expressão/ativação de GR por *western blot* tivesse sido realizada 30 minutos ou 1 hora após o teste de 5 minutos do protocolo de natação forçada teria sido possível verificar alterações tanto hormonais quanto na expressão do GR.

6.3 Efeitos da nicotina nas alterações neuroquímicas e neuroendócrinas induzidas pela natação forçada

Em relação aos animais tratados com nicotina, quando comparados ao grupo salina, ANOVA mostrou também haver diferenças quanto ao parâmetro escalada no TNF, o que sugere que o efeito da nicotina possua um componente catecolaminérgico. Os dados neuroquímicos mostraram que os animais submetidos ao tratamento subcrônico com nicotina e ao estresse de natação forçada apresentaram diminuição do conteúdo de NA no DR, além de alterações no conteúdo tecidual de 5-HT em regiões como o DR, o HV e o HT.

Como comentando na introdução, a nicotina exerce seus efeitos biológicos no SNC ao ligar-se aos receptores nicotínicos neuronais (nAChRs). Estes receptores são canais iônicos pentaméricos amplamente distribuídos pelo SNC e que pela localização predominantemente pré-sináptica exercem importante papel na modulação da liberação de outros neurotransmissores (PICCIOTTO et al., 2000). A exemplo, o nAChR do subtipo $\alpha_3\beta_2$ está envolvido com a modulação da liberação de NA no núcleo paraventricular do hipotálamo. E, segundo Okada et al. (2008), os neurônios do núcleo tegmental laterodorsal poderiam prover a via aferente colinérgica aos neurônios noradrenérgicos do *locus coeruleus*.

Li et al. (1998), utilizando técnicas de registro do tipo "whole-cell patch" em fatias de encéfalo, também demonstraram que o efeito despolarizante do agonista nicotínico DMPP no núcleo dorsal da rafe foi mimetizado pela fenilefrina (agonista α_1), prolongado com nisoxetina (inibidor da recaptção de NA) e bloqueado com tetradoxina (TTX). Estes dados, em conjunto, sugerem que o efeito despolarizante do agonista nicotínico é decorrente da liberação de NA (e da ativação de receptores α_1 pós-sinápticos) mediada pela ativação do receptor nicotínico pré-sináptico. Ainda, segundo Mihailescu et al. (1998), o efeito despolarizante de agonistas nicotínicos também foi bloqueado com metilcaconitina e DH β E, sugerindo a presença de

nAChRs do subtipo α_7 e $\alpha_4\beta_2$ nos neurônios noradrenérgicos do *locus coeruleus* e serotoninérgicos do núcleo da rafe.

É sabido que os nAChRs passam por processos regulatórios (dessensibilização) quando são submetidos a altas concentrações ou exposição prolongada a agonistas nicotínicos (VENTURA et al., 2010). A dessensibilização destes nAChRs no *locus ceruleus*, em resposta às injeções sequenciais de nicotina (MATTA et al., 1998), poderia ser, desta forma, o fenômeno responsável pela diminuição do tônus noradrenérgico no DR. E a diminuição do conteúdo de 5-HT em regiões terminais, como detectado no HV e no HT, poderia ser uma decorrência da menor ativação do DR pela NA ou da própria dessensibilização de nAChRs também presentes no DR.

Ainda, segundo Matta et al. (1995), apesar das injeções sequenciais de nicotina acarretarem dessensibilização quase completa dos nAChRs envolvidos na secreção do ACTH, a liberação de NA durante a natação forçada foi reduzida somente a 32% do valor original no DR. Estas diferenças de resposta são compatíveis com a heterogeneidade dos subtipos de nAChRs expressos no SNC e envolvidos com a modulação da NA. Então, apesar da dessensibilização de nAChRs no *locus ceruleus* pela nicotina, a liberação residual de NA durante a exposição a natação forçada ainda poderia ser suficiente para estimular o DR, gerando o pequeno aumento do *turnover* da 5-HT detectado nos ratos adrenalectomizados.

Também foi demonstrando que os nAChRs expressos nos neurônios no núcleo paraventricular do hipotálamo estão envolvidos com os efeitos agudos da nicotina na secreção de corticosterona (NEWMAN et al., 2001). Assim, por ser um fenômeno de neuroadaptação a curto prazo, não se poderia descartar a hipótese de que a dessensibilização destes nAChRs também esteja diretamente envolvida com a diminuição da secreção de corticosterona após tratamento subcrônico com nicotina e exposição à natação forçada.

Desta forma, os resultados sugerem que a administração subcrônica de nicotina direta (via dessensibilização dos nAChRs do próprio eixo HPA) ou indiretamente (via modulação da NA-5HT) acarretou a diminuição da liberação de corticosterona. Como consequência, a expressão do GR hipocampal (fração nuclear) foi reduzida em 78% e 24% nos grupos NIC e NIC+TNF, respectivamente.

Por fim, segundo Picciotto et al. (2008), fumar seria uma forma de manter a dessensibilização dos nAChRs e, conseqüentemente, prevenir os efeitos da

abstinência à nicotina. Esta “inativação funcional” inerente aos nAChRs seria responsável pelos efeitos antidepressivos da nicotina, limitando a sinalização da acetilcolina endógena através de nAChRs (hipótese colinérgica da depressão). Estudos clínicos dão suporte a esta idéia de que o bloqueio (e não a ativação de nAChRs) resultaria em efeitos antidepressivos (MIHAILESCU; DRUCKER-COLIN, 2000; RABENSTEIN; CALDARONE; PICCIOTTO, 2006). O surgimento dos sintomas de depressão na abstinência à nicotina poderia, então, ser entendida pela evidência de que o *clearance* da nicotina após a cessação do ato de fumar resultaria em uma maior habilidade da acetilcolina endógena em ativar os nAChRs.

6.4 Efeitos da imipramina nas alterações neuroquímicas e neuroendócrinas induzidas pela natação forçada

A imipramina é um antidepressivo tricíclico não-seletivo, ou seja, capaz de alterar tanto a recaptção da serotonina quanto da noradrenalina. No TNF, quando comparado ao grupo salina, ANOVA mostrou haver diferenças quanto ao parâmetro escalada, o que sugere que o efeito da imipramina possua um componente catecolaminérgico. Segundo Paul et al. (1990), apesar das evidências de que a imipramina inibe tanto a captação de serotonina e quanto da noradrenalina, esta última seria a principal responsável pela resposta comportamental observada no teste da natação forçada. Ainda, os dados neuroquímicos dos experimentos realizados mostraram que o tratamento subcrônico com imipramina reduziu parcialmente o aumento do *turnover* da 5-HT induzido pelo estresse de natação forçada no DR. Ainda, observou-se diminuição importante do conteúdo de NA no HT e no DR.

É sabido que o efeito clínico antidepressivo só é alcançado após tratamentos crônicos. Entretanto, adaptações neuronais induzidas pelos antidepressivos começam a ocorrer desde o início do tratamento. Desta forma, os efeitos neuroquímicos observados no protocolo de natação forçada poderiam estar relacionados às ações farmacológicas agudas da imipramina.

Assim, a redução do *turnover* da 5-HT nos ratos estressados poderia estar relacionada à inibição da recaptção da 5-HT e a ativação dos autorreceptores 5-HT_{1A} no corpo celular e dendritos dos neurônios da rafe. Isto é, a inibição da

recaptação de 5-HT pela imipramina promoveria, agudamente, um aumento da disponibilidade do neurotransmissor na fenda sináptica e, conseqüentemente, maior estimulação dos autorreceptores 5-HT_{1A} no corpo celular e dendritos dos neurônios da rafe (CONNOR et al., 2000; LANFUMEY et al., 2008). Neste caso, em função da hiperestimulação dos autorreceptores pela 5-HT, seria esperada a diminuição na densidade dos receptores 5-HT_{1A} (mecanismo de *down-regulation*). Entretanto, pela técnica de *western blot*, não foi possível detectar esta variação na densidade do receptor serotoninérgico 5-HT_{1A} no hipocampo total após tratamento subcrônico com imipramina e exposição à natação forçada.

A diminuição do conteúdo de NA no HT e DR também poderia estar relacionada a inibição da recaptação da NA e ativação dos autorreceptores adrenérgicos inibitórios α_2 . Segundo Connor et al. (2000), a inibição da recaptação de noradrenalina seria o principal evento subjacente às ações comportamentais da imipramina no teste da natação forçada.

Ainda, o mecanismo subjacente ao efeito antidepressivo da imipramina detectado no protocolo de natação forçada parece não envolver a regulação do eixo HPA, visto que este fármaco não foi capaz de reverter a elevação da corticosterona plasmática em resposta à natação forçada nem alterou significativamente a expressão e ativação do GR hipocampal.

Entretanto, na literatura científica, os dados acerca deste antidepressivo tricíclico são muito contraditórios. A exemplo, Mukherjee, Knisely e Jacobson (2004) sugeriram que a imipramina possuiria atividade agonista glicocorticóide, dada sua habilidade em induzir localização nuclear dos GRs. E ainda, apesar de alguns pesquisadores terem mostrado efeito da imipramina na hipercorticosterolemia induzida pelo estresse de natação forçada, Paul et al. (1990) também não observaram nenhuma alteração da corticosterona plasmática na natação forçada após tratamento subcrônico com imipramina. Estas disparidades podem ser justificadas pelas diferenças metodológicas de protocolos, como o aumento da freqüência de exposição à natação forçada, o que ocasionaria maiores respostas adaptativas da corticosterona. Calil e Marcondes (2006) também mostraram que o aumento na profundidade e temperatura da água (de 20cm/25°C para 38cm/30°C) ocasiona um aumento de 156% na corticosterona plasmática, além de aumentar o tempo de imobilidade, em virtude de tornar a situação muito mais estressante para o animal.

7 Conclusões

Assim, dos resultados obtidos neste trabalho, podemos concluir que:

→ a nicotina é capaz de contrabalancear as alterações neuroquímicas e neuroendócrinas induzidas pelo estresse de natação forçada tanto via modulação do conteúdo de 5-HT e NA em regiões como hipocampo, hipotálamo e rafe, quanto através da modulação direta do eixo HPA;

→ a nicotina e a imipramina induzem respostas adaptativas distintas às alterações neuroquímicas e neuroendócrinas induzidas pelo TNF;

→ os dados podem explicar o uso da nicotina (principalmente na forma de cigarros) para alívio dos sintomas de doenças associadas ao estresse, a exemplo da depressão.

Referências Bibliográficas

- ADELL, A.; CASANOVAS, J.M.; ARTIGAS, F. Comparative study in the rat of the actions of different types of stress on the release of 5-HT in raphe nuclei and forebrain areas. **Neuropharmacology**, v. 36, n. 4/5, p.735-741, 1997.
- AKIL, H. Stressed and depressed. **Nature Medicine**, v. 11, n. 2, p. 116-118, 2005.
- ALBUQUERQUE, E.X. et al. Neuronal nicotinic receptors in synaptic functions in humans and rats: physiological and clinical relevance. **Behav. Brain. Res.**, v. 113, n. 1-2, p. 131-141, 2000.
- ALMEIDA-FILHO, N. et al. Brazilian multicentric study of psychiatric morbidity. Methodological features and prevalence estimates. **Br. J. Psychiatry**, v. 171, p. 524-529, 1997.
- ANDREASEN, J.T. et al. Antidepressant-like effects of nicotinic acetylcholine receptor antagonists, but not agonists, in the mouse forced swim and mouse tail suspension tests. **J. Psychopharmacol.**, v. 23, n. 7, p. 797-804, 2009.
- ANTKIEWICZ-MICHALUK, L. et al. Nicotine potentiates imipramine-induced effects on catecholamine metabolism: possible relation to antidepressant activity. **Pharmacological Reports**, v. 58, p. 836-845, 2006.
- ARMARIO, A. Activation of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis by addictive drugs: different pathways, common outcome. **Trends Pharmacol. Sci.**, v. 31, p. 318-325, 2010.
- BALFOUR, D. J. Influence of nicotine on the release of monoamines in the brain. **Prog. Brain Res.**, v. 79, p. 165-172, 1989.
- BALFOUR, D.J.K.; RIDLEY, D.L. The effects of nicotine on neural pathways implicated in depression: a factor in nicotine addiction ? **Pharmacol. Biochem. Behav.**, v. 66, n. 1, p. 79-85, 2000.
- BALK, E.; LYNSKEY, M.T.; AGRAWAL, A. The association between DSM-IV nicotine dependence and stressful life events in the National Epidemiologic Survey on Alcohol and Related Conditions. **Am J Drug Alcohol Abuse**, v. 35, n. 2, p. 85-90, 2009.
- BARDEN, N. Implication of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis in the pathophysiology of depression. **J. Psychiatry Neurosci.**, v. 29, p. 185-193, 2004.
- BAUER, M. et al. Diretrizes da World Federation of Societies of Biological Psychiatry (WFSBP) para tratamento biológico de transtornos depressivos unipolares, 1ª parte: tratamento agudo e de continuação do transtorno depressivo maior. **Rev. Psiquiatr. Clín.**, v. 36, n. 2, p. 17-57, 2009.

- BERTON, O.; NESTLER, E.J. New approaches to antidepressant drug discovery: beyond monoamines. **Nature Rev.**, v. 7, p. 137-151, 2006.
- BORSINI, F. Role of the serotonergic system in the forced swimming test. **Neurosci. Biobehav. Rev.**, v. 19, n. 3, p. 377-395, 1995.
- BRUNER, C.A.; VARGAS, I. The activity of rats in a swimming situation as a function of water temperature. **Physiol. Behav.**, v. 55, n. 1, p. 21-28, 1994.
- CALIL, C.M. et al. Análise do significado do tempo de imobilidade em modelos experimentais de natação. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 38, n. 4, p. 479-485, 2002.
- CALIL, C.M.; MARCONDES, F.K. The comparison of immobility time in experimental rat swimming models. **Life Sci.**, v. 79, p. 1712-1719, 2006.
- CHALMERS, D.T. et al. Corticosteroids regulate brain hippocampal 5-HT_{1A} receptor mRNA expression. **J. Neurosci.**, v. 13, n. 3, p. 914-923, 1993.
- CHAMAS, F.M. et al. Immobilization stress elevates tryptophan hydroxylase mRNA and protein in the rat raphe nuclei. **Biol. Psych.**, v. 55, p. 278-283, 2004.
- CHANG, M.S. et al. Increased transcription of the tyrosine hydroxylase gene in individual locus coeruleus neurons following footshock stress. **Neuroscience**, v. 101, p. 131-139, 2000.
- CHAOULOFF, F. Serotonin, stress and corticoids. **J. Psychopharmacol.** v. 14, n. 2, p. 139-151, 2000.
- CHILDS, E.; WIT, H. Effects of acute psychosocial stress on cigarette craving and smoking. **Nic. & Tob. Res.**, v. 12, n. 4, p. 449-453, 2010.
- CLEMENT, H.W. et al. Stress-induced changes of extracellular 5-hydroxyindoleacetic acid concentrations followed in the nucleus raphe dorsalis and the frontal cortex of the rat. **Brain Res.**, v. 614, p. 117-124, 1993.
- CONNOR, T.J. et al. Effect of subchronic antidepressant treatments on behavioral, neurochemical and endocrine changes in the forced-swim test. **Pharmacol. Biochem. Behav.**, v. 65, n. 4, p. 591-597, 2000.
- CRUZ, F.C.; DELUCIA, R.; PLANETA, C.S. Differential behavioral and neuroendocrine effects of repeated nicotine in adolescent and adult rats. **Pharmacol. Biochem. Behav.**, v. 80, n. 3, p. 411-417, 2005.

- CRUZ, F.C.; DELUCIA, R.; PLANETA, C.S. Effects of chronic stress on nicotine-induced locomotor activity and corticosterone release in adult and adolescent rats. **Addict. Biol.**, v. 13, n. 1, p. 63-69, 2008.
- CRYAN, J.F.; MARKOU, A.; LUCKI, I. assessing antidepressant activity in rodents: recent developments and future needs. **TRENDS Pharmacol. Sci.**, v. 23, n. 5, p. 238-245, 2002.
- CURTIS, A.L. et al. Activation of the locus coeruleus noradrenergic system by intracoeular microinfusion of corticotropin-releasing factor: effects on discharge rate, cortical norepinephrine levels and cortical electroencephalographic activity. **J. Pharmacol. Exp. Ther.**, v. 281, p. 163– 172, 1997.
- DAGHER, A. et al. An acute psychosocial stress enhances the neural response to smoking cues. **Brain Res.**, v. 1293, p. 40-48, 2009.
- DE KLOET, E.R.; JOELS, M.; HOLSHOER, F. Stress and the brain: from adaptation to disease. **Nature Rev. Neurosci.**, v. 6, p. 463-475, 2005.
- DROSTE, S.K. et al. Corticosterone levels in the brain show a distinct ultradian rhythm but a delayed response to forced swim stress. **Endocrinology**, v. 149, p. 3244–3253, 2008.
- DUMAN, R.S.; MALBERG, J.; NAKAGAWA, S.; D´SA, C. Neuronal plasticity and survival in mood disorders. **Biol. Psychiatry**, v. 48, p. 732-739, 2000.
- DUMAN, R.S.; MONTEGGIA, L.M. A neurotrophic model for stress-related mood disorders. **Biol. Psychiatry**, v. 59, n. 12, p. 1116-1127, 2006.
- EISCH, A.J. et al. Brain-derived neurotrophic factor in the ventral midbrain-nucleus accumbens pathway: a role in depression. **Biol. Psychiatry**, v. 54, p. 994-1005, 2003.
- ELHWUEGI, A.S. Central monoamines and their role in major depression. *Prog. Neuro-Psychopharmacol.* **Biol. Psychiatry**, v. 28, p. 435-451, 2004.
- FERGUSON, S.M. et al. Antidepressant-like effects of the subtype-selective nicotinic acetylcholine receptors agonist, SIB-1508Y, in the learned helplessness rat model of depression. **Psychopharmacology**, v. 152, p. 295-303, 2000.
- GRAEFF, F.G. et al. Role of 5-HT in stress, anxiety and depression. **Pharmacol. Biochem. Behav.**, v. 54, p. 129-141, 1996.
- GREENWOOD, B.N. et al. Freewheel running prevents learned helplessness/behavioral depression: role of dorsal raphe serotonergic neurons. **J. Neurosci.**, v. 23, p. 2889-2898, 2003.

- GUIMARÃES, F.S. et al. Hippocampal 5-HT receptors and consolidations of stressful memories. **Behav. Brain Res.**, v. 58, p. 133-139, 1993.
- HERMAN, J.P. et al. Role of the paraventricular nucleus microenvironment in stress integration. **European J. Neurosci.**, v. 16, p. 381-385, 2002.
- HEITZER, M.D. et al. Glucocorticoid receptor physiology. **Rev. Endocr. Metab. Disord.**, v. 8, p. 321-330, 2007.
- HILL, J.A.; ZOLI, M.; BOUGEOIS, J.P.; CHANGEAUX, J.P. Immunocytochemical localization of a neuronal nicotinic receptor: the beta-2 subunit. **J. Neurosci.**, v. 13, p. 1551-1568, 1993.
- INOUE, T.; TSUCHIYA, K.; KOYAMA, T. Regional changes in dopamine and serotonin activation with various intensity of physical and psychological stress in the rat brain. **Pharmacol. Biochem. Behav.**, v. 49, p. 911-920, 1994.
- INSTITUTO NACIONAL DO CÂNCER (INCA) – O controle do tabagismo no Brasil. Disponível em: www.inca.gov.br/prevencao/tabagismo/control_e_br.html. Acesso em: 02 jul. 2010.
- JENSEN, A.A. et al. Neuronal nicotinic acetylcholine receptors: structural revelations, target identifications and therapeutics inspirations. **J. Med. Chem.**, v. 48, n. 15, p. 4705-4745, 2005.
- JOCA, S.R.L.; FERREIRA, F.R.; GUIMARÃES, F.S. Modulation of stress consequences by hippocampal monoaminergic, glutamatergic and nitrenergic neurotransmitter systems. **Stress**, v. 10, n. 3, p. 227-249, 2007.
- JOËLS, M.; BARRAM, T.Z. The neuro-symphony of stress. **Nature Rev.**, v. 10, p. 459-466, 2009.
- JURUENA, M.F.; CLEARE, A.J.; PARIANTE, C.M. O eixo hipotálamo-pituitária-adrenal, a função dos receptores de glicocorticóides e sua importância na depressão. **Rev. Bras. Psiquiatr.**, v. 26, n. 3, p. 189-201, 2004.
- KABBA, M.J. et al. Opposite effects on hippocampal corticosteroid receptors induced by stimulation of β and $\alpha 1$ noradrenergic receptors. **Neuroscience**, v. 66, n. 3, p. 539-545, 1995.
- KIRBY, L.G. et al. The effects of different stressors on extracellular 5-hydroxytryptamine and 5-hydroxyindoleacetic acid. **Brain Research**, v. 760, p. 218-230, 1997.

- KOOB, G.F.; LE MOAL, M. Drug abuse: hedonic homeostatic dysregulation. **Science**, v. 278, n. 5335, p. 52-58, 1997.
- KOZLOWSKI, L.T. et al. Comparing tobacco cigarette dependence with other drug dependencies. Greater or equal 'difficulty quitting' and 'urges to use', but less 'pleasure' from cigarettes. **JAMA**, v. 261, p. 898–901, 1989.
- KRISHNAN, V. et al. Molecular adaptations underlying susceptibility and resistance to social defeat in brain reward regions. **Cell**, v. 131, p. 391-404, 2007.
- KRISHNAN, V.; NESTLER, E.J. The molecular neurobiology of depression. **Nature**, v. 455, p. 894-902, 2008.
- LANFUMEY, L. et al. Corticosteroid-serotonin interactions in the neurobiological mechanisms of stress-related disorders. **Neurosci. Biobehav. Rev.**, v. 32, p. 1174-1184, 2008.
- Li, X. et al. Presynaptic nicotinic receptors facilitate monoaminergic transmission. **J. Neurosci.**, v. 18, n. 5, p. 1904-1912, 1998.
- LIPP, M.E.N. Estresse emocional: a contribuição de estressores internos e externos. **Rev. Psiq. Clín.**, v. 28, n. 6, p. 347-349, 2001.
- 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.
- MANJI, H.K.; DREVETS, W.C.; CHARNEY, D.S. The cellular neurobiology of depression. **Nature Med.**, v. 7, n. 5, p. 541-547, 2001.
- MANNUCCI, C. et al. Long-term effects of nicotine on the forced swimming test in mice: an experimental model for the study of depression caused by smoke. **Neurochem. Int.**, v. 49, p. 481-486, 2006.
- MATTA, S.G. et al. Response of the hypothalamo-pituitary-adrenal axis to nicotine. **Psychoneuroendocrinology**, v. 23, n. 2, p. 103-113, 1998.
- MATTA, S.G. et al. Nicotinic agonists administered into the fourth ventricle stimulate norepinephrine secretion in the hypothalamic paraventricular nucleus: an in vivo microdialysis study. **Neuroendocrinology**, v. 61, p. 383-392, 1995.
- MAYER, J.L. et al. Brief treatment with the glucocorticoid receptor antagonist mifepristone normalises the corticosterone-induced reduction of adult hippocampal neurogenesis. **J. Neuroendocrinol.**, v. 18, n. 8, p. 629-631, 2006.

- MCGEHEE, DS. Molecular diversity of neuronal nicotinic acetylcholine receptors. **Ann. NY Acad. Sci.**, v. 868, p. 565-577, 1999.
- MEIJER, O.C. et al. Regulation of hippocampal 5-HT_{1A} receptor mRNA and binding in transgenic mice with a targeted disruption of the glucocorticoid receptor. **Brain Res. Mol. Brain Res.**, v. 46, p. 290-296, 1997.
- MIHAILESCU, S. et al. Effects of nicotine and mecamylamine on rat dorsal raphe neurons. **Eur. J. Pharmacol.**, v. 360, p. 31-36, 1998.
- MIHAILESCU, S.; DRUCKER-COLIN, R. Nicotine, brain nicotine receptors and neuropsychiatric disorders. **Arch. Med. Res.**, v. 31, p. 131-144, 2000.
- MORILAK, D.A. et al. Role of brain norepinephrine in the behavioral response to stress. *Prog. Neuropsychopharmacol. Biol. Psychiatry*, v. 29, n. 8, p. 1214-24, 2005.
- MUKHERJEE, K.; KNISELY, A.; JACOBSON, L. Partial glucocorticoid agonist-like effects of imipramine on hypothalamic-pituitary-adrenocortical activity, thymus weight, and hippocampal glucocorticoid receptors in male C57BL/6 mice. **Endocrinology**, v. 145, n. 9, p. 4185-91, 2004.
- NETTO, S.M.; GUIMARÃES, F.S. Role of hippocampal 5-HT_{1A} receptors on elevated plus maze exploration after a single restraint experience. **Behav. Brain Res.**, v. 77, p. 215-218, 1996.
- NEWMAN, M.B. et al. Nicotine's oxidative and antioxidant properties in CNS. **Life Sci.**, v. 71, p. 2807-2820, 2001.
- NISHI, K.; KANEMARU, K.; DIKSIC, M. A genetic rat model of depression, Flinders sensitive line, has a lower density of 5-HT(1A) receptors, but a higher density of 5-HT(1B) receptors, compared to control rats. **Neurochem. Int.**, v. 54, n. 5-6, p. 299:307, 2009.
- O'BRIEN, CP. Drug addiction and abuse. In: Hardman, JG; Limbird, LE (eds). Goodman and Gilman's **The Pharmacological Basis of Therapeutics**, 10th, Ed. Pregamon, New York, 621-642, 2001.
- O'LEARY, O.F. et al. The role of noradrenergic tone in the dorsal raphe nucleus of the mouse in the acute behavioral effects of antidepressant drugs. **Europ. Neuropsychopharmacol.**, v. 17, p. 215-226, 2007.

- OSEI-OWUSU, P. et al. 5-hydroxytryptamine 1A receptors in the paraventricular nucleus of the hypothalamus mediate oxytocin and adrenocorticotropin hormone release and some behavioral components of the serotonin syndrome. **J. Pharmacol. Exp. Ther.**, v. 313, p. 1324-1330, 2005.
- PATERSON, N.E.; BALFOUR, D.J.; MARKOU, A. Chronic bupropion attenuated the anhedonic component of nicotine withdrawal in rats via inhibition of dopamine reuptake in the nucleus accumbens shell. **European. J. Neurosci.**, v. 25, p. 3099-3108, 2007.
- PAUL, I.A. et al. Neural adaptation in imipramine-treated rats processed in forced swim test: assessment of time course, handling, rat strain and amine uptake. **J. Pharmacol. Exp. Ther.**, v. 252, n. 3, p. 997-1005, 1990.
- PAXINOS, G; WATSON, C. **The rat brain in stereotaxic coordinates**. Sixth Edition. Boston: Academic Press Inc, 2007.
- PICCIOTTO, M.R. et al. Nicotinic receptors in the brain: links between molecular biology and behavior. **Neuropsychopharmacology**, v. 22, n. 5, p. 451-465, 2000.
- PICCIOTTO, M.R. et al. It is not "either/or": activation and desensitization of nicotinic acetylcholine receptors both contribute to behaviors related to nicotine addiction and mood. **Progress Neurobiol.**, v. 84, p. 329-342, 2008.
- PIERUCCI, M. et al. The unilateral nigral lesion induces dramatic bilateral modification on rat brain monoamine neurochemistry. **Ann. NY Acad. Sci.**, v. 1155, p. 316-323, 2009.
- PIRNIK, Z. et al. Hypertonic saline and immobilization induce Fos expression in mouse brain catecholaminergic cell groups: colocalization with tyrosine hydroxylase and neuropeptide Y. **Ann. NY Acad. Sci.**, v. 1018, p. 398-404, 2004.
- PORSOLT, R.D.; LE PICHON, M.; JALFRE, M. Depression: a new animal model sensitive to antidepressant treatments. **Nature**, v. 266, p. 730-732, 1977.
- PRICE, M.L. et al. Evidence for corticotropin-releasing factor regulation of serotonin in the lateral septum during acute swim stress: adaptation produced by repeated swimming. **Psychopharmacology**, v. 162, p. 406-414, 2002.
- RABENSTEIN, R.L.; CALDARONE, B.J.; PICCIOTTO, M.R. The nicotinic antagonist mecamylamine has antidepressant-like effects in wild type but not $\beta 2$ or $\alpha 7$ nicotinic acetylcholine receptor knockout mice. **Psychopharmacol.**, v. 189, p. 395-401, 2006.
- RACCA, S. et al. Effects of swim stress and alpha-MSH acute pre-treatment on brain 5-HT transporter and corticosterone receptor. **Pharmacol. Biochem. Behav.**, v. 81, n. 4, p. 894-900, 2005.

- ROCHE, M. et al. Circuitry underlying regulation of the serotonergic system by swim stress. **J. Neurosci.**, v. 23, n. 3, p. 970-977, 2003.
- SALIN-PASCUAL, R.J.; DRUCKER-COLIN, R. A novel effect of nicotine on mood and sleep in major depression. **NeuroReport**, v. 9, p. 57-60, 1998.
- SARNYAI, Z. et al. The cocaine-induced elevation of plasma corticosterone is mediated by endogenous corticotropin-releasing factor (CRF) in rats. **Brain Res.**, v. 589, n. 1, p. 154-6, 1992.
- SCHAPIRA, M.; ABAGYAN, R.; TOTROV, M. Structural model of nicotinic acetylcholine receptor isotypes bound to acetylcholine and nicotine. **BMC Struct. Biol.**, v. 2, n. 1, p. 47-53, 2002.
- SÉMONT, A. et al. Regulation of central corticosteroid receptors following short-term activation of serotonin transmission by 5-hydroxy-L-tryptophan or fluoxetine. **J. Neuroendocrinology**, v. 12, p. 736-744, 2000.
- SELYE, H. A syndrome produced by diverse noxious agents. **Nature**, v. 138, p. 32, 1936.
- SETH, P. et al. Nicotinic-serotonergic interactions in brain and behaviour. **Pharmacol. Biochem. Behav.**, v. 71, p. 795-805, 2002.
- SHARMA, G.; VIJAYARAGHAVAN, S. Nicotinic receptors: role in addiction and other disorders of the brain. **Subst. Abuse**, v. 11, n. 1, p. 81-85, 2008.
- SHUMAKE, J.; EDWARDS, E.; GONZALEZ-LIMA, F. Dissociation of septo-hippocampal metabolism in the congenitally helpless rat. **Neuroscience**, v. 114, n. 2, p. 373-377, 2002.
- SINGH, V.B. et al. Increases in the activity of tryptophan hydroxylase from rat cortex and midbrain in response to acute or repeated sound stress are blocked by adrenalectomy and restored by dexamethasone treatment. **Brain Res.**, v. 516, p. 66-76, 1990.
- SLATTERY, D.A.; HUDSON, A.L.; NUTT, D.J. Invited review: the evolution of antidepressant mechanisms. **Fund. Clin. Pharmacol.**, v. 18, p. 1-21, 2004.
- SPENCER, R.L. et al. Discrimination between changes in glucocorticoid receptor expression and activation in rat brain using western blot analysis. **Brain Res.**, v. 868, p. 275-286, 2000.

- SPIGA, F.; LIGHTMAN, S.L. Dose-dependent effects of corticosterone on nuclear glucocorticoid receptors and their binding to DNA in the brain and pituitary of the rat. **Brain Res.**, v. 13, n. 1293, p. 101-107, 2009.
- STOLERMAN, J.P.; JARVIS, M.J. The scientific case that nicotine is addictive. **Psychopharmacology**, v. 117, p. 2-10, 1995.
- SUMMERS, C.H. et al. Monoaminergic activity in subregions of raphé nuclei elicited by prior stress and the neuropeptide corticotrophin-releasing factor. **J. Neuroendocrinology**, v. 15, p. 1122-1133, 2003.
- TIZABI, Y. et al. Antidepressant effects of nicotine in an animal model of depression. **Psychopharmacology**, v. 142, p. 193-199, 1999.
- TIZABI, Y. et al. Depressive characteristics of FSL rats: involvement of central nicotinic receptors. **Pharmacol. Biochem. Behav.**, v. 66, p. 73-77, 2000.
- VÁZQUEZ-PALACIOS, G.; BONILLA-JAIME, H.; VELÁZQUES-MOCTEZUMA, J. Antidepressant like effects of the acute and chronic administration of nicotine in the rat forced swimming test and its interaction with fluoxetine. **Pharmacol. Biochem. Behav.**, v. 78, p. 165-169, 2004.
- VENTURA, A.L.M. et al. Sistema colinérgico: revisitando receptores, regulação e a relação com a doença de Alzheimer, esquizofrenia, epilepsia e tabagismo. **Rev. Psiquiatr. Clin.**, v. 37, n. 2, p. 66-72, 2010.
- YALCIN, I. et al. Effects of 5,7-dihydroxytryptamine lesion of the dorsal raphe nucleus on the antidepressant-like action of tramadol in the unpredictable chronic mild stress in mice. **Psychopharmacology**, v. 200, p. 497-507, 2008.
- ZANARDI, A.; LEO, G.; BIAGINI, G.; ZOLI, M. Nicotine and neurodegeneration in ageing. **Toxicol. Lett.**, v. 127, p. 207-215, 2002.
- ZAREI, M.M. et al. Distributions of nicotinic acetylcholine receptor $\alpha 7$ e $\beta 2$ subunits on cultured hippocampal neurons. **Neuroscience**, v. 88, n. 3, p. 755-764, 1999.
- ZIEGLER, D.R.; CASS, W.A.; HERMAN, J.P. Excitatory influence of the locus coeruleus in hypothalamic-pituitary-adrenocortical axis responses to stress. **J. Neuroendocrinol.**, v. 11, p. 361-369, 1999.