

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
DEPARTAMENTO DE FARMACOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FARMACOLOGIA**

**MODULAÇÃO DO COMPORTAMENTO DE RATOS
SUBMETIDOS AO TESTE DO NADO FORÇADO PELO
RECEPTOR VANILÓIDE DE POTENCIAL TRANSITÓRIO TIPO
1 DO HIPOCAMPO**

ANA CAROLINA VANVOSSSEN

Florianópolis
2012

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
DEPARTAMENTO DE FARMACOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FARMACOLOGIA**

**MODULAÇÃO DO COMPORTAMENTO DE RATOS
SUBMETIDOS AO TESTE DO NADO FORÇADO PELO
RECEPTOR VANILÓIDE DE POTENCIAL TRANSITÓRIO
TIPO 1 DO HIPOCAMPO**

ANA CAROLINA VANVOSSSEN

Dissertação apresentada ao curso de Pós-Graduação em Farmacologia da Universidade Federal de Santa Catarina, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Farmacologia.

Co-orientadora: Profa. Dra. Cilene Lino-de-Oliveira

Orientador: Prof. Dr. Leandro José Bertoglio

Florianópolis
2012

Catálogo na fonte pela Biblioteca Universitária
da
Universidade Federal de Santa Catarina

V284m Vanvossen, Ana Carolina

Modulação do comportamento de ratos submetidos ao teste de nado forçado pelo receptor vanilóide de potencial transitório tipo 1 do hipocampo [dissertação] / Ana Carolina Vanvossen ; orientador, Leandro José Bertoglio. - Florianópolis, SC, 2012.

99 p.: il., gráf., tabs.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Santa Catarina, Centro de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Farmacologia.

Inclui referências

1. Farmacologia. 2. Hipocampo (Cérebro). 3. Stress (Psicologia). 4. Depressão. I. Bertoglio, Leandro José. II. Universidade Federal de Santa Catarina. Programa de Pós-Graduação em Farmacologia. III. Título.

CDU 615

AGRADECIMENTOS

Ao professor Leandro José Bertoglio, pela oportunidade de trabalhar em seu laboratório, de realizar este trabalho sob sua dedicada orientação e pela amizade durante nosso convívio.

À professora Cilene Lino-de-Oliveira, por todos os ensinamentos, discussões, e por sua valiosa contribuição para o desenvolvimento deste trabalho.

Aos professores: Sâmia Joca, Reinaldo Takahashi e Thereza Lima, pela contribuição para o aprimoramento deste trabalho.

Aos demais professores do Programa de Pós-Graduação em Farmacologia, que contribuíram para a minha formação científica.

Aos colegas do laboratório, Cris, Lucas, Rafael e Vagner, pelo auxílio na realização dos experimentos e pela amizade durante estes anos.

À Ana Paula e à Evelyn, pelo auxílio e adorável convivência, que fez delas mais do que grandes amigas.

À Maíra, pelas dicas e valiosa ajuda no preparo das drogas, pela amizade, risadas e adorável convivência.

Aos demais colegas do departamento, em especial aos da turma de mestrado de 2010, pela amizade e auxílio em todas as horas.

À Martina, pelas importantes dicas para os ensaios de imunohistoquímica.

Aos meus amados pais, Nazaré e Rudy, e ao meu querido irmão Rafa, pelo apoio incondicional, carinho e cuidado em todas as horas.

Ao meu amado, Paulo, pelo apoio, ajuda e companheirismo.

À Bia, por sua presença constante, mesmo à distância.

À todos que, de alguma maneira, contribuíram para a realização deste trabalho.

Ao CNPq pelo apoio financeiro.

E acima de tudo, a Deus, pelas oportunidades e vitórias conquistadas.

*“A alegria que se tem em pensar e aprender faz-nos pensar e aprender
ainda mais” (Aristóteles)*

RESUMO

A depressão é um sério transtorno do humor que acomete grande parte da sociedade atual. O hipocampo é uma das regiões cerebrais que tem sido extensivamente estudada no contexto da depressão e dos transtornos do humor. Sabe-se que os receptores vanilóides de potencial transitório do tipo 1 (TRPV1) estão presentes em diversas regiões cerebrais, incluindo o hipocampo, no entanto, seu possível envolvimento neste processo afetivo ainda não foi investigado. O teste do nado forçado é bastante utilizado para avaliação da atividade antidepressiva de drogas, e se baseia na avaliação dos comportamentos ativos e passivos de ratos quando expostos a este teste. Para testar a hipótese de que os TRPV1 hipocámpais influenciam a inibição comportamental, que é uma característica de respostas comportamentais do estresse, o presente trabalho investigou como o bloqueio farmacológico destes canais modificaria o comportamento dos ratos submetidos ao teste do nado forçado. Primeiramente, a expressão destes canais nas camadas CA1-CA3 e giro denteado do hipocampo foi confirmada por um método imuno-histoquímico. Os resultados seguintes mostraram que o bloqueio dos TRPV1 tanto na porção dorsal quanto na porção ventral do hipocampo, quando feito de maneira mais seletiva, aumentou o comportamento de imobilidade observado no teste, potencializando os efeitos prejudiciais de um estresse agudo. Após esta etapa, investigamos se a inativação destas sub-regiões poderia interferir nestes comportamentos. No entanto, não se observou diferenças nos comportamentos avaliados. Desta forma, o presente estudo sugere que o bloqueio dos TRPV1 hipocámpais, mas não a inativação das sub-regiões, potencializou o comportamento de imobilidade de ratos avaliados no teste do nado forçado, um parâmetro comportamental relacionado com a resposta de um estresse agudo e possivelmente também com a depressão.

Palavras-chave: TRPV1, hipocampo dorsal, hipocampo ventral, estresse, depressão, teste do nado forçado.

ABSTRACT

Depression is a serious mood disorder that affects the society today. The hippocampus is a brain region that has been extensively studied in the context of depression and mood disorders. It is known that the transient receptor potential vanilloid type 1 (TRPV1) is present in several brain regions including the hippocampus, however, a possible involvement in this emotional process has not been investigated yet. The forced swimming test is widely used to evaluate the antidepressant activity of drugs, and is based on the evaluation of passive and active behaviors of rats when exposed to this test. To test the hypothesis that hippocampal TRPV1 influences the behavioral inhibition, which is a characteristic of behavioral responses to stress, this study investigated how the pharmacological blockade of these channels would alter the behavior of rats submitted to forced swimming test. First, the expression of these channels in the CA1-CA3 layers and dentate gyrus of the hippocampus was confirmed by an immunohistochemistry method. The following results showed that blocking TRPV1 in both the dorsal and ventral hippocampus, when done with a more selective drug, increased the immobility behavior observed in this test, increasing the harmful effects of an acute stress. After this step, we investigated whether the inactivation of these sub-regions could interfere with these behaviors. However, no differences were observed in the behaviors assessed. Thus, this study suggests that blocking hippocampal TRPV1, but not the inactivation of the sub-regions, potentiated the immobility behavior assessed in the forced swimming test, related to an acute stress response and possibly also with depression.

Keywords: TRPV1, dorsal hippocampus, ventral hippocampus, stress, depression, forced swimming test.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. O eixo HPA e sua modulação funcional	24
Figura 2. Regiões cerebrais que apresentam anormalidades estruturais e funcionais em pacientes depressivos	25
Figura 3. Diagrama hipocampal de rato	29
Figura 4. Estrutura do TRPV1 presente na membrana celular e seus alvos de ativação	33
Figura 5. Estrutura química dos principais ligantes endógenos dos receptores vanilídeos de potencial transitório tipo 1	34
Figura 6. Diagramas de cortes coronais do cérebro de ratos e fotomicrografias do sítio de injeção	44
Figura 7. Expressão de canais TRPV1 no hipocampo	48
Figura 8. Esquema do protocolo utilizado para a avaliação dos grupos tratados com as soluções de veículo ou droga	49
Figura 9. Efeitos da infusão bilateral de capsazepina nas doses de 1,0 ou 3,0 nmol injetadas no hipocampo dorsal ou no hipocampo ventral de ratos submetidos ao teste do nado forçado.	51
Figura 10. Análise minuto-a-minuto dos comportamentos de imobilidade e nado na sessão de teste dos grupos tratados com a maior dose de capsazepina (3,0 nmol) no hipocampo dorsal ou no hipocampo ventral.....	53
Figura 11. Análise minuto-a-minuto dos comportamentos de escalada e mergulho na sessão de teste dos grupos tratados com a maior dose de capsazepina (3,0 nmol) no hipocampo dorsal ou no hipocampo ventral.....	55
Figura 12. Frequência de escalada de animais que receberam capsazepina nas doses de 1,0 ou 3,0 nmol, injetadas no hipocampo dorsal ou no hipocampo ventral.	56

Figura 13. Efeitos da infusão bilateral de SB-366791 nas doses de 0,1, 1,0 e 3,0 nmol injetadas no hipocampo dorsal ou no hipocampo ventral de ratos submetidos ao teste do nado forçado.....	58
Figura 14. Análise minuto-a-minuto dos comportamentos de imobilidade e nado na sessão de teste dos grupos tratados com a dose efetiva de SB-366791.....	60
Figura 15. Análise minuto-a-minuto dos comportamentos de escalada e mergulho na sessão de teste dos grupos tratados com a dose efetiva de SB-366791.....	62
Figura 16. Frequência de escalada de animais que receberam SB-366791 nas doses de 0,1, 1,0 e 3,0 nmol injetadas no hipocampo dorsal ou no hipocampo ventral.....	63
Figura 17. Efeitos da infusão bilateral de muscimol nas doses de 4,0 e 8,0 nmol injetadas no hipocampo dorsal ou no hipocampo ventral de ratos submetidos ao teste do nado forçado.....	65
Figura 18. Análise minuto-a-minuto dos comportamentos de imobilidade e nado na sessão de teste do grupo que recebeu a maior dose de muscimol.....	67
Figura 19. Análise minuto-a-minuto dos comportamentos de escalada e mergulho na sessão de teste do grupo que recebeu a maior dose de muscimol.....	68
Figura 20. Resultados da frequência de escalada de animais que receberam muscimol nas doses de 4,0 e 8,0 nmol, injetadas no hipocampo dorsal ou no hipocampo ventral	69

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Duração dos comportamentos de escalada e mergulho mensurados na sessão de teste de grupos que receberam capsazepina ou veículo no hipocampo dorsal ou no hipocampo ventral 52

Tabela 2. Duração dos comportamentos de escalada e mergulho mensurados na sessão de teste de grupos que receberam SB-366791 ou veículo no hipocampo dorsal ou no hipocampo ventral 59

Tabela 3. Duração dos comportamentos de escalada e mergulho mensurados na sessão de teste de grupos que receberam muscimol ou veículo no hipocampo dorsal ou no hipocampo ventral 66

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ACTH	- Do inglês <i>adrenocorticotrophic hormone</i> , ou hormônio adrenocorticotrófico
ANOVA	- Análise de variância
BDNF	- Do inglês <i>brain derived neurotrophic fator</i> , ou fator neurotrófico derivado do cérebro
CB1	- Receptores canabinóides do tipo 1
CPZ	- Capsazepina
CRF	- Do inglês <i>corticotrophin releasing factor</i> , ou fator liberador de corticotrofina
DMSO	- Dimetilsulfóxido
HD	- Hipocampo dorsal
HPA	- Hipotálamo-pituitária-adrenal
HV	- Hipocampo ventral
i.p.	- intraperitoneal
IRN	- Inibidores da recaptação de noradrenalina
IRS	- Inibidores da recaptação de serotonina
LTD	- Do inglês <i>long-term depression</i> , ou depressão de longa duração
LTP	- Do inglês <i>long-term potentiation</i> , ou potencial de longa duração
NMDA	- Ácido N-metil-D-aspartato
PAG	- Do inglês <i>periaqueductal gray matter</i> , ou matéria cinzenta periaquedutal
PBS	- Do inglês <i>phosphate buffered saline</i> , ou tampão fosfato-salina
PVN	- Núcleo paraventricular do hipotálamo
RTX	- Resiniferatoxina
SB	- SB-366791
SNC	- Sistema Nervoso Central
TRPV1	- Do inglês <i>Transient receptor potential vanilloid type 1</i> , ou receptores vanilóides de potencial transitório do tipo 1

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	23
1.1 Depressão	23
1.2 O teste do nado forçado como ferramenta para o estudo de processos relacionados ao estresse e depressão	26
1.3 Hipocampo.....	28
1.3.1 <i>Conectividade anatômica e modulação de processos relacionados com cognição pelo hipocampo dorsal (HD)</i>	<i>30</i>
1.3.2 <i>Conectividade anatômica e modulação de processos relacionados com emoção pelo hipocampo ventral (HV)</i>	<i>30</i>
1.3.3 <i>Hipocampo e depressão.....</i>	<i>31</i>
1.4 Receptores vanilóides de potencial transitório do tipo 1	32
2 OBJETIVOS	37
2.1 Objetivo geral	37
2.2 Objetivos específicos.....	37
3 METODOLOGIA	39
3.1 Considerações éticas	39
3.2 Animais	39
3.3 Imunohistoquímica.....	39
3.4 Drogas	40
3.5 Cirurgia estereotáxica e microinjeção hipocampal	41
3.6 Teste Comportamental.....	42
3.6.1 <i>Teste do Nado Forçado.....</i>	<i>42</i>

3.7	Análise comportamental.....	43
3.8	Análise histológica dos sítios de injeção	43
3.9	Análise estatística.....	45
4	RESULTADOS.....	47
4.1	Experimento 1. Análise imunohistoquímica qualitativa de canais TRPV1 no HD e no HV.....	47
4.1.1	<i>Expressão de canais TRPV1 no HD e no HV.</i>	<i>47</i>
4.2	Experimento 2: Efeito do bloqueio de canais TRPV1 pelo antagonista capsazepina (CPZ) no HD ou no HV de ratos expostos ao teste do nado forçado.....	49
4.2.1	<i>Bloqueio de canais TRPV1 por meio da infusão de capsazepina no HD ou no HV.</i>	<i>49</i>
4.2.2	<i>Análise minuto a minuto dos grupos que receberam veículo ou a maior dose de capsazepina no HD ou no HV</i>	<i>52</i>
4.2.3	<i>Avaliação da frequência de escalada.....</i>	<i>56</i>
4.3	Experimento 3. Efeito do bloqueio de canais TRPV1 pelo antagonista seletivo SB-366791 (SB) no HD ou no HV de ratos expostos ao teste do nado forçado	56
4.3.1	<i>Bloqueio de canais TRPV1 por meio da infusão de SB-366791 no HD ou no HV.....</i>	<i>57</i>
4.3.2	<i>Análise minuto a minuto dos grupos que receberam veículo ou a dose efetiva de SB-366791 no HD ou no HV</i>	<i>59</i>
4.3.3	<i>Avaliação da frequência de escalada.....</i>	<i>63</i>
4.4	Experimento 4. Efeito da inativação do HD ou no HV em animais expostos ao teste do nado forçado.....	63
4.4.1	<i>Inativação temporária do HD ou do HV por meio da infusão de muscimol.....</i>	<i>64</i>

4.4.2 <i>Análise minuto a minuto dos grupos que receberam veículo ou a maior dose de muscimol no HD ou no HV.....</i>	66
4.4.3 <i>Avaliação da frequência de escalada</i>	68
5 DISCUSSÃO	71
6 CONCLUSÃO.....	81
7 REFERÊNCIAS.....	83
8 ANEXO A – Coloração de Giemsa modificada.....	99

1 INTRODUÇÃO

1.1 Depressão

A depressão é um sério transtorno do humor que acomete uma grande parte da população ao longo do mundo, sendo uma das principais causas de morbidade e mortalidade na atualidade (WHO, 2012). É caracterizada por diversos sintomas, que incluem anedonia, distúrbios do sono e apetite, cansaço, falta de atenção, pensamentos suicidas, entre outros. Geralmente, o diagnóstico para este transtorno requer a ocorrência do humor deprimido associado com ao menos quatro dos sintomas acima citados, e estes sintomas devem permanecer por mais de duas semanas para que o diagnóstico seja confirmado (NESTLER et al., 2002a; KRISHNAN; NESTLER, 2008; SOLEIMANI; LAPIDUS; IOSIFESCU, 2011).

O desenvolvimento da patologia depressão parece envolver, além de fatores genéticos – que contam com 50% de influência – também os fatores ambientais, principalmente o estresse (NESTLER et al., 2002a). De fato, a atividade do eixo hipotálamo-pituitária-adrenal (HPA) geralmente está comprometida na depressão: evidências clínicas e laboratoriais demonstram que os transtornos afetivos estão associados com a hiperatividade do eixo HPA (VAN PRAAG, 2004; NEMEROFF; VALE, 2005; PARIANTE; LIGHTMAN, 2008). Após a ocorrência de uma situação estressante, ocorre a liberação do fator liberador de corticotrofina (CRF), pelo núcleo paraventricular (PVN) do hipotálamo. Na pituitária, a estimulação causada pelo CRF resulta na liberação do hormônio adrenocorticotrófico (ACTH), que estimula a porção cortical da glândula adrenal para produzir cortisol em humanos e corticosterona em roedores, e a porção medular para produzir adrenalina (HERMAN et al., 2005; PARIANTE; LIGHTMAN, 2008). Neste contexto, o hipocampo é um alvo importante do cortisol, uma vez que a ativação de receptores glicocorticóides presentes nesta região é crucial para a regulação do eixo HPA, regulando as concentrações sanguíneas de cortisol por retroalimentação negativa (AAN HET ROT; MATHEW; CHARNEY, 2009; fig. 1). Além do hipocampo, o córtex pré-frontal também exerce um efeito inibitório no eixo HPA, enquanto a amígdala causa uma estimulação do eixo HPA (HERMAN; CULLINAN, 1997; HERMAN et al., 2005).

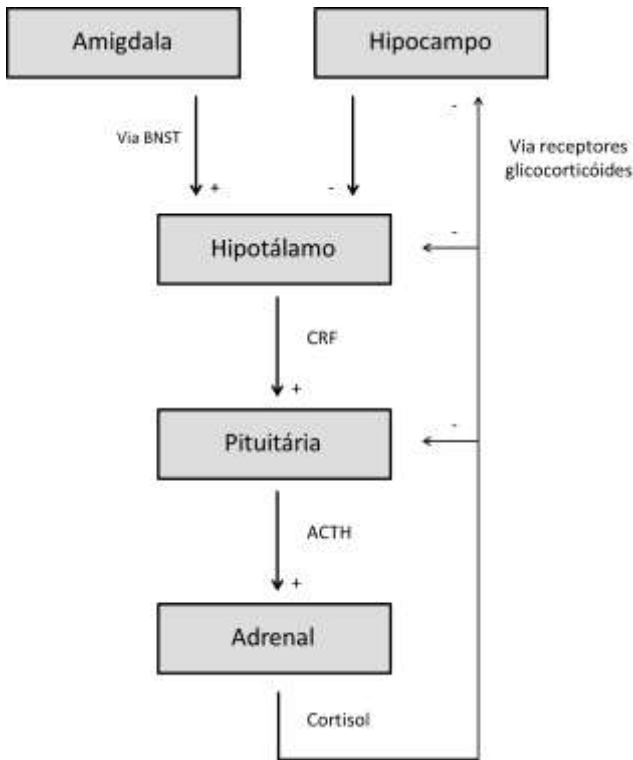


Figura 1. O eixo HPA e sua modulação funcional (Adaptado de AAN HET ROT; MATHEW; CHARNEY, 2009).

Na depressão, também são observadas anormalidades estruturais e funcionais em determinadas regiões cerebrais. A regulação normal do humor parece depender da integridade de vias que regulam emoção e humor, e de outras vias responsáveis pela codificação e processamento da memória (DREVETS; PRICE; FUREY, 2008). Estas vias passam por regiões cerebrais como hipocampo, córtex, amígdala, hipotálamo, responsáveis por modular aspectos relacionados ao humor, expressão emocional, atenção, resposta ao estresse, motivação, comportamento social e funções neurovegetativas (sono, apetite, energia, libido) e que estão intensamente relacionados com a sintomatologia depressiva (BERTON; NESTLER, 2006). Embora diversas teorias a respeito dos transtornos do humor já tenham sido propostas, a etiologia da depressão ainda não é suficientemente compreendida; o que já se sabe é que várias

regiões cerebrais estão envolvidas na patofisiologia deste transtorno. Sendo assim, pesquisas focam principalmente na investigação de características morfológicas, neurofisiológicas, neuropatológicas e neuroquímicas que ocorrem com estes sistemas encefálicos, que são possivelmente a base neurobiológica das características da depressão (CAMPBELL; MACQUEEN, 2004; DREVETS; PRICE; FUREY, 2008).

Para substanciar estas informações, diversos estudos *post-mortem* e de neuroimagem mostram que pacientes depressivos apresentam alterações morfológicas em algumas áreas cerebrais, como uma redução do volume do hipocampo e de algumas regiões do córtex, além de um aumento na atividade da amígdala (AAN HET ROT; MATHEW; CHARNEY, 2009). A Figura 2 exemplifica as principais regiões cerebrais envolvidas em processos relacionados à depressão.

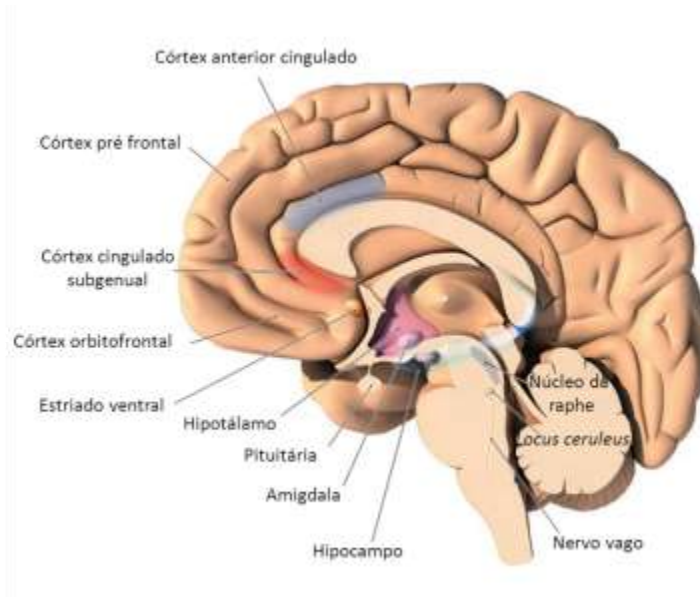


Figura 2. Regiões cerebrais que apresentam anormalidades estruturais e funcionais em pacientes depressivos (Adaptado de AAN HET ROT; MATHEW; CHARNEY, 2009).

Tomando como base a teoria monoaminérgica, a depressão ocorreria em resposta a uma diminuição nos níveis de serotonina e/ou de noradrenalina em algumas regiões do cérebro. Levando em conta esta teoria, diversos estudos já demonstraram que drogas antidepressivas aumentam as concentrações sinápticas de noradrenalina e/ou serotonina, exercendo assim, seus efeitos antidepressivos (WONG; LICINIO, 2001; BERTON; NESTLER, 2006). No entanto, mesmo sendo a primeira escolha, os fármacos que facilitam a neurotransmissão monoaminérgica no cérebro não são capazes de gerar melhoria imediata dos sintomas depressivos, uma vez que seus efeitos demoram semanas para aparecer e, além disso, nem todos os pacientes deprimidos são tratados com sucesso com esses fármacos, uma vez que alguns apresentam resistência aos mesmos (BELMAKER; AGAM, 2008). Desta forma, a pesquisa de novas terapias para depressão é importante e necessária para a sociedade atual.

1.2 O teste do nado forçado como ferramenta para o estudo de processos relacionados ao estresse e depressão

O comportamento de imobilidade observado no teste de nado forçado é uma medida muito utilizada para avaliar a atividade antidepressiva de drogas na fase pré-clínica (LUCKI, 1997; CRYAN; MARKOU; LUCKI, 2002; NESTLER et al., 2002a; NESTLER et al., 2002b; CRYAN; PAGE; LUCKI, 2005; NESTLER; HYMAN, 2010). Nesse teste, roedores ingênuos são expostos a uma situação de estresse inescapável, agudo e de curta duração, e o tempo durante o qual ele responde ativamente *versus* passivamente é medido. Durante o período inicial, há o predomínio de comportamentos ativos, onde o animal tenta escapar da situação supostamente aversiva. Após o primeiro ou segundo minuto dos cinco da sessão de teste, observa-se o predomínio de um comportamento passivo de imobilidade. De maneira geral, a imobilidade é interpretada como uma falha na persistência do comportamento de fuga (i.e. desespero comportamental) (CRYAN; MARKOU; LUCKI, 2002). Antidepressivos utilizados atualmente aumentam o tempo das respostas ativas, e esse resultado é interpretado como uma redução do desespero comportamental (PORSOLT; LE PICHON; JALFRE, 1977; O'NEIL; MOORE, 2003; CASTAGNE et al., 2010; NESTLER; HYMAN, 2010).

No entanto, o nado forçado não apresenta uma boa validade de face, ou seja, não reproduz em animais de laboratório importantes características bioquímicas, neuropatológicas ou comportamentais da doença, que são observadas em humanos (MCARTHUR; BORSINI, 2006). Além disso, o teste também não apresenta validade de construção, que é a capacidade do teste ou modelo em replicar fatores etiológicos que causam a depressão, os quais ainda não são completamente entendidos (NESTLER; HYMAN, 2010). A ausência de modelos animais ideais para o estudo da depressão faz com que as pesquisas foquem em testes e modelos disponíveis, que envolvem a exposição de animais saudáveis (que não possuem predisposição genética à depressão) à várias formas de estresse agudo ou crônico (BERTON; NESTLER, 2006). No entanto, além de apresentar um baixo custo e facilidade de execução, este teste tornou-se uma ferramenta bastante utilizada por apresentar uma boa validade preditiva para detecção de drogas antidepressivas (KRISHNAN; NESTLER, 2010; NESTLER; HYMAN, 2010). Diversos estudos mostram que antidepressivos clássicos, atípicos e até mesmo drogas mais novas em fase de estudo diminuem o tempo de imobilidade de animais expostos ao teste (O'NEIL; MOORE, 2003).

Para melhorar a sensibilidade do teste do nado forçado tradicional, algumas modificações já foram feitas com relação à interpretação dos comportamentos ativos em ratos, que incluem, além do nado (movimento geralmente horizontal ao longo do cilindro), também a escalada (movimentos direcionados à parede do cilindro), e o mergulho (CRYAN; MARKOU; LUCKI, 2002; LINO-DE-OLIVEIRA; DE LIMA; CAROBREZ, 2005). Já a imobilidade é definida como ausência de comportamentos ativos, de acordo com o teste tradicional de Porsolt (PORSOLT; LE PICHON; JALFRE, 1977; PORSOLT et al., 1978; PORSOLT et al., 2001). Essa análise detalhada do teste do nado forçado permite avaliar o perfil de atividade de drogas: existem relatos na literatura demonstrando que compostos que facilitam a neurotransmissão serotoninérgica aumentam o tempo de nado enquanto compostos que agem via sistema noradrenérgico aumentam a escalada (RÉNÉRIC; LUCKI, 1998; PAGE et al., 1999; CRYAN; MARKOU; LUCKI, 2002; O'NEIL; MOORE, 2003; CRYAN; PAGE; LUCKI, 2005).

Estudos mostram que o teste do nado forçado é também sensível a outras classes de fármacos, além dos antidepressivos, como cafeína e anfetamina, que são compostos que estimulam a locomoção. Essas drogas podem gerar resultados falso-positivos por sua capacidade de

diminuir o tempo de imobilidade e de aumentar a duração dos comportamentos ativos (PORSOLT; LE PICHON; JALFRE, 1977; VIEIRA et al., 2008). Para garantir que não existe influência de alterações locomotoras no resultado, geralmente é feito um teste para avaliação da atividade locomotora, como o teste do campo aberto. No entanto, estudos adicionais já demonstram que a avaliação da frequência de escalada no teste do nado forçado é um indicativo de atividade locomotora em ratos. Vieira e colaboradores demonstraram que animais tratados com cafeína apresentaram um aumento na atividade locomotora quando expostos ao campo aberto, em paralelo a um aumento da frequência de escalada no teste do nado forçado (VIEIRA et al., 2008). Sendo assim, é possível obter dados de atividade locomotora com os mesmos grupos experimentais expostos ao teste do nado forçado, otimizando as análises.

1.3 Hipocampo

Além de ter um papel importante em processos relacionados à memória, torna-se cada vez mais evidente o papel do hipocampo em processos relacionados à emoção e regulação do comportamento (FANSELOW; DONG, 2010). O hipocampo é uma das regiões cerebrais que recebe bastante atenção, particularmente em estudos de depressão com animais, uma vez que é uma região associada com anormalidades que são vistas em pacientes depressivos (BERTON; NESTLER, 2006).

Por um lado, o hipocampo é uma estrutura unitária. Alternativamente, as partes dorsal e ventral são separadas, processando informações de maneira diferente. Relatos da literatura demonstram que há uma quantidade celular menor no hipocampo ventral do que no hipocampo dorsal e, além disso, parece que a distribuição celular na porção ventral é descontínua (MOSER; MOSER, 1998). Alguns estudos relatam também, diferenças neuroquímicas, funcionais, além da expressão diferenciada de receptores e de alguns genes nas camadas das células piramidais (LEONARDO et al., 2006; PANDIS et al., 2006; KHEIRBEK; HEN, 2011).

De maneira importante, estudos com animais vêm mostrando que as funções exercidas pelo hipocampo estão distribuídas de maneira quase que segmentada, ao longo do seu eixo dorsoventral (BANNERMAN et al., 2004). Essa dissociação funcional é suportada

também pela diferente conectividade anatômica das duas sub-regiões (fig. 3).

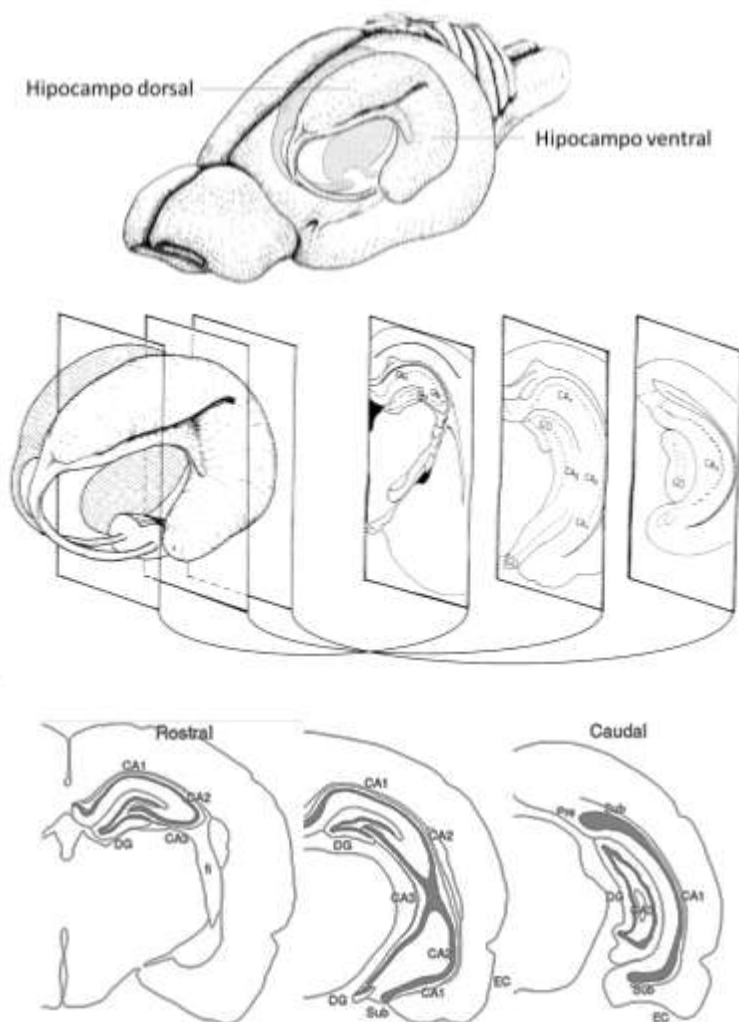


Figura 3. Diagrama hipocampal de rato. (A) Distinção anatômica das sub-regiões hipocâmpais e (B) seções coronais ao longo do eixo rostrocaudal do hipocampo (Adaptado de CHEUNG; CARDINAL, 2005).

1.3.1 Conectividade anatômica e modulação de processos relacionados com cognição pelo hipocampo dorsal (HD)

Quando se fala de hipocampo, a ideia predominante é que esta região está particularmente envolvida com memória. De fato, estudos suportam esta afirmação, demonstrando que lesões nesta estrutura geram prejuízos na memória espacial e em outras tarefas envolvendo memória não espacial. No entanto, estas funções são vinculadas principalmente à porção dorsal desta estrutura. Diversos experimentos prévios associados com estudos anatômicos demonstram prejuízos no aprendizado espacial quando a lesão é feita no hipocampo dorsal; o mesmo não ocorre com lesões no hipocampo ventral (MOSER; MOSER; ANDERSEN, 1993; MOSER; MOSER, 1998; BANNERMAN et al., 1999; BANNERMAN et al., 2002; BANNERMAN et al., 2003).

As funções exercidas pelo HD são consistentes com suas conexões anatômicas: nesta sub-região, a subcamada CA1 envia projeções excitatórias para as partes dorsais do *subiculum*, *pré-subiculum* e *pós-subiculum*. No entanto, a projeção mais proeminente da CA1 ocorre para o córtex cingulado anterior e córtex retrosplenial, que são duas regiões corticais envolvidas no processamento cognitivo da informação visuo-espacial, no processamento de memória e na exploração ambiental. Desta forma, formando uma rede com áreas do córtex cingulado e retrosplenial, o complexo subiculum-hipocampal dorsal modula processos cognitivos como aprendizado, memória, navegação e exploração (FANSELOW; DONG, 2010).

1.3.2 Conectividade anatômica e modulação de processos relacionados com emoção pelo hipocampo ventral (HV)

Diversos estudos mostram um papel para a porção ventral desta estrutura em processos relacionados ao comportamento emocional (KJELSTRUP et al., 2002; BANNERMAN et al., 2003; BERTOGLIO; JOCA; GUIMARÃES, 2006).

A sub-região ventral difere da dorsal por suas conexões anatômicas, que suportam suas funções relacionadas com a emocionalidade. O HV envia projeções para o córtex pré-frontal e é intensamente conectado com o núcleo do leito da estria terminal, núcleo accumbens, amígdala e outras estruturas subcorticais que estão

associadas com o eixo HPA. A forte conectividade entre HV, hipotálamo e amígdala sugere que o HV exerce um papel importante na regulação da emocionalidade (BANNERMAN et al., 2004; BARKUS et al., 2010).

1.3.3 Hipocampo e depressão

Embora o hipocampo não seja o principal responsável pelos sintomas observados na depressão, sua alta capacidade plástica, sensibilidade ao estresse e capacidade de regular e modular o eixo HPA sugerem que esta região exerce um papel crucial na depressão (CAMPBELL; MACQUEEN, 2004; MALYKHIN et al., 2010).

Estudos com neuroimagem têm mostrado que pacientes depressivos apresentam uma redução no volume hipocampal (FRODL et al., 2002; MACQUEEN et al., 2003; CAMPBELL; MACQUEEN, 2004; CAMPBELL et al., 2004; VIDEBECH; RAVNKILDE, 2004; KRONMULLER et al., 2009). Isto se faz importante uma vez que a alteração da função hipocampal influencia a atividade de diversas outras estruturas cerebrais – como o córtex pré-frontal (VERWER et al., 1997), amígdala (MAREN; HOBIN, 2007), núcleo accumbens (O'DONNELL; GRACE, 1995), e outras – que são relacionadas com a emocionalidade.

Diversos estudos com animais mostram que as respostas dos antidepressivos utilizados atualmente parecem depender, em parte, dos processos de neurogênese que ocorrem no giro denteado das sub-regiões dorsal e ventral do hipocampo (SAHAY; HEN, 2007). Estudos mostram que o tratamento crônico com imipramina, um antidepressivo tricíclico, e fluoxetina, um inibidor seletivo da recaptação de serotonina, aumentam a neurogênese no giro denteado de roedores e humanos (SANTARELLI et al., 2003; SAHAY; HEN, 2007). Além disso, sugere-se que estes fármacos dependem de processos de neurogênese para que seus efeitos terapêuticos ocorram (MALBERG et al., 2000; SAHAY; HEN, 2007; SANTARELLI et al., 2003; KHEIRBEK; HEN, 2011; SURGET et al., 2011).

O hipocampo é bastante vulnerável frente ao estresse, e isso é evidenciado por alterações morfológicas que incluem atrofia e diminuição dos neurônios piramidais da camada CA3 em resposta a uma situação estressora (MALBERG et al., 2000; CAMPBELL; MACQUEEN, 2004). O estresse diminui a expressão de BDNF no hipocampo de roedores, e várias classes de antidepressivos produzem

efeitos opostos, prevenindo essa ação do estresse (BERTON; NESTLER, 2006).

1.4 Receptores vanilóides de potencial transitório do tipo 1

A busca por novas abordagens a respeito da neurobiologia da depressão, como o possível envolvimento de sistemas não-monoaminérgicos, torna-se cada vez mais interessante e pode contribuir para um melhor entendimento sobre a neurobiologia e patofisiologia deste transtorno (BERTON; NESTLER, 2006).

Neste contexto, o receptor vanilóide de potencial transitório do tipo 1 ou TRPV1 (do inglês *transient receptor potential vanilloid type 1*), primeiramente clonado por Caterina e colaboradores (1997), é um canal de cátion não seletivo com preferência para cálcio e pertence a grande família de proteínas denominadas TRP (*transient receptor potential*). Este canal responde à estímulos externos, como luz, temperatura, estímulos químicos ou mecânicos, geralmente aumentando ou diminuindo a permeabilidade deste canal a alguns íons e subsequentemente modificando o potencial da membrana celular (TOMINAGA; TOMINAGA, 2005). Os TRPV1 foram nomeados desta forma devido à resposta observada durante a fototransdução de *Drosophila* mutantes, que respondiam de forma transitória, ao invés de sustentada, à luz forte (MONTELL, 2005).

Assim como outros canais pertencentes à família TRP, o TRPV1 possui seis domínios transmembrana, terminais intracelulares N- e C-, e uma região formando um poro, que é localizado entre os segmentos 5 e 6. Os TRPV1 são ativados pela capsaicina, um composto isolado da pimenta vermelha (*Capsicum SP*) que é responsável pela sensação pungente causada pela pimenta. Além deste composto, esse canal também responde a outras toxinas provenientes de plantas, sendo a resiniferatoxina (RTX) a mais potente (SZALLASI; BLUMBERG, 1999). Uma representação do TRPV1 e seus ligantes está ilustrada na Figura 4.

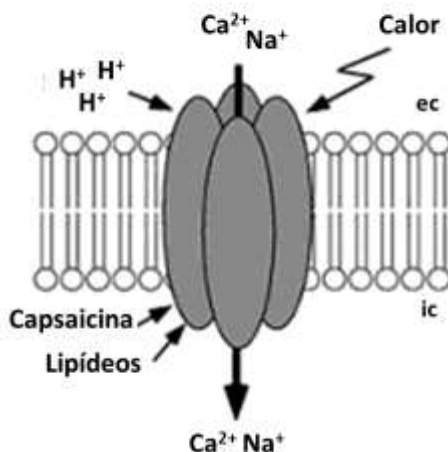


Figura 4. TRPV1 presente na membrana celular e seus alvos de ativação para calor, prótons, capsaicina, lipídeos, com consequente aumento no influxo de cátions (Retirado de TOMINAGA; TOMINAGA, 2005).

Evidências apontam para a existência de ligantes endógenos para os TRPV1, conhecidos como endovanilóides. Entre eles, pode-se citar a anandamida (N-arachidonoil-etanolamina), derivados de ácidos graxos, como o NADA (N-arachidonoil-dopamina) e produtos da lipooxigenase, como o 12-S-HPETE (12-(S)-ácido hidroperóxicosetetraenóico). Estes compostos geralmente apresentam alguma afinidade para receptores canabinóides do tipo 1 (CB1). A estrutura química dos principais endovanilóides está representada na Figura 5 (STAROWICZ; NIGAM; DI MARZO, 2007).

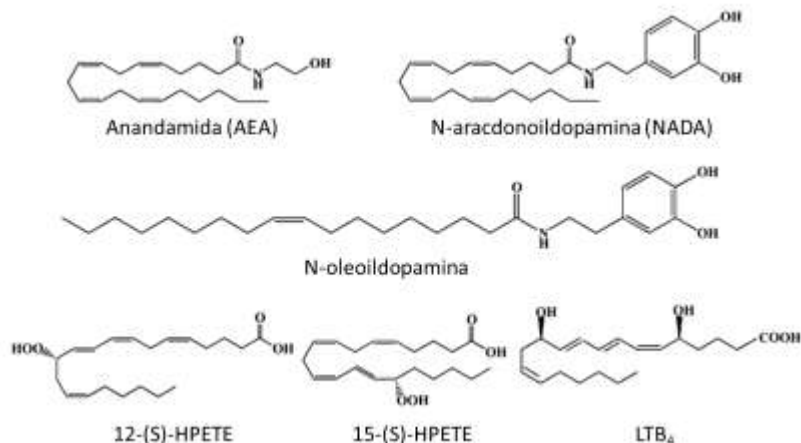


Figura 5. Estrutura química dos principais ligantes endógenos dos TRPV1 (STAROWICZ; NIGAM; DI MARZO, 2007).

É digno de nota que, além de serem expressos na membrana celular, os TRPV1 estão presentes também no retículo endoplasmático. Desta forma, a atividade farmacológica pode variar entre ligantes que possuem ou não a capacidade de atravessar a membrana celular (CORTRIGHT; SZALLASI, 2004). Capsaicina, RTX e outros análogos possuem estruturas lipofílicas, por isso são capazes de atravessar a membrana celular e, possivelmente, agir em sítios de ligação intracelulares (Fig. 4, TOMINAGA; TOMINAGA, 2005).

A excitação neuronal evocada pela ativação destes canais é seguida por um estado refratário durante o qual os neurônios previamente excitados deixam de responder ao estímulo. Este fenômeno é conhecido como dessensibilização, cujo potencial terapêutico tem sido explorado no contexto da dor (CATERINA et al., 1997; SZALLASI et al., 2007). De fato, o papel dos TRPV1 na modulação da dor já é bem consolidado, e a expressão dos mesmos em fibras aferentes primárias e em neurônios sensoriais é consistente com estes achados (CATERINA et al., 1997; TOMINAGA et al., 1998).

Embora a maioria dos estudos tenha sido direcionada para a modulação da dor no sistema periférico, há um número crescente de evidências que sugerem um papel para os TRPV1 presentes no sistema nervoso central (KAUER; GIBSON, 2009). Estudos em roedores têm

investigado e confirmado a expressão destes canais em diversas estruturas encefálicas, como núcleos talâmicos e hipotalâmicos, *locus coeruleus*, substância cinzenta periaquedutal (PAG), cerebelo, hipocampo e córtex, tanto por hibridização *in situ* (MEZEY et al., 2000) como por métodos imunohistoquímicos (CRISTINO et al., 2006). Com efeito, algumas destas regiões que expressam TRPV1 estão intimamente relacionadas com o controle da dor, de respostas defensivas e de respostas de estresse (CHARNEY, 2003; HERMAN et al., 2005). Além disso, foi mostrado que este canal pode modular a liberação de glutamato (MARINELLI et al., 2002; PALAZZO et al., 2002; MARINELLI et al., 2003; STAROWICZ et al., 2007; XING; LI, 2007), e que, por sua vez, está envolvido na modulação de respostas relacionadas com ansiedade e depressão (BERGINK; VAN MEGEN; WESTENBERG, 2004). Estudos demonstram também a co-localização de TRPV1 com receptores CB1 em algumas regiões encefálicas (CRISTINO et al., 2006), substanciando estudos farmacológicos que mostram uma relação funcional entre TRPV1 e CB1 (MOREIRA et al., 2011).

Para substanciar a interação entre a expressão de TRPV1 no cérebro com a modulação de processos relacionados com emoção, um estudo utilizando camundongos *knock-out* para TRPV1 mostrou que estes animais apresentaram respostas defensivas reduzidas (MARSCH et al., 2007). Além disso, a administração do antagonista capsazepina foi capaz de diminuir as respostas defensivas (i.e. efeitos ansiolíticos) em ratos quando administrada no no hipocampo ventral (SANTOS; STERN; BERTOGLIO, 2008), no córtex pré-frontal ventromedial (AGUIAR et al., 2009) e na PAG dorsolateral (TERZIAN et al., 2009). É importante ressaltar que, uma vez que os TRPV1 encontram-se bloqueados por um antagonista, os endovanilóides que se ligariam nestes canais – muitos dos quais possuem afinidade também para CB1 – poderão atuar apenas em receptores CB1. Desta forma, o efeito ansiolítico pode não apenas ser mediado pelo bloqueio TRPV1, como também pela ativação CB1 (RUBINO et al., 2008).

Existem poucos estudos que abordam a participação do sistema vanilóide na modulação dos comportamentos observados no teste do nado forçado. Porém, alguns deles indicam que a ativação dos TRPV1 diminui o tempo de imobilidade (i.e. inibe o desespero comportamental). Por exemplo, Kim e colaboradores demonstraram que camundongos tratados com capsaicina, um agonista dos TRPV1, nadaram por mais tempo quando comparados com camundongos controle (KIM et al., 1997). Em complemento a este resultado, esse

mesmo grupo de pesquisa verificou que a administração prévia de capsazepina suprimiu os efeitos da capsaicina no nado forçado, sugerindo que esse efeito foi mediado por receptores vanilóides (KIM et al., 1998). Outro estudo mostrou que drogas agonistas dos TRPV1, como capsaicina e olvanil, diminuíram o tempo de imobilidade de animais que apresentam um maior tempo de imobilidade induzido por nicotina e estresse de imobilização (HAYASE, 2011).

Sendo assim, a hipótese de trabalho deste estudo é a seguinte: se o agonista dos TRPV1 é capaz de diminuir o tempo de imobilidade em roedores, pode-se supor que os antagonistas exerceriam um efeito contrário, ou seja, potencializando o comportamento de imobilidade em ratos submetidos ao teste do nado forçado.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Avaliar a participação dos canais TRPV1 hipocampais na modulação do comportamento de ratos submetidos ao teste do nado forçado.

2.2 Objetivos específicos

- Confirmar a expressão dos canais TRPV1 ao longo do eixo dorsoventral do hipocampo de ratos *Wistar* machos;
- Investigar a influência do antagonismo farmacológico dos TRPV1 presentes na porção dorsal ou na porção ventral do hipocampo no comportamento de animais submetidos ao teste do nado forçado;
- Verificar o efeito da inativação temporária das porções dorsal e ventral do hipocampo no comportamento de animais submetidos ao teste do nado forçado;
- Comparar os efeitos do antagonismo dos TRPV1 com a inativação temporária.

3 METODOLOGIA

3.1 Considerações éticas

A execução deste trabalho ocorreu após a aprovação do mesmo pelo Comitê de Ética Para o Uso de Animais da Universidade Federal de Santa Catarina (066-2009/CEUA/PRPe/UFSC). O número de animais utilizado foi o mínimo suficiente para a obtenção de análises estatísticas confiáveis.

3.2 Animais

Foram utilizados ratos Wistar machos de 3 – 4 meses de idade, pesando entre 280 – 330 g, todos provenientes do biotério central da Universidade Federal de Santa Catarina. Os animais foram mantidos em grupos de 3 – 4 em gaiolas plásticas padrões (36 x 30 x 15 cm), com livre acesso à água e comida. A temperatura ambiente foi mantida em 22 ± 1 °C e ciclo de luz claro/escuro de 12 h, com início às 07:00 h.

3.3 Imunohistoquímica

Os animais foram anestesiados com uma solução de hidrato de cloral 15% (2,5ml/kg, i.p.) e xilazina (10mg/ml/kg, i.p.) e perfundidos com sacarose 9,2% seguido por paraformaldeído 4% em tampão fosfato 0,1M (pH 7.4). Os cérebros foram removidos e fixados em paraformaldeído (4%) durante 24 h, e posteriormente armazenados em sacarose 20%, como descrito por Lino-de-Oliveira e colaboradores (LINO-DE-OLIVEIRA et al., 2006). Secções coronais de 40 μ m foram obtidas em um criostato (Leica CM 1850, Microsystems AG, Alemanha) e processadas para imunohistoquímica para TRPV1.

O procedimento foi executado de acordo com Cristino e colaboradores (CRISTINO et al., 2006), com algumas modificações. As secções foram submetidas à reação por 30 min com H₂O₂ 0,3% para inativar a atividade da peroxidase endógena, e incubadas por 60 min à temperatura ambiente em soro albumina bovina 1% (BSA, Sigma

Aldrich) diluído em Tampão A (tampão fosfato 0,1 M pH 7,4 contendo Triton X-100 – Sigma, St. Louis, MO, USA – 0,15%). As secções foram então incubadas por 2 dias a 4 °C com anticorpo que reconhece a porção N-terminal do receptor TRPV1 (Anticorpo VR1 Goat IGG, Santa Cruz Biotechnology), diluído na concentração de 1:200 com a solução de BSA 1% anteriormente preparada. Após algumas lavagens, as secções foram incubadas à temperatura ambiente, durante 90 min, com o anticorpo secundário (Anti-goat IGG biotilado, Vector Laboratories), diluído em Tampão A na concentração de 1:400. Em seguida, as secções foram incubadas durante 2 h com o complexo avidina-biotina (ABC, Vectastain, Vector Laboratories) diluído em 1:500, e, posteriormente, em uma solução de 3,3'-diaminobenzidina 0,05% durante 10 min (DAB Sigma Fast, Sigma-Aldrich). O controle da imunorreatividade incluiu a coloração com o mesmo protocolo omitindo o anticorpo primário.

3.4 Drogas

As drogas utilizadas no desenvolvimento deste estudo foram as seguintes:

- Capsazepina (Sigma Aldrich), um antagonista TRPV1, foi utilizada nas doses de 1,0 e 3,0 nmol/0,2 µl/hemisfério. A droga foi dissolvida em salina contendo 15% de dimetilsulfóxido (DMSO). As doses foram baseadas em trabalhos prévios realizados em nosso laboratório.

- SB-366791 (Sigma Aldrich), um antagonista mais seletivo para TRPV1, foi utilizado nas doses de 0,1; 1,0 e 3,0 nmol/0,2 µl/hemisfério. Esta droga foi dissolvida em salina contendo 15% de DMSO e 5% de polissorbato (Tween[®]) 80. As doses foram baseadas em experimentos pilotos realizados em nosso laboratório.

- Muscimol (Sigma Aldrich), um agonista GABAérgico capaz de causar uma inativação temporária das células próximas ao local de infusão, foi utilizado nas doses de 4,0 e 8,0 nmol/0,2 µl/hemisfério, dissolvido em PBS (tampão fosfato-salina), para proceder à inativação das regiões cerebrais estudadas. As doses foram baseadas em trabalhos prévios da literatura (CORCORAN et al., 2005).

Em todos os experimentos realizados, os animais controle receberam a infusão da solução na qual a respectiva droga foi dissolvida.

3.5 Cirurgia estereotáxica e microinjeção hipocampal

Ratos anestesiados com uma solução contendo xilazina (10 mg/ml; Carlier, Brasil) e quetamina (100 mg/ml; Sespo, Brasil) foram posicionados no aparelho estereotáxico após a perda total dos reflexos. Uma solução de álcool iodado foi utilizada para realizar a assepsia da parte superior da cabeça, e uma solução de lidocaína 3% com adrenalina 1:50.000 (Lidostesim®, Dentsply Pharmaceutical, Brasil) foi injetada por via subcutânea no local da incisão. Um corte nessa região foi feito, com posterior raspagem do periósteo, o que permitiu a visualização do crânio e das suturas lambdóide e coronal.

Após a assepsia, um parafuso de aço inoxidável foi fixado no crânio dos animais, para auxiliar na fixação da prótese de acrílico que é colocada posteriormente. Em seguida, duas cânulas-guias, confeccionadas a partir de agulhas descartáveis 25,0 x 7,0 mm, foram direcionadas para o HD ou para o HV, a partir das coordenadas retiradas do Atlas do cérebro de ratos de Paxinos e Watson (PAXINOS; WATSON, 2009), que foram as seguintes: 3,6 mm posterior ao Bregma, 2,3 mm relativo ao eixo lateral e -2,0 mm relativo ao eixo dorsoventral para o HD; e 5,2 mm posterior ao Bregma, 5,0 mm relativo ao eixo lateral e -4,0 mm relativo ao eixo dorsoventral, para o HV.

As cânulas-guia foram fixadas no crânio do animal com uma resina de acrílico. Em seguida, um fio de aço inoxidável (nº 30) foi inserido em cada uma das cânulas, para evitar uma possível obstrução. Ao final do procedimento cirúrgico, todos os animais receberam uma solução de antibiótico contendo benzilpenicilina e estreptomicina (Pentabiótico®, Fort Dodge, Brasil; 1,0 ml/kg), por via intramuscular, para evitar uma possível infecção. Além disso, os ratos receberam também flunixin meglumina (Schering-Plough, Brasil; 2,5 mg/kg) por via subcutânea, uma droga com propriedades analgésica, antipirética e anti-inflamatória.

Cinco a sete dias após a cirurgia estereotáxica, no momento da microinjeção, o animal foi imobilizado, os fios de aço foram retirados e as cânulas-guia foram limpas com uma lima odontológica (K-FILE Colorinox® A012D, Dentsply Ind. Com. Ltda., Brasil), ajustada para o tamanho das cânulas. Após a limpeza e desobstrução, as agulhas de injeção (agulhas gengivais de 0,3 mm de diâmetro) foram conectadas à uma microseringa Hamilton (10 µl) por meio de um tubo de polietileno PE10 (Clay Adams, EUA), e foram inseridas dentro de cada cânula, posicionadas 1,3 mm ou 3,2 mm abaixo das cânulas no HD ou no HV,

respectivamente. Cada animal recebeu 0,2 µl/hemisfério das soluções utilizadas, infundidas durante 1 minuto, com o auxílio de uma bomba de infusão (Insight, Brasil). O deslocamento de uma bolha de ar dentro do polietileno foi utilizado para monitorização do fluxo da solução. As agulhas foram removidas 30s após o fim da infusão.

3.6 Teste Comportamental

3.6.1 Teste do Nado Forçado

O teste do nado forçado foi executado de acordo com o proposto por Porsolt e colaboradores (PORSOLT et al., 1978), com algumas modificações (LINO-DE-OLIVEIRA; DE LIMA; CAROBREZ, 2005). Primeiramente, os animais foram submetidos à uma sessão de pré-teste, com duração de 15 minutos. Após 24 horas, os animais foram submetidos à sessão de teste, com duração de 5 minutos. Para ambas as sessões, os animais foram colocados individualmente em um cilindro de PVC (20 cm x 40 cm), contendo água limpa à $23 \pm 1^\circ$, e profundidade de 25 cm. Ao término das sessões, os animais foram retirados do cilindro, secos com o auxílio de uma flanela e deixados por 15 minutos sob uma lâmpada (60W). Em seguida, foram colocados novamente em suas caixas-moradia (LINO-DE-OLIVEIRA; DE LIMA; CAROBREZ, 2005). A água foi trocada antes de cada animal ser submetido às sessões, para evitar uma possível interferência de substâncias de alarme, liberadas pela urina ou fezes de animais previamente submetidos à sessão, cujo odor poderia influenciar no comportamento do animal subsequente (ABEL; BILITZKE, 1990).

Todos os experimentos realizados continham tanto animais controle como animais tratados. Os experimentos ocorreram entre as 08:00 e 13:00 h, executados com iluminação de 40 lux. As sessões de pré-teste e teste foram gravadas por uma câmera localizada na sala experimental e conectada à um sistema de monitor e gravador de DVD localizados na sala adjacente, possibilitando a análise posterior dos comportamentos realizados pelos animais.

3.7 Análise comportamental

A partir dos vídeos gravados de cada sessão de teste, foram registradas as durações (em segundos) das seguintes categorias comportamentais: (i) *imobilidade*, definida como uma diminuição do movimento de todo o corpo do animal, consistindo de poucos movimentos, apenas os necessários para manter a cabeça acima da água; (ii) *nado*, considerado quando se observou movimentos intensos do animal com as patas dianteiras, movimentando o corpo ao redor do cilindro, movimentos estes mais do que os necessários para apenas manter a cabeça acima da água; (iii) *escalada*, considerada quando movimentos vigorosos com as patas dianteiras foram realizados pelo animal dentro e fora da água, geralmente direcionados contra a parede do cilindro; (iv) *mergulho*, considerado quando todo o corpo do animal, incluindo a cabeça, encontrava-se submerso. Para determinar a distribuição comportamental ao longo da sessão de teste, toda a contagem comportamental foi registrada minuto a minuto. E além destes, a frequência de escalada também foi quantificada, uma vez que já foi demonstrado que esta medida está relacionada com o comportamento locomotor (LINO-DE-OLIVEIRA; DE LIMA; CAROBREZ, 2005; VIEIRA et al., 2008).

3.8 Análise histológica dos sítios de injeção

Ao término do experimento comportamental, os animais receberam uma solução anestésica contendo cloral hidratado a 15% (2,5 mg/ml) e xilazina (10 mg/ml) via i.p., seguida por microinjeção de azul de evans (0,2 µl/hemisfério) e perfusão intracardiaca, inicialmente com solução salina (NaCl 0,9%), seguida de solução de formalina (10%). Os encéfalos foram, então, retirados e conservados individualmente em recipientes contendo solução de formalina 10%. 48 h antes da realização dos cortes histológicos, os encéfalos foram transferidos para recipientes contendo solução de sacarose 30%, para crioproteção.

Para a análise histológica e verificação do sítio de injeção da droga, cortes coronais (50 µm de espessura) foram obtidos utilizando um criostato (Leica CM 1850, Microsystems AG, Alemanha) a uma temperatura aproximada de -20 °C. Os cortes foram fixados em lâminas de vidro para microscopia, gelatinizadas. Após secagem das lâminas

com os cortes fixados, as mesmas foram coradas com a coloração de Giemsa modificada (ANEXO A), cobertas com lamínulas e seladas com resina sintética.

As lâminas foram fotografadas em uma lupa acoplada a uma câmera (Motic Moticam 2000; 2.0 MP *Live Resolution*) e um programa de imagens (Motic Image Plus 2.0) e comparadas com os diagramas do atlas de neuroanatomia (PAXINOS; WATSON, 2009), sendo as microinjeções realizadas no HD entre 3,3 a 4,1 mm e no HV entre 4,8 a 5,3 mm posterior a Bregma (fig 6). Em todos os experimentos, apenas os animais com histologia bilateral para o HD e HV foram incluídos na análise estatística, com acerto aproximado de 90% dos animais operados.

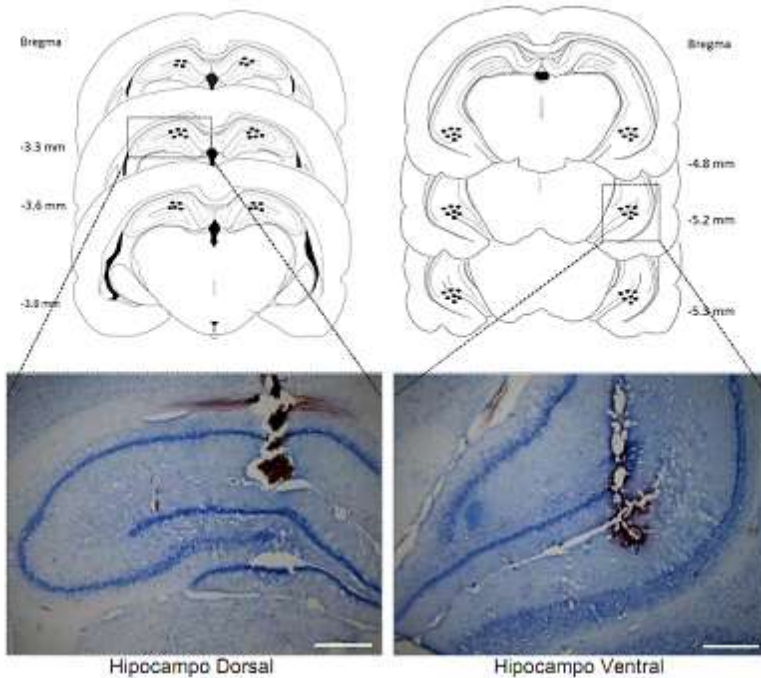


Figura 6. Diagramas de cortes coronais do cérebro de ratos mostrando os sítios de injeção no HD (esquerda) e no HV (direita), no painel superior. Fotomicrografias do sítio de injeção no HD (esquerda) e no HV (direita), no painel inferior. Barra de escala: 500 μ m.

3.9 Análise estatística

Para os experimentos 2 – 4, os resultados foram analisados por meio da análise de variância (ANOVA) de duas vias, onde os fatores independentes foram o tratamento e o local de infusão. Em seguida, uma ANOVA de medidas repetidas foi executada para avaliar os resultados minuto-a-minuto de cada parâmetro comportamental. Quando apropriado, utilizou-se o teste *post-hoc* de Duncan, com valor adotado de significância estatística de $p < 0,05$. Os resultados foram analisados pelo Statistica® 7 (StatSoft Inc., EUA) e representados em gráficos feitos no GraphPad Prism® 5 (GraphPad Prism, EUA).

4 RESULTADOS

4.1 Experimento 1. Análise imunohistoquímica qualitativa de canais TRPV1 no HD e no HV.

A fim de verificar a expressão e distribuição dos canais TRPV1 no HD e no HV, 5 ratos ingênuos foram submetidos à perfusão intracardíaca e tiveram seus cérebros removidos. As secções obtidas foram processadas de acordo com o procedimento citado no item 3.3.

4.1.1 Expressão de canais TRPV1 no HD e no HV.

A imunorreatividade positiva para TRPV1 foi observada principalmente no citoplasma dos corpos celulares. A análise qualitativa mostrou imunorreatividade ao longo das camadas CA1 – CA3 e giro denteado do HD e do HV (fig. 7) sugerindo a expressão de canais TRPV1 nestes locais, o que corrobora dados publicados anteriormente que demonstram a expressão destes canais no cérebro de ratos e de camundongos (TOTH et al., 2005; CRISTINO et al., 2006). Nenhum sinal de imunorreatividade foi detectado com a omissão do anticorpo primário.

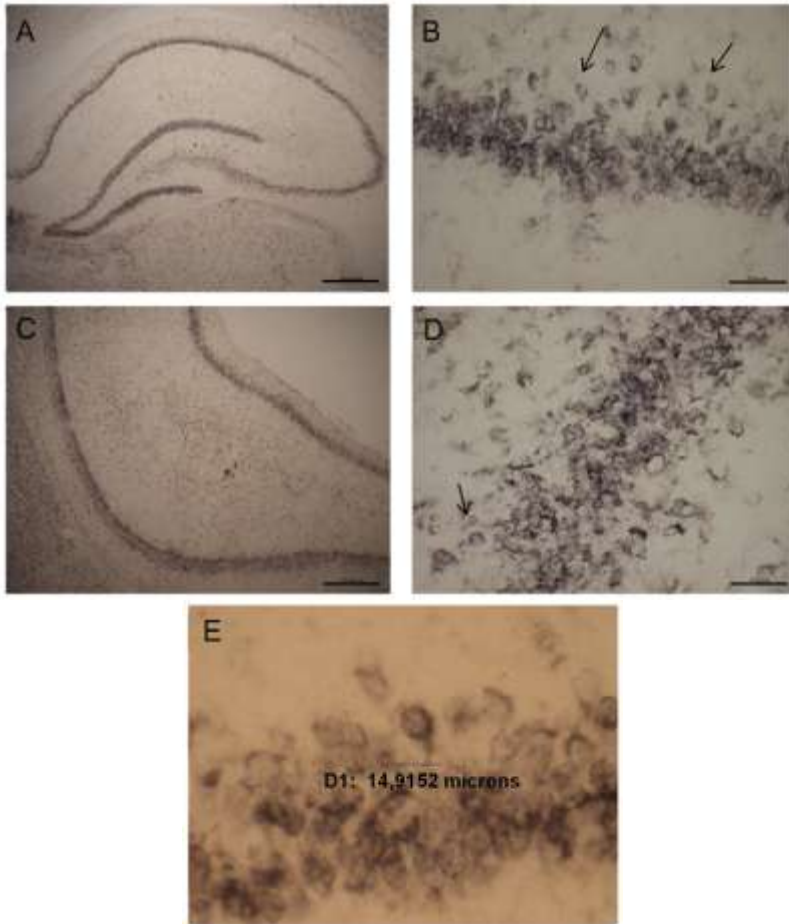


Figura 7. Expressão dos TRPV1 localizados no hipocampo. Fotomicrografia com aumento de 4x do HD (A) e do HV (C); de 40x do HD (B) e do HV (D) e com uma maior aproximação do aumento de 40x (E). Barra de escala: 500 μm (A, C); 50 μm (B, D).

4.2 Experimento 2: Efeito do bloqueio de canais TRPV1 pelo antagonista capsazepina (CPZ) no HD ou no HV de ratos expostos ao teste do nado forçado

Para investigar uma possível modulação dos canais TRPV1 hipocâmpais no comportamento dos animais submetidos ao teste do nado forçado, 43 ratos foram alocados aleatoriamente em seis grupos ($n = 7-10/\text{grupo}$), de acordo com o tratamento (veículo, CPZ 1,0 nmol ou CPZ 3,0 nmol) e local de infusão da droga (HD ou HV). Todas as soluções foram injetadas 10 minutos antes da exposição do animal à sessão de teste. O experimento foi realizado conforme protocolo experimental mostrado na Figura 8.

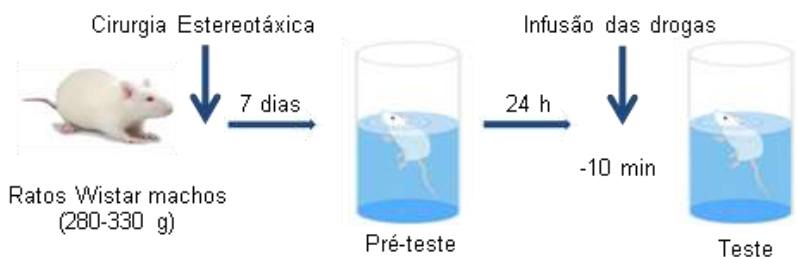


Figura 8. Esquema do protocolo utilizado para a avaliação dos grupos tratados com as soluções de veículo ou droga, injetadas 10 min antes da sessão de teste.

4.2.1 Parâmetros comportamentais avaliados após o bloqueio de canais TRPV1 por meio da infusão de capsazepina no HD ou no HV.

O bloqueio dos canais TRPV1 por meio da infusão de capsazepina no HD ou no HV antes da sessão de teste não alterou a duração dos parâmetros comportamentais de ratos submetidos ao teste do nado forçado.

A Figura 9 mostra o perfil comportamental dos animais tratados com CPZ e submetidos ao teste do nado forçado. A ANOVA de duas vias não revelou interações significativas para os parâmetros duração de imobilidade ($F_{2,35}=0,84$, $p=0,44$; fig. 9A) e duração de nado ($F_{2,35}=2,53$,

$p=0,09$; fig. 9B). Além disso, o fator tratamento também não alterou significativamente a duração da imobilidade ($F_{2,35}=2,39$, $p=0,11$; fig. 9A) e a duração do nado ($F_{2,35}=1,92$, $p=0,16$; fig. 9B). O fator local de infusão também não causou diferenças significativas para a duração de imobilidade e duração de nado ($F_{1,35}=1,00$, $p=0,32$ e $F_{1,35}=0,01$, $p=0,93$, respectivamente; fig. 9A e 9B).

Uma interação significativa entre o tratamento e o local de infusão foi observada para a duração da escalada ($F_{2,35}=5,80$, $p=0,01$; Tabela 1). O teste *post-hoc* de Duncan demonstrou uma diminuição significativa da duração de escalada em ratos tratados com CPZ 3,0 nmol no HV, em relação ao grupo controle. Não houve interações significativas para a duração do mergulho ($F_{2,35}=2,63$, $p=0,09$). Da mesma forma, tanto o tratamento ($F_{2,35}=1,10$, $p=0,34$) quanto o local de infusão ($F_{1,35}=0,12$, $p=0,73$) não causaram efeitos significativos neste parâmetro comportamental.

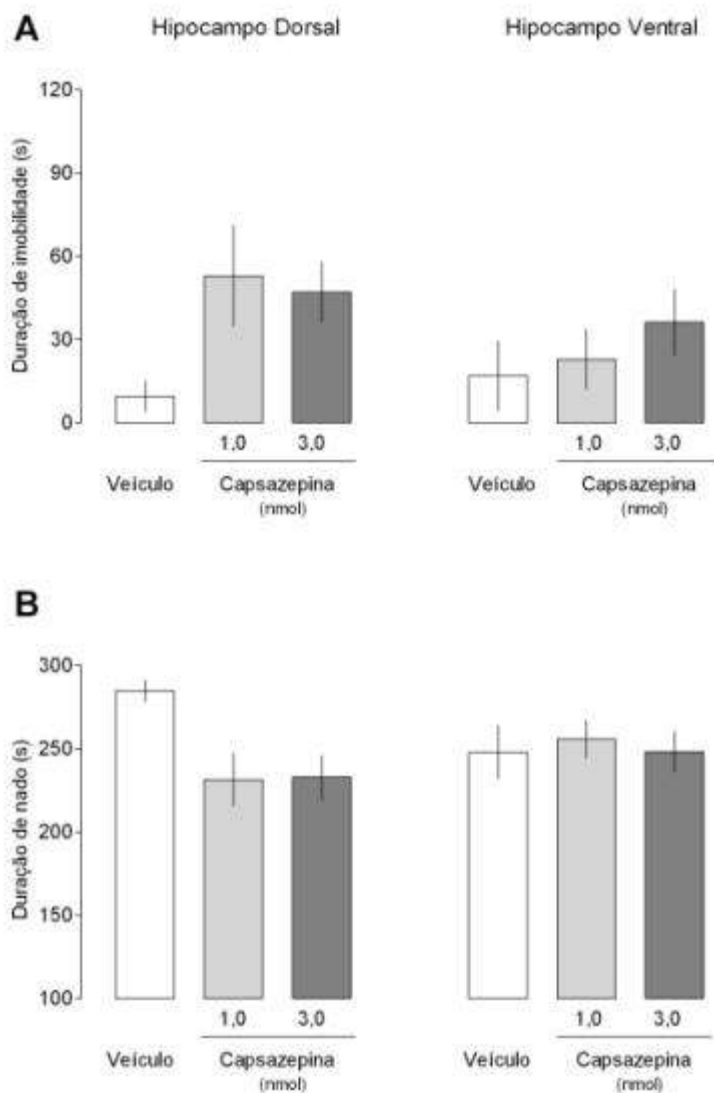


Figura 9. Infusão bilateral de capsazepina nas doses de 1,0 ou 3,0 nmol no hipocampo dorsal ou no hipocampo ventral de ratos submetidos ao teste do nado forçado. As barras verticais representam a média \pm EPM (ANOVA de duas vias).

Tabela 1. Duração dos comportamentos de escalada e mergulho mensurados na sessão de teste. Os dados estão representados como média \pm EPM.

Duração (s)	Veículo	CPZ 1,0 nmol	CPZ 3,0 nmol
Escalada (HD)	3,3 \pm 2,0	4,6 \pm 2,7	18,9 \pm 7,3
Escalada (HV)	23,6 \pm 13,6	15,0 \pm 2,9	5,7 \pm 1,4 *
Mergulho (HD)	2,0 \pm 2,0	10,4 \pm 5,3	1,0 \pm 1,0
Mergulho (HV)	6,8 \pm 5,8	2,8 \pm 2,8	4,1 \pm 1,4

Legenda: HD = hipocampo dorsal; HV = hipocampo ventral (ANOVA de duas vias seguida pelo teste *post-hoc* de Duncan, * $p < 0,05$).

4.2.2 Análise minuto a minuto dos grupos que receberam veículo ou a maior dose de capsazepina no HD ou no HV

A análise minuto a minuto demonstrou um aumento da imobilidade e uma diminuição do nado ao longo da sessão de teste quando a capsazepina foi injetada no HD de ratos submetidos ao teste do nado forçado.

A Figura 10 demonstra o perfil comportamental dos animais que receberam a maior dose de CPZ (3,0 nmol), analisados ao longo dos 5 minutos da sessão de teste. A análise de variância (ANOVA) de duas vias com medidas repetidas demonstrou um efeito significativo do tratamento para a duração da imobilidade ($F_{1,13}=9,24$, $p=0,01$; fig. 10A) e do nado ($F_{1,13}=12,09$, $p=0,004$; fig. 10C) quando administrado no HD. O teste *post hoc* de Duncan demonstrou que a CPZ foi capaz de aumentar a imobilidade e diminuir o nado de maneira significativa no último minuto do teste ($p < 0,05$). De fato, a repetição também gerou um efeito significativo ($F_{4,52}=4,38$, $p=0,004$ e $F_{4,52}=2,90$, $p=0,03$ para imobilidade e nado, respectivamente). O teste *post hoc* de Duncan demonstrou que a duração da imobilidade no minuto 5 foi significativamente maior ($p < 0,05$) do que nos minutos anteriores quando a droga foi injetada no HD (fig. 10A), indicando um aumento da duração deste parâmetro ao longo do teste. Da mesma forma, a duração do nado no minuto 5 diferiu significativamente dos minutos 2-4 ($p < 0,05$, fig. 10C). Não houve interações significativas para a imobilidade ($F_{4,52}=2,40$, $p=0,06$) e para o nado ($F_{4,52}=0,88$, $p=0,48$).

Quando a droga foi injetada no HV, não observou-se alterações significativas causadas pela interação ($F_{4,44}=0,18$, $p=0,95$ e $F_{4,44}=0,47$, $p=0,76$), tratamento ($F_{1,11}=0,89$, $p=0,37$ e $F_{1,11}=0,001$, $p=0,98$) ou repetição ($F_{4,44}=0,83$, $p=0,51$ e $F_{4,44}=2,05$, $p=0,10$) para a duração da imobilidade (fig. 10B) e nado (fig. 10D), respectivamente.

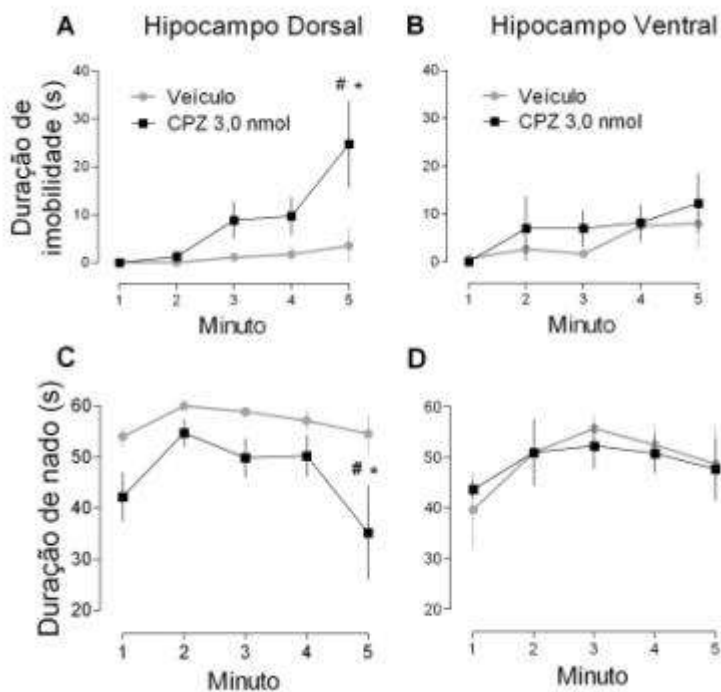


Figura 10. Análise minuto-a-minuto da sessão de teste dos grupos que receberam a maior dose de capsazepina, 3,0 nmol. Os pontos representam a média \pm EPM. Os asteriscos indicam uma diferença significativa (* $p<0,05$) entre-grupos e as cerquilhas indicam uma diferença significativa (# $p<0,05$) intra-grupo (ANOVA de duas vias com medidas repetidas seguida pelo teste *post-hoc* de Duncan).

A figura 11 demonstra os parâmetros duração de escalada e duração de mergulho. Houve uma interação significativa para a duração da escalada quando a droga foi injetada no HD ($F_{4,52}=3,47$, $p=0,01$; fig. 11A). O teste *post hoc* de Duncan demonstrou que esta diferença ocorreu no primeiro minuto do grupo tratado com relação ao controle ($p<0,05$). Da mesma forma, a repetição também causou uma diferença significativa ($F_{4,52}=9,36$, $p=0,00001$). O teste *post hoc* de Duncan indicou um aumento do tempo de escalada no primeiro minuto, em relação aos minutos seguintes, do grupo tratado com CPZ ($p<0,05$), evidenciando a ocorrência dos comportamentos ativos no início da sessão. O fator tratamento não causou diferenças significativas neste parâmetro comportamental ($F_{1,13}=3,34$, $p=0,09$). Ainda nesta região cerebral, não foram observadas diferenças estatísticas para a duração do mergulho, causadas pela interação ($F_{4,52}=1,42$, $p=0,24$), pelo tratamento ($F_{1,13}=0,52$, $p=0,48$) ou pela repetição ($F_{4,52}=0,71$, $p=0,59$).

A Figura 11B mostra a avaliação minuto a minuto do parâmetro escalada no HV. Houve um efeito significativo da repetição ($F_{4,44}=8,06$, $p=0,00006$), mas não da interação ($F_{4,44}=2,44$, $p=0,06$) ou do tratamento ($F_{1,11}=4,27$, $p=0,06$). O teste *post hoc* de Duncan demonstrou que o primeiro minuto do grupo controle foi significativamente maior que os demais minutos da sessão ($p<0,05$).

Da mesma forma, não foram observadas diferenças significativas para a duração do mergulho nesta região cerebral (fig. 11D), causadas pela interação ($F_{4,44}=1,81$, $p=0,14$), pelo tratamento ($F_{1,11}=0,40$, $p=0,54$) ou pela repetição ($F_{4,44}=0,39$, $p=0,82$).

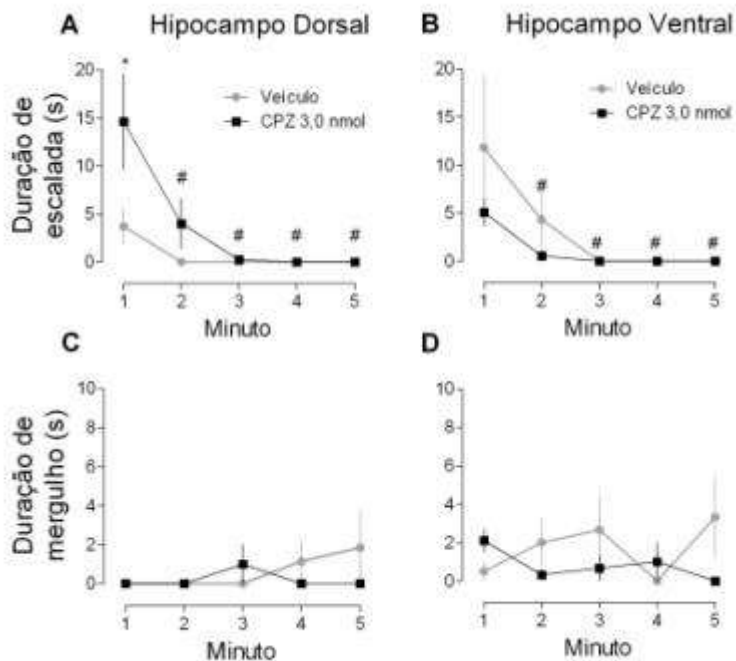


Figura 11. Análise minuto-a-minuto da sessão de teste dos grupos que receberam a maior dose de capsazepina, 3,0 nmol. Os pontos representam a média \pm EPM. Os asteriscos indicam uma diferença significativa (* $p < 0,05$) entre-grupos e as cerquilhas indicam uma diferença significativa (# $p < 0,05$) intra-grupo (ANOVA de duas vias com medidas repetidas seguida pelo teste *post-hoc* de Duncan).

4.2.3 Avaliação da frequência de escalada

De maneira importante, como mostra a Figura 12, não houve alteração na frequência de escalada causadas pela interação ($F_{2,35}=2,92$, $p=0,07$), pelo tratamento ($F_{2,35}=0,01$, $p=0,99$) ou pelo local de infusão ($F_{2,35}=2,69$, $p=0,11$), sugerindo que não houve uma alteração na atividade locomotora dos animais (LINO-DE-OLIVEIRA; DE LIMA; CAROBREZ, 2005; VIEIRA et al., 2008).

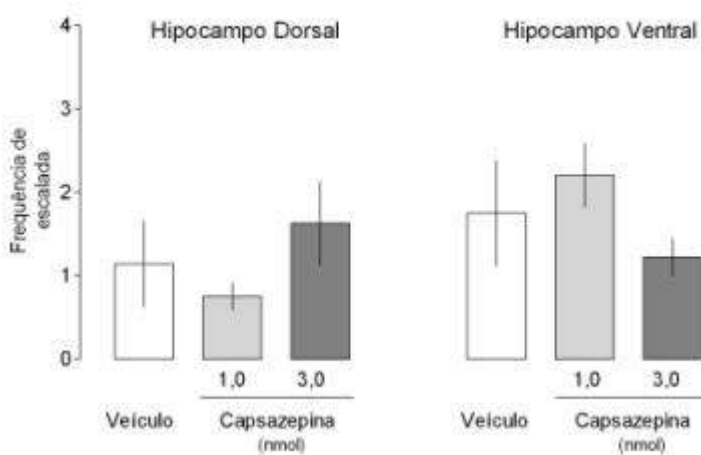


Figura 12. Frequência de escalada. As barras verticais representam a média \pm EPM (ANOVA de duas vias).

4.3 Experimento 3. Efeito do bloqueio de canais TRPV1 pelo antagonista seletivo SB-366791 (SB) no HD ou no HV de ratos expostos ao teste do nado forçado

Para substanciar o efeito do bloqueio dos canais TRPV1 hipocampais, um antagonista mais seletivo e potente foi utilizado. 82 ratos foram alocados em oito grupos ($n = 8-15$ /grupo), com base no tratamento (veículo, SB 0,1 nmol, SB 1,0 nmol ou SB 3,0 nmol) e local de infusão (HD ou HV). As infusões foram realizadas 10 minutos antes da sessão de teste, de acordo com o protocolo demonstrado na Figura 8.

4.3.1 Parâmetros comportamentais avaliados após o bloqueio de canais TRPV1 por meio da infusão de SB-366791 no HD ou no HV

O bloqueio de canais TRPV1 por meio da infusão de SB-366791 no HD ou no HV antes da sessão de teste potencializou o comportamento de imobilidade e diminuiu o comportamento de nado de ratos submetidos ao teste do nado forçado.

Houve uma interação significativa para a duração da imobilidade ($F_{3,68}=6,29$, $p=0,0008$), além de ter ocorrido um efeito significativo do tratamento ($F_{3,68}=3,40$, $p=0,02$) e do local de infusão ($F_{1,68}=8,20$, $p=0,01$) para este parâmetro comportamental (fig. 13A). Da mesma forma, houve uma interação significativa para a duração do nado ($F_{3,68}=8,43$, $p=0,00008$), além do efeito do tratamento ($F_{3,68}=5,65$, $p=0,002$) e do local de infusão ($F_{1,68}=7,04$, $p=0,01$; fig. 13B). O teste *post-hoc* de Duncan revelou que a duração da imobilidade foi maior para os grupos que receberam SB 1,0 nmol no HD ($p<0,05$) e 3,0 nmol no HV ($p<0,05$), quando comparados com seus respectivos controles. Da mesma forma, as doses de 1,0 nmol e 3,0 nmol de SB diminuíram a duração de nado no HD ($p<0,05$) e HV ($p<0,001$). Não foram observadas interações significativas para a duração da escalada ($F_{3,68}=0,89$, $p=0,45$) e duração do mergulho ($F_{3,68}=0,69$, $p=0,56$; Tabela 2).

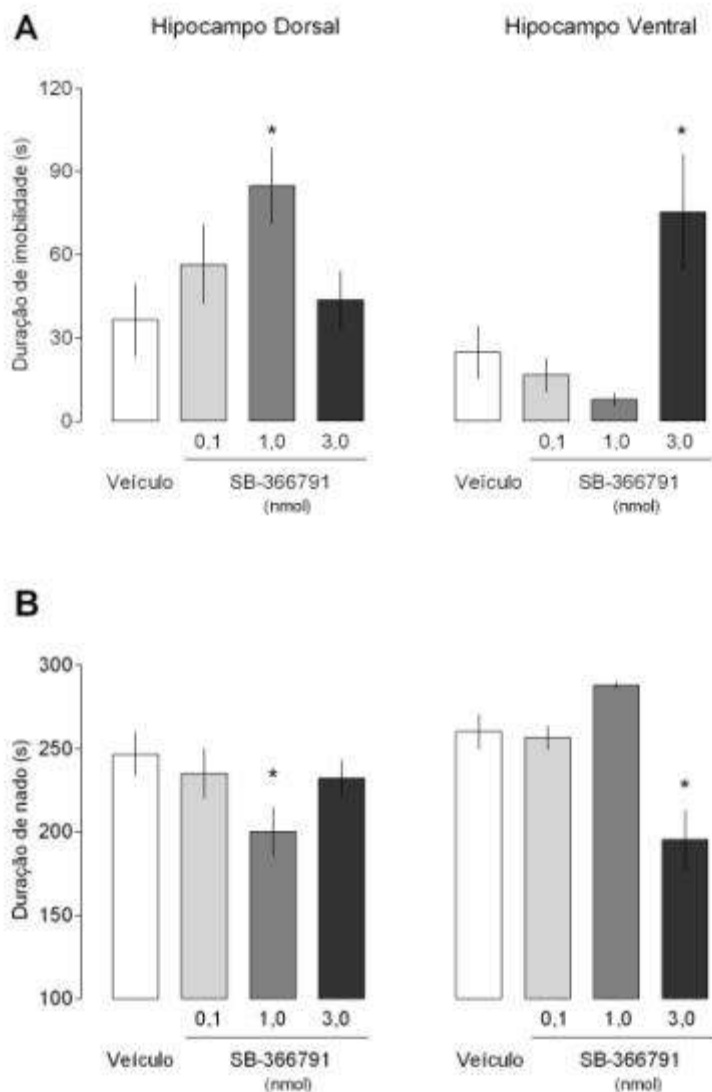


Figura 13. Infusão bilateral de SB-366791 nas doses de 0,1, 1,0 ou 3,0 nmol no hipocampo dorsal ou no hipocampo ventral de ratos submetidos ao teste do nado forçado. As barras verticais representam a média \pm EPM. Os asteriscos indicam uma diferença significativa (* $p < 0,05$) em relação aos respectivos controles (ANOVA de duas vias seguida pelo teste *post-hoc* de Duncan).

Tabela 2. Duração dos comportamentos de escalada e mergulho mensurados na sessão de teste. Os dados estão representados como média \pm EPM.

Duração (s)	Veículo	SB 0,1 nmol	SB 1,0 nmol	SB 3,0 nmol
Escalada (HD)	3,9 \pm 1,6	1,6 \pm 1,2	3,3 \pm 1,4	14,9 \pm 9,1
Escalada (HV)	7,6 \pm 2,4	18,3 \pm 8,8	1,4 \pm 0,9	22,5 \pm 8,4
Mergulho (HD)	10,1 \pm 3,9	6,6 \pm 4,0	10,2 \pm 4,0	6,0 \pm 1,7
Mergulho (HV)	3,8 \pm 1,7	4,9 \pm 2,2	0,3 \pm 0,3	2,4 \pm 1,4

Legenda: HD = hipocampo dorsal; HV = hipocampo ventral (ANOVA de duas vias).

4.3.2 Análise minuto a minuto dos grupos que receberam veículo ou a dose efetiva de SB-366791 no HD ou no HV

A análise minuto a minuto demonstrou um aumento da imobilidade e uma diminuição do nado ao longo da sessão de teste quando o SB-366791 foi injetado no HD ou no HV de ratos submetidos ao teste do nado forçado.

A Figura 14 demonstra o perfil comportamental dos animais que receberam a dose efetiva de SB (1,0 nmol no HD e 3,0 nmol no HV) e foram analisados ao longo dos 5 minutos da sessão de teste. A análise de variância (ANOVA) de duas vias com medidas repetidas demonstrou que o tratamento aumentou significativamente a duração da imobilidade no HD ($F_{1,19}=8,74$, $p=0,01$; fig. 14A). É possível observar que houve diferenças ao longo do tempo ($F_{4,76}=6,57$, $p=0,0001$), no entanto, não houve efeito da interação entre os fatores ($F_{4,76}=2,18$, $p=0,08$). Ocorreu também um efeito da interação para a duração do nado nesta região ($F_{4,76}=2,71$, $p=0,04$; fig. 14C), além de um efeito do tratamento ($F_{1,19}=7,78$, $p=0,01$). A repetição ($F_{4,76}=2,07$, $p=0,09$) não foi significativa. O teste *post-hoc* de Duncan demonstrou um aumento da duração de imobilidade no HD com a dose de 1,0 nmol a partir do minuto 3 ($p<0,05$), e da mesma forma, houve uma diminuição no tempo de nado também a partir do minuto 3 ($p<0,05$).

No HV, houve uma interação significativa ($F_{4,80}=3,29$, $p=0,01$) para a duração da imobilidade (fig. 14B). O tratamento foi capaz de aumentar significativamente este parâmetro ($F_{1,20}=7,16$, $p=0,01$), e este

efeito foi significativo ao longo do tempo ($F_{4,80}=4,82$, $p=0,001$). Em relação a duração do nado, observou-se um efeito do tratamento ($F_{1,20}=15,25$, $p=0,001$), mas não da repetição ($F_{4,80}=0,73$, $p=0,57$) ou da interação ($F_{4,80}=2,07$, $p=0,09$; fig. 14D). O teste *post-hoc* de Duncan demonstrou um aumento da duração de imobilidade no HD com a dose de 3,0 nmol a partir do minuto 3 ($p<0,05$), e da mesma forma, houve uma diminuição no tempo de nado também a partir do minuto 3 ($p<0,05$).

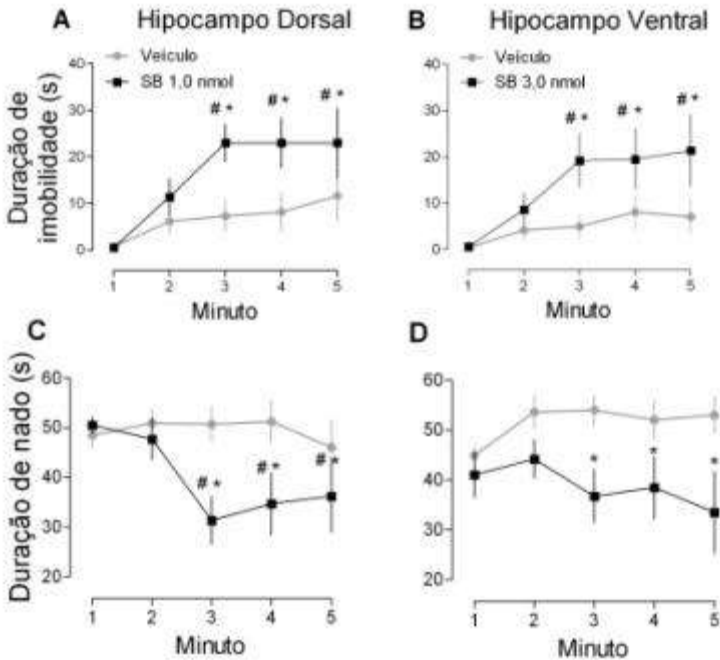


Figura 14. Análise minuto-a-minuto da sessão de teste dos grupos que receberam a dose efetiva de SB-366791: 1,0 nmol no hipocampo dorsal e 3,0 nmol no hipocampo ventral. Os pontos representam a média \pm EPM. Os asteriscos indicam uma diferença significativa ($* p<0,05$) entre-grupos e as cerquilhas indicam uma diferença significativa ($\# p<0,05$) intra-grupo (ANOVA de duas vias com medidas repetidas seguida pelo teste *post-hoc* de Duncan).

A figura 15 demonstra os parâmetros duração de escalada e duração de mergulho. Observou-se um efeito da repetição para a duração da escalada quando a droga foi injetada no HD ($F_{4,76}=4,06$, $p=0,005$; fig. 15A), mas não da interação ($F_{4,76}=0,22$, $p=0,92$) ou do tratamento ($F_{1,19}=0,22$, $p=0,64$). O teste *post hoc* de Duncan demonstrou que esta diferença ocorreu nos três últimos minutos do teste com relação ao primeiro no grupo controle ($p<0,05$), evidenciando a ocorrência dos comportamentos ativos no início da sessão. Não se observou diferença significativa para a duração do mergulho, para os fatores interação ($F_{4,76}=0,80$, $p=0,53$), tratamento ($F_{1,19}=0,12$, $p=0,73$) ou repetição ($F_{4,76}=0,54$, $p=0,70$). Já a Figura 15B mostra a avaliação minuto a minuto do parâmetro escalada no HV. Houve um efeito significativo da repetição ($F_{4,80}=9,46$, $p=0,00001$), mas não da interação ($F_{4,80}=0,68$, $p=0,61$) ou do tratamento ($F_{1,20}=2,53$, $p=0,13$). O teste *post-hoc* de Duncan demonstrou que o primeiro minuto apresentou uma duração de escalada significativamente maior ($p<0,05$) com relação aos minutos seguintes intra-grupo, nos dois grupos. Não foram observadas diferenças significativas para a duração do mergulho nesta região cerebral (fig. 15D), causadas pela interação ($F_{4,80}=0,25$, $p=0,91$), pelo tratamento ($F_{1,20}=0,19$, $p=0,66$) ou pela repetição ($F_{4,80}=1,76$, $p=0,14$).

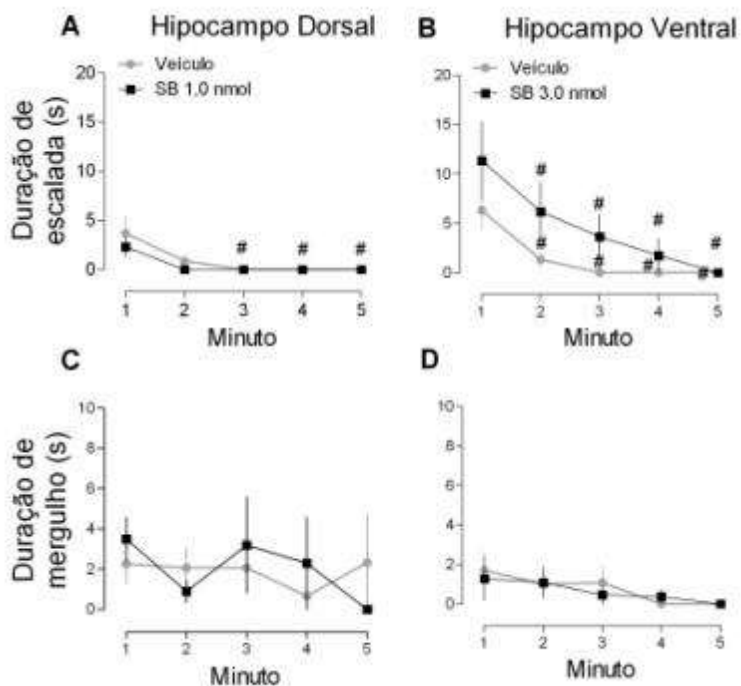


Figura 15. Análise minuto-a-minuto da sessão de teste dos grupos que receberam a dose efetiva de SB-366791: 1,0 nmol no hipocampo dorsal e 3,0 nmol no hipocampo ventral. Os pontos representam a média \pm EPM. Os asteriscos indicam uma diferença significativa (* $p < 0,05$) entre-grupos e as cerquilhas indicam uma diferença significativa (# $p < 0,05$) intra-grupo (ANOVA de duas vias com medidas repetidas seguida pelo teste post-hoc de Duncan).

4.3.3 Avaliação da frequência de escalada

De acordo com a Figura 16, não houve alteração na frequência de escalada causadas pela interação ($F_{3,68}=1,66$, $p=0,18$), pelo tratamento ($F_{3,68}=1,09$, $p=0,35$) ou pelo local de infusão ($F_{3,68}=3,93$, $p=0,051$), sugerindo que não houve uma alteração na atividade locomotora.

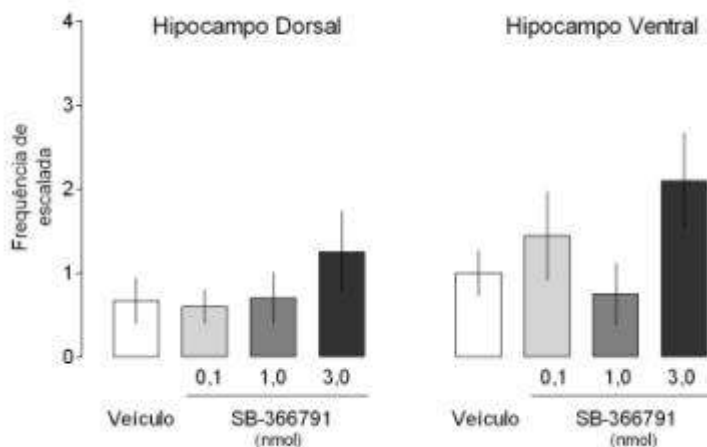


Figura 16. Frequência de escalada. As barras verticais representam a média \pm EPM (ANOVA de duas vias).

4.4 Experimento 4. Efeito da inativação do HD ou no HV em animais expostos ao teste do nado forçado.

A fim de avaliar a contribuição do HD e do HV na modulação de comportamentos vistos no teste do nado forçado, os animais foram aleatoriamente alocados em seis grupos ($n=7-10$ /grupo), e receberam veículo, muscimol 4,0 ou 8,0 nmol (CORCORAN et al., 2005) no HD ou no HV (0,2 μ l/hemisfério). O experimento foi realizado conforme protocolo experimental demonstrado na Figura 8.

4.4.1 Parâmetros comportamentais avaliados após a inativação temporária do HD ou do HV por meio da infusão de muscimol

A inativação do HD e HV induzida pela infusão de muscimol antes da sessão de teste não alterou os parâmetros comportamentais de ratos expostos ao teste do nado forçado.

A Figura 17 mostra a duração da imobilidade (A) e nado (B) de animais que receberam muscimol no HD ou HV. Para a imobilidade (fig. 17A), não houve efeito da interação ($F_{2,40}=0,15$, $p=0,86$), do tratamento ($F_{2,40}=0,30$, $p=0,74$) ou do local de infusão ($F_{1,40}=1,16$, $p=0,29$). O mesmo é observado para a duração do nado (fig. 17B): não houve interação entre os fatores ($F_{2,40}=0,26$, $p=0,78$), efeito do tratamento ($F_{2,40}=0,36$, $p=0,70$) ou do local de infusão ($F_{1,40}=1,41$, $p=0,24$).

Na Tabela 1 estão expressos os resultados para escalada e mergulho. Para a escalada, não houve efeito da interação ($F_{2,40}=0,36$, $p=0,70$), do tratamento ($F_{2,40}=0,93$, $p=0,40$) ou do local de infusão ($F_{1,40}=1,37$, $p=0,71$). Da mesma forma, não houve interação ($F_{2,40}=0,19$, $p=0,82$), efeito do tratamento ($F_{2,40}=1,48$, $p=0,24$) ou do local de infusão ($F_{1,40}=1,08$, $p=0,31$) para a duração do mergulho.

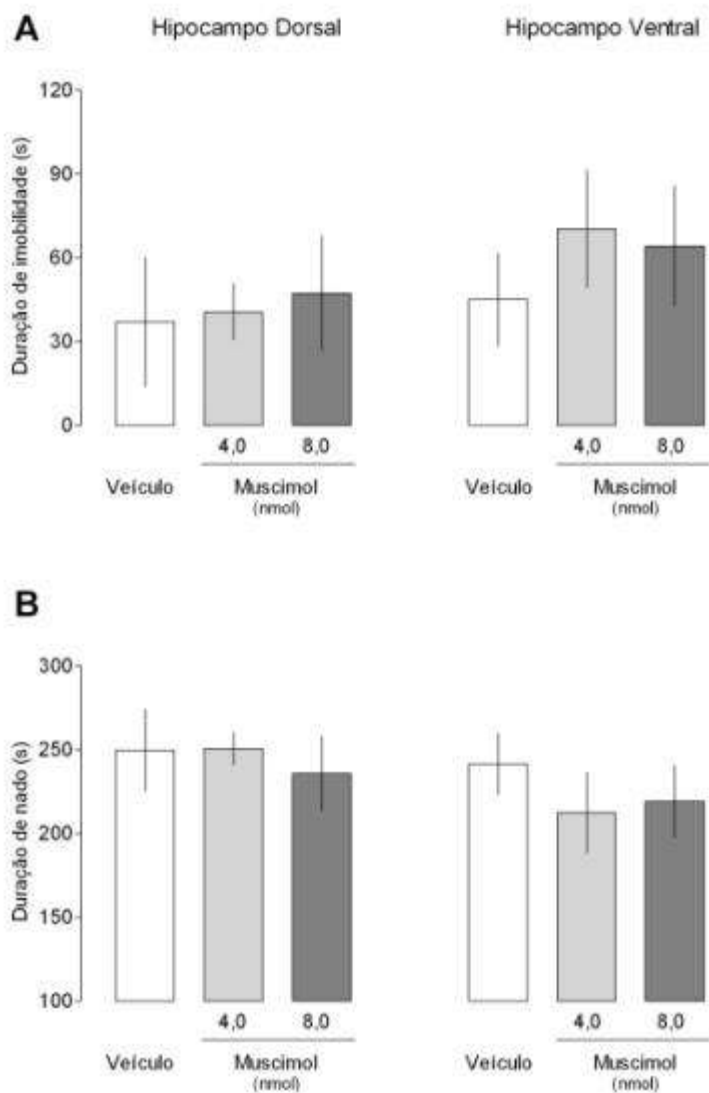


Figura 17. Infusão bilateral de muscimol nas doses de 4,0 ou 8,0 nmol no hipocampo dorsal ou no hipocampo ventral de ratos submetidos ao teste do nado forçado. As barras verticais representam a média \pm EPM (ANOVA de duas vias).

Tabela 3. Duração dos comportamentos de escalada e mergulho mensurados na sessão de teste. Os dados estão representados como média + EPM.

Duração (s)	Veículo	MUSC 4,0 nmol	MUSC 8,0 nmol
Escalada (HD)	3,9 ± 1,6	5,6 ± 1,1	8,7 ± 4,6
Escalada (HV)	6,9 ± 2,1	10,0 ± 4,8	9,4 ± 3,2
Mergulho (HD)	10,1 ± 3,9	0,3 ± 0,3	1,9 ± 1,1
Mergulho (HV)	4,9 ± 2,0	2,6 ± 2,0	2,1 ± 2,2

Legenda: HD = hipocampo dorsal; HV = hipocampo ventral (ANOVA de duas vias).

4.4.2 Análise minuto a minuto dos grupos que receberam veículo ou a maior dose de muscimol no HD ou no HV

A análise minuto a minuto não demonstrou diferenças comportamentais ao longo da sessão de teste quando o muscimol foi injetado no HD ou no HV de ratos submetidos ao teste do nado forçado.

A análise minuto-a-minuto foi realizada através da ANOVA de duas vias com medidas repetidas. Para o parâmetro imobilidade, expresso na Figura 18A, houve um efeito da repetição ($F_{4,56}=3,65$, $p=0,01$), mas não da interação ($F_{4,56}=0,46$, $p=0,77$) ou do tratamento ($F_{1,14}=0,004$, $p=0,95$). O teste *post hoc* de Duncan demonstrou que houve uma diferença significativa entre o último minuto do grupo tratado em relação ao primeiro minuto do mesmo grupo. Para o nado, não foi observado efeito significativo da interação ($F_{4,56}=0,48$, $p=0,75$), do tratamento ($F_{1,14}=1,90$, $p=0,19$) ou da repetição ($F_{4,56}=1,94$, $p=0,12$). Da mesma forma, houve um efeito significativo da repetição para a imobilidade no HV ($F_{4,52}=3,65$, $p=0,01$; fig. 18B), mas não da interação ($F_{4,52}=0,31$, $p=0,87$) ou do tratamento ($F_{1,13}=0,43$, $p=0,52$). O teste *post hoc* de Duncan demonstrou que houve uma diferença significativa entre o último minuto do grupo tratado em relação ao primeiro minuto do mesmo grupo. Não observou-se efeito significativo da interação ($F_{4,52}=0,23$, $p=0,92$), do tratamento ($F_{1,13}=0,49$, $p=0,49$) ou da repetição ($F_{4,52}=1,07$, $p=0,38$) para a duração do nado.

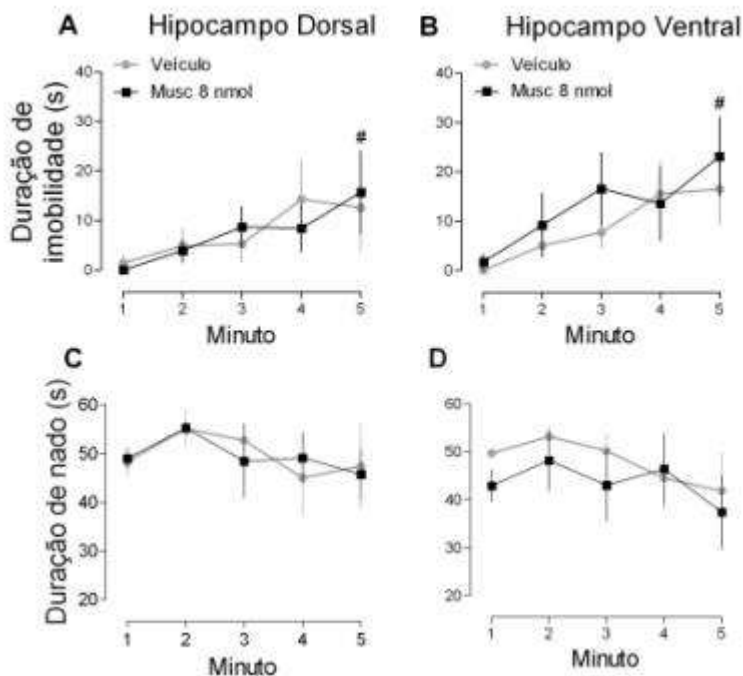


Figura 18. Análise minuto-a-minuto da sessão de teste dos grupos que receberam a maior dose de muscimol, 8,0 nmol. Os pontos representam a média \pm EPM. As cerquilhas indicam uma diferença significativa (# $p < 0,05$) intra-grupo (ANOVA de duas vias com medidas repetidas seguida pelo teste post-hoc de Duncan).

Além disso, a Figura 19 apresenta os resultados dos parâmetros duração de escalada e duração do mergulho. Para a escalada, observou-se um efeito significativo da repetição ($F_{4,56}=4,69$, $p=0,75$) no HD, sem a ocorrência de efeitos da interação ($F_{4,56}=0,55$, $p=0,70$) ou do tratamento ($F_{1,14}=0,06$, $p=0,81$; fig. 19A). O teste *post hoc* de Duncan demonstrou que os minutos 2-5 grupo tratado foram significativamente menores que o primeiro. Para o mergulho, não houve efeito significativo da interação ($F_{4,56}=0,48$, $p=0,75$), do tratamento ($F_{1,14}=1,79$, $p=0,20$) ou da repetição ($F_{4,56}=1,27$, $p=0,29$; fig. 19C). Já no HV, também houve um efeito da repetição para a escalada ($F_{4,52}=8,74$, $p=0,00002$), mas não

observou-se efeitos da interação ($F_{4,52}=2,02$, $p=0,11$) ou do tratamento ($F_{1,13}=3,19$, $p=0,10$; fig. 19B). Da mesma forma, não ocorreram efeitos significativos da interação ($F_{4,52}=1,54$, $p=0,20$), do tratamento ($F_{1,13}=1,17$, $p=0,30$) ou da repetição ($F_{4,52}=2,16$, $p=0,09$) para o mergulho nesta região (fig. 19D).

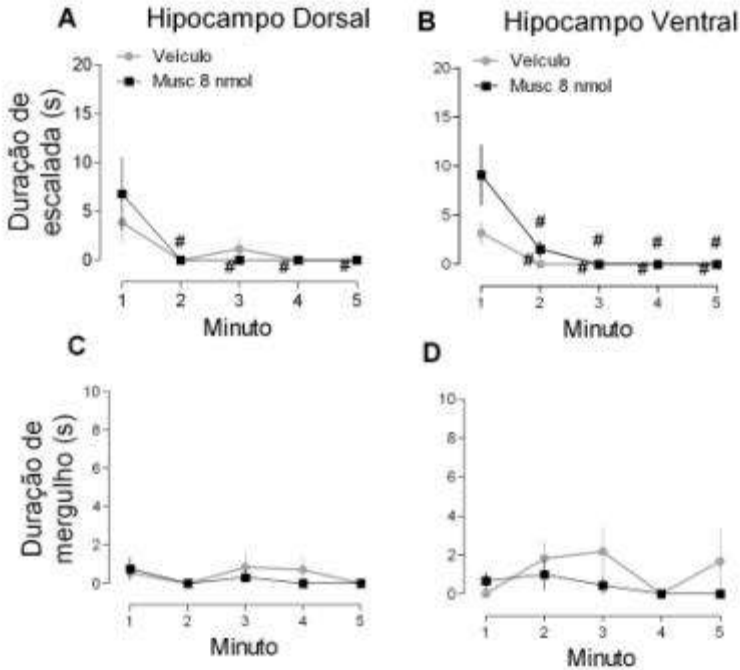


Figura 19. Análise minuto-a-minuto da sessão de teste dos grupos que receberam a maior dose de muscimol, 8,0 nmol. Os pontos representam a média \pm EPM. As cerquilhas indicam uma diferença significativa (# $p<0,05$) intra-grupo (ANOVA de duas vias com medidas repetidas seguida pelo teste post-hoc de Duncan).

4.4.3 Avaliação da frequência de escalada

Avaliação da frequência de escalada não indicou diferenças causadas pelo tratamento com muscimol.

Para controle da atividade locomotora, não se observou efeito significativo da interação ($F_{2, 40}=0,41$, $p=0,67$), do tratamento

($F_{2,40}=0,47$, $p=0,63$) ou do local de infusão ($F_{1,40}=0,19$, $p=0,67$) para a frequência de escalada, indicando a ausência de alteração locomotora (fig. 20).

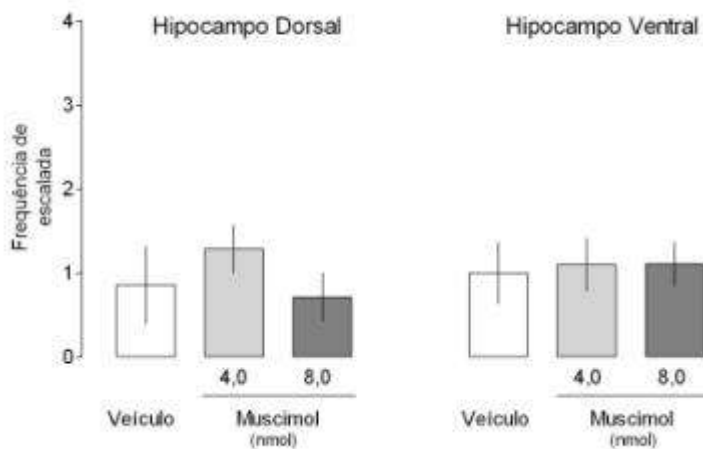


Figura 20. Frequência de escalada. As barras verticais representam a média \pm EPM (ANOVA de duas vias).

5 DISCUSSÃO

Os principais achados deste trabalho foram: (i) os canais TRPV1 estão expressos ao longo do eixo dorsoventral do hipocampo; (ii) a injeção de capsazepina, um antagonista TRPV1, não interferiu no tempo total dos comportamentos de ratos avaliados na sessão de teste; (iii) a injeção de SB-366791, um antagonista mais seletivo de TRPV1, aumentou a duração de imobilidade quando 1 nmol foi injetado no HD e 3 nmol foi injetado no HV. No entanto, por meio das análises minuto-a-minuto, constatou-se que (iv) a capsazepina aumentou o comportamento de imobilidade somente no quinto minuto do teste do nado forçado, enquanto que (v) a administração de SB-366791 causou este mesmo efeito a partir do terceiro minuto de teste. Curiosamente, (vi) a infusão de muscimol no HD ou no HV não modificou quaisquer parâmetros comportamentais avaliados. No entanto, (vii) a análise minuto a minuto não mostrou diferenças entre o grupo tratado e o controle, mas demonstrou um aumento na duração da imobilidade do grupo tratado no quinto minuto do teste. Em conjunto, estes resultados sugerem que o bloqueio dos TRPV1 no HD ou no HV, mas não a inativação temporária destas estruturas cerebrais, facilitou a expressão do comportamento de imobilidade de ratos submetidos ao teste do nado forçado.

Levando em consideração que a ativação de TRPV1 por ligantes exógenos pode causar efeitos hipolocomotores (DI MARZO et al., 2001), e que alterações na locomoção podem interferir na interpretação do fenótipo comportamental observado, a possibilidade de um déficit locomotor foi excluída por meio da avaliação da frequência da escalada, uma vez que os tratamentos não foram capazes de alterar este parâmetro comportamental.

Como já mencionado, a participação do sistema vanilóide na modulação de comportamentos avaliados no teste do nado forçado ainda não é bem compreendida, no entanto, algumas evidências demonstram que a ativação dos TRPV1 diminui o tempo de imobilidade (KIM et al., 1997, KIM et al., 1998, HAYASE, 2011). Estes dados concordam com os resultados do presente estudo e sugerem a participação dos TRPV1 na modulação do comportamento de imobilidade de animais submetidos ao teste do nado forçado. Contudo, nestes estudos, não foram utilizados antagonistas mais seletivos para TRPV1, ou tampouco foi investigada a circuitaria cerebral envolvida no efeito destas drogas. Além disso, já se sabe também que os TRPV1 são capazes de influenciar em respostas relacionadas ao estresse, que é um dos mais importantes fatores envolvidos na etiologia da depressão (NESTLER et al., 2002a). O

estresse induz alterações na plasticidade sináptica que ocorre no hipocampo – processos também relacionados com a depressão – interferindo com processos de LTP e LTD hipocampal (NORMANN et al., 2007). Estudos demonstram que a capsaicina e a RTX facilitam os processos de LTP hipocampais e inibem processos de LTD, um efeito contrário ao de um estresse agudo (LI et al., 2008) e semelhante ao de antidepressivos (NORMANN et al., 2007).

No entanto, um estudo mais recente demonstrou que camundongos *knock-out* para TRPV1 apresentaram baixas latências para alcançar o alimento no teste de alimentação suprimida pela novidade (*novelty-suppressed feeding test*) e um menor tempo de imobilidade no teste do nado forçado, quando comparados com as cepas selvagens. Nos dois casos, os camundongos nocaute se comportaram como se tivessem sido tratados com antidepressivos. Além disso, estes animais apresentaram alterações na expressão de receptores 5-HT_{1A}, GABA_A e NMDA em algumas regiões cerebrais, que poderiam explicar o efeito de diminuição da imobilidade (YOU et al., 2011). Assim, alterações nas neurotransmissões serotoninérgica, GABAérgica e glutamatérgica também poderiam explicar as alterações comportamentais na cepa nocaute, além de sugerir uma relação funcional entre os TRPV1 e estas neurotransmissões.

A ativação dos TRPV1 induz a liberação de glutamato em diversas regiões cerebrais (MARINELLI et al., 2002; PALAZZO et al., 2002; MARINELLI et al., 2003; LI; CHEN; PAN, 2004; STAROWICZ et al., 2007; XING; LI, 2007; MUSELLA et al., 2009). Embora a natureza precisa da relação entre a transmissão glutamatérgica e a sintomatologia depressiva ainda não esteja claramente elucidada (SANACORA et al., 2008), existem evidências de que o sistema glutamatérgico exerce um papel na neurobiologia e tratamento deste transtorno (SWANSON et al., 2005; SANACORA et al., 2008; SEN; SANACORA, 2008; HASHIMOTO, 2011; SANACORA; TRECCANI; POPOLI, 2012). A hipótese glutamatérgica da depressão surgiu nos anos 1990, quando um trabalho demonstrou que antagonistas de receptores NMDA apresentavam uma ação semelhante à dos antidepressivos (para revisão, ver SANACORA; TRECCANI; POPOLI, 2012). Foi observado que o tratamento agudo ou crônico com antagonistas NMDA promove efeitos antidepressivos (TRULLAS; SKOLNICK, 1990; SKOLNICK, 1999; YILMAZ et al., 2002 LI et al., 2010). Outro elegante estudo publicado em 2011 demonstrou que a administração sistêmica de quetamina, um antagonista de receptores NMDA, foi capaz de produzir respostas antidepressivas rápidas e

duradouras. Estas respostas ocorreram devido a uma rápida síntese de BDNF por meio da redução da fosforilação de eEF2 (do inglês *eukaryotic elongation factor 2*) com consequente alteração na translação¹ do BDNF mediada pelo bloqueio NMDA (AUTRY et al., 2011). Em um estudo feito em 2004, a administração intra-hipocampo dorsal de AP-7, outro antagonista de receptores NMDA, imediatamente após a exposição ao pré-teste do nado forçado, reduziu a imobilidade na sessão de teste, mas não teve efeito quando administrado antes do teste ou em animais não submetidos ao pré-teste (não estressados) (PADOVAN; GUIMARÃES, 2004). Assim, parece que a inibição da neurotransmissão glutamatérgica no hipocampo dorsal reduziria as consequências comportamentais do estresse prévio, mas não afetaria o comportamento inato do animal frente a uma situação estressante neste teste comportamental.

Relatos da literatura apontam que o bloqueio dos TRPV1 através de micro injeções de antagonista na matéria cinzenta periaquedutal (PAG) resulta na diminuição da liberação de glutamato nesta região cerebral (STAROWICZ et al., 2007). Se isso ocorresse também no hipocampo, poderíamos esperar uma diminuição da transmissão glutamatérgica no momento do teste e, conseqüentemente, nenhum efeito comportamental, ou até mesmo, uma diminuição do tempo de imobilidade. No entanto, no presente estudo, o bloqueio farmacológico dos canais TRPV1 no HD ou no HV antes da sessão teste resultou em um aumento do tempo de imobilidade. Pode-se, assim, supor que o efeito dos antagonistas TRPV1 não seja mediado pela redução da neurotransmissão glutamatérgica hipocampal. Além disso, diferenças metodológicas, regime de administração de drogas e espécies animais utilizadas também devem ser levados em consideração. Ou ainda, não necessariamente o bloqueio de canais TRPV1 replicaria alterações moleculares que ocorrem com o bloqueio de receptores NMDA.

Neste contexto, é interessante avaliar se a interferência com os TRPV1 poderia afetar a liberação de GABA ou catecolaminas, facilitando o aparecimento do comportamento de imobilidade. A facilitação da neurotransmissão GABAérgica, por exemplo, parece

¹ Na biologia molecular, a translação é um dos processos da biossíntese de proteínas. A sequência de bases nucleotídicas é primeiro transferida de um DNA para o RNA mensageiro, no processo de transcrição. Então, a sequência das bases do RNA mensageiro é decodificada para produzir uma cadeia específica de aminoácidos, no processo denominado translação (PASSARGE, 2001).

favorecer a imobilidade: alguns estudos demonstraram que drogas com perfil ansiolítico, como diazepam e flurazepam injetadas via i.p., aumentaram o tempo de imobilidade de animais submetidos ao teste do nado forçado sem alterar o relaxamento muscular (NAGATANI; SUGIHARA; KODAIRA, 1984; NAGATANI et al., 1987). Outro estudo demonstrou que pequenas doses de agonistas GABAérgicos, como GABA, muscimol e baclofeno, injetadas via i.p., diminuíram a duração de imobilidade, enquanto altas doses aumentaram (ALEY; KULKARNI, 1989). De fato, um trabalho com imunohistoquímica demonstrou que neurônios que expressam TRPV1 são glutamatérgicos, no entanto, são envolvidos tanto por terminais glutamatérgicos como por GABAérgicos. Assim, a ativação TRPV1 influencia a liberação de ambos os neurotransmissores, embora a liberação de GABA ocorra de maneira mais sutil (STAROWICZ et al., 2007). Por outro lado, a facilitação da neurotransmissão catecolaminérgica (serotoninérgica e/ou noradrenérgica) inibe a expressão do comportamento de imobilidade. A administração subcrônica e crônica de inibidores da recaptação de noradrenalina (IRN) e/ou serotonina (IRS) a ratos antes do teste do nado forçado diminui o tempo de imobilidade no teste (PORSOLT; LE PICHON; JALFRE, 1977; O'NEIL; MOORE, 2003; NESTLER; HYMAN, 2010). A diminuição da imobilidade promovida pelos IRN é acompanhada pelo aumento da duração da escalada, enquanto que a administração de IRS diminui a imobilidade e aumenta o nado (RÉNÉRIC; LUCKI, 1998; CRYAN; MARKOU; LUCKI, 2002; CRYAN; PAGE; LUCKI, 2005). O efeito de drogas que aumentam a neurotransmissão serotoninérgica no hipocampo dorsal também foi demonstrado em outro modelo utilizado para o estudo da depressão: a facilitação deste sistema de neurotransmissão media a adaptação a um estresse inescapável no protocolo do desamparo aprendido, provavelmente através da ativação dos receptores 5-HT(1A) (JOCA; PADOVAN; GUIMARAES, 2003). No presente trabalho, o aumento da imobilidade promovido pelos antagonistas TRPV1 foi acompanhado pela diminuição do tempo de nado, sugerindo que o bloqueio dos TRPV1 poderia estar diminuindo a neurotransmissão serotoninérgica hipocampal. Desta forma, o bloqueio dos TRPV1, ao diminuir a transmissão glutamatérgica, poderia favorecer a neurotransmissão GABAérgica, enquanto diminuiria a neurotransmissão serotoninérgica hipocampal, de forma a aumentar o tempo de imobilidade no teste do nado forçado.

Outro sistema intimamente relacionado com o vanilóide é o canabinóide, que também tem sido estudado no contexto dos transtornos

depressivos (MCLAUGHLIN et al., 2007; BEYER et al., 2010; GORZALKA; HILL, 2011). Ao contrário do observado com antagonistas TRPV1 no presente estudo, verificou-se que a administração aguda e sistêmica de rimonabanto, um antagonista de receptores CB1, diminuiu o tempo de imobilidade de animais submetidos ao teste do nado forçado, e que este efeito pode ter ocorrido devido a um aumento do efluxo de dopamina e acetilcolina no córtex pré-frontal (TZAVARA et al., 2003; LEE et al., 2009). Uma vez que os endocanabinóides atuam como sinalizadores retrógrados, regulando a atividade pré-sináptica e a liberação de neurotransmissores (ELPHICK; EGERTOVA, 2001; SCHLICKER; KATHMANN, 2001; LOVINGER, 2008), os efeitos do rimonabanto poderiam ser atribuídos à diferenças na modulação da neurotransmissão monoaminérgica mediada por endocanabinóides (TZAVARA et al., 2003). Sabe-se que os receptores canabinóides são acoplados à proteína G inibitória e, quando ativados, inibem a adenilato ciclase. Isto leva a uma diminuição no cálcio intracelular, resultando em uma diminuição da liberação de neurotransmissores como GABA e glutamato (KATONA et al., 1999; HÁJOS; LEDENT; FREUND, 2001; TAKAHASHI; CASTILLO, 2006), ao contrário dos TRPV1, que aumentam o influxo de cálcio. Sendo assim, estes dados concordam com os resultados do presente estudo; no entanto, quando a administração de rimonabanto foi crônica (durante 3 semanas) e sistêmica, o tempo de imobilidade dos animais submetidos ao nado forçado aumentou (BEYER et al., 2010). Este último estudo sugere que o aumento da imobilidade observado após o tratamento crônico com rimonabanto surge por consequência de alterações moleculares que surgem a longo prazo, tais como a diminuição da proliferação celular e dos níveis de BDNF em algumas regiões cerebrais. Ainda, outro trabalho demonstrou que o aumento da sinalização canabinóide por meio da administração subcrônica de um agonista CB1 no hipocampo dorsal desencadeou efeitos antidepressivos (MCLAUGHLIN et al., 2007). Se formos considerar esta hipótese, seria interessante avaliar se um tratamento subcrônico ou crônico com antagonistas vanilóides causaria um efeito oposto ao tratamento agudo.

O comportamento de imobilidade em roedores, assim como a depressão em humanos, é geralmente descrito como um transtorno relacionado ao estresse. Embora a predisposição genética possua uma carga importante, evidências indicam que os episódios depressivos geralmente ocorrem no contexto de algumas formas de estresse. Inclusive, muitos testes e modelos animais para estudo da depressão

envolvem a avaliação da resposta do animal frente ao estresse (NESTLER et al., 2002a).

O estresse pode afetar algumas formas de plasticidade estrutural que ocorrem no hipocampo, que é uma região especialmente envolvida em processos de plasticidade: o estresse crônico causa atrofia de dendritos na sub-região CA3 e, tanto um estresse crônico quanto um estresse agudo são capazes de suprimir a neurogênese que ocorre no giro denteado (MCEWEN, 1999). De fato, um estudo apontou que a submissão ao teste do nado forçado afeta aspectos da atividade e plasticidade hipocampal. É possível que essas alterações envolvam algumas das consequências comportamentais da experiência do estresse (YAROM; MAROUN; RICHTER-LEVIN, 2008).

É importante salientar que, nas análises minuto a minuto, o efeito de aumento da imobilidade por CPZ ocorreu apenas no último minuto, enquanto que em animais tratados com SB-366791, este efeito apareceu já no terceiro minuto do teste. Isso ocorreu provavelmente devido a diferença de seletividade das duas drogas (GUNTORPE et al., 2004). Isto nos permite evidenciar a importância dos canais TRPV1 na modulação deste comportamento, uma vez que o SB-366791, por ser mais seletivo para estes canais, causou um efeito mais pronunciado.

Alguns autores sugerem que o aumento da imobilidade observada no dia do teste pode ser um comportamento adaptativo frente à situação de estresse (DE PABLO et al., 1989). Uma outra hipótese a ser considerada é que o bloqueio dos TRPV1 facilitou este processo de adaptação. De fato, Marsch e colaboradores (2007) demonstraram que animais nocaute para TRPV1, quando submetidos ao teste claro-escuro para avaliação da ansiedade, apresentaram uma rápida adaptação ao compartimento claro. Este comportamento relacionado ao perfil ansiolítico tem sido demonstrado para antagonistas de TRPV1 no hipocampo ventral (SANTOS; STERN; BERTOGLIO, 2008).

O hipocampo é uma região cerebral crucial para o processamento da memória e aprendizado. No entanto, é crescente a investigação e interesse a respeito do papel desta região na modulação da emocionalidade (BANNERMAN et al., 2004). Bertoglio e colaboradores (2006) verificaram que a inativação do HV com lidocaína aumentou a exploração dos braços abertos no labirinto em cruz elevado, sugerindo que o HV modula comportamentos relacionados com a ansiedade enquanto Santos e colaboradores (2008) demonstraram que os canais TRPV1 presentes no HV estão envolvidos nestes processos.

O HD, por sua vez, está preferencialmente relacionado com a modulação de funções cognitivas e esse envolvimento com o

processamento de informações espaciais é consistente com a sua conectividade anatômica (BANNERMAN et al., 2004; FANSELOW; DONG, 2010), embora a modulação de processos relacionados com depressão também tenha sido sugerida para esta sub-região (RODRIGUEZ-LANDA; CONTRERAS; GARCIA-RIOS, 2009; GOELDNER et al., 2010; SIRIANNI et al., 2010).

Embora tenha sido observado o mesmo efeito de aumento do tempo de imobilidade frente ao tratamento com SB nas duas sub-regiões, a sensibilidade da resposta do HD e do HV se mostrou diferente: no HD, a dose de 1,0 nmol/lado foi capaz de aumentar significativamente o tempo de imobilidade, enquanto no HV, foi necessária uma dose maior (3,0 nmol/lado) para causar um efeito significativo em aumentar o tempo deste mesmo parâmetro. Essa diferença de sensibilidade pode ocorrer por serem sub-regiões que regulam aspectos diferenciados e apresentam conexões com outras diferentes regiões cerebrais. Além disso, a extensão das duas regiões é diferente: o HV é maior que o HD, e isso poderia explicar a diminuição da atividade da dose de 1,0 nmol nessa região. Uma hipótese é que a marcação para TRPV1 seja mais intensa no HD do que no HV, embora a análise imunohistoquímica qualitativa não seja suficiente para confirmar. Estudos adicionais são necessários para confirmar se existe alguma diferença quantitativa na expressão de TRPV1 nessas sub-regiões.

Além disso, a resposta observada para 1 nmol no HD foi suprimida quando se administrou 3 nmol de SB-366791. Neste contexto, é importante considerar o papel de endovanilóides, como a anandamida. Este composto se liga tanto em receptores CB1 quanto em TRPV1 (DI MARZO, 2010). Assim, o bloqueio dos TRPV1 com a maior dose de SB-366791 poderia favorecer à interação destes ligantes endógenos quase que exclusivamente em receptores CB1, resultando em uma perda no efeito.

Para analisar a função das estruturas cerebrais investigadas neste estudo de maneira geral, foi realizada uma inativação temporária com muscimol, um agonista de receptores GABA_A que produz inibição neuronal enquanto permite a condução axonal de maneira intacta (MCEOWN; TREIT, 2010). Esta inativação temporária das duas sub-regiões não gerou diferenças estatísticas significativas no tempo total dos parâmetros comportamentais avaliados, embora seja possível observar na análise minuto-a-minuto um aumento da imobilidade ao longo do tempo. Pode-se sugerir que a inativação hipocampal cause um prejuízo no controle do *feedback* negativo exercido por esta região no

eixo HPA. De fato, um papel inibitório para o hipocampo na regulação do eixo HPA é sugerido por estudos que demonstram que os danos hipocampais potencializam a secreção de glicocorticóide induzida pelo estresse e, ao contrário, a estimulação hipocampal resulta em uma atividade diminuída do eixo HPA (JACOBSON; SAPOLSKY, 1991; HERMAN et al., 1992; HERMAN; CULLINAN, 1997; NETTLES; PESOLD; GOLDMAN, 2000; TUVNES et al., 2003). Essa função é preferencialmente regulada pela porção ventral do hipocampo (BANNERMAN et al., 2004), embora existam relatos de uma modulação do eixo HPA pela camada CA3 da porção dorsal (ROOZENDAAL et al., 2001). Além disso, o controle inibitório da atividade do eixo HPA parece estar comprometido em pacientes deprimidos (JOCA; PADOVAN; GUIMARÃES, 2003; BERTON; NESTLER, 2006; PARIANTE; LIGHTMAN, 2008). Desta forma, poderia se esperar uma potencialização do comportamento de imobilidade por meio da inativação do hipocampo frente ao estresse do teste do nado forçado. Seria importante considerar um regime de administração sub crônico, ou avaliar o efeito da infusão do muscimol antes ou após o pré-teste, ainda considerando a possibilidade de utilizar um maior volume de infusão para inativar um maior número de células.

É importante comentar que processos mnemônicos podem estar envolvidos no teste do nado forçado. Fármacos administrados (i) antes do pré-teste podem interferir com a aquisição; (ii) após o pré-teste podem interferir com a consolidação; e (iii) antes do teste poderiam interferir com a evocação e/ou expressão. De fato, De Pablo e colaboradores (1989) sugeriram que os animais submetidos ao teste do nado forçado aprendem a ficar imóveis. Para confirmar essa hipótese, eles utilizaram anisomicina, um fármaco capaz de prejudicar os processos de aprendizado e memória. Neste trabalho, foi demonstrado que o aprendizado é o processo comportamental que envolve a diminuição de comportamentos ativos: a experiência prévia facilitou o comportamento de imobilidade na sessão de teste. Neste caso, a anisomicina atuou como um falso positivo no teste do nado forçado, aumentando a duração dos comportamentos ativos com relação ao grupo controle na sessão de teste, exercendo assim um efeito semelhante ao observado com antidepressivos (DE PABLO et al., 1989).

Os dados do presente estudo sugerem um envolvimento dos TRPV1 nas respostas de estresse observadas em animais submetidos ao nado forçado e, possivelmente, também com processos relacionados à depressão. No entanto, a inativação temporária destas sub-regiões não causou efeitos significativos. De certa forma, não necessariamente o

bloqueio de um sistema específico causaria efeitos semelhantes ao de uma inativação da estrutura, seja por ação sinérgica com outros sistemas transmissores ou até mesmo por mecanismos compensatórios. De maneira geral, estudos adicionais são necessários para elucidar os mecanismos envolvidos nestes processos.

6 CONCLUSÃO

- A expressão dos TRPV1 ao longo do eixo dorsoventral do hipocampo foi confirmada por meio do método imunohistoquímico, demonstrando a presença destes canais nas camadas CA1 – CA3 e giro denteado do hipocampo dorsal e do hipocampo ventral nos nossos animais experimentais;

- Os TRPV1 presentes tanto na porção dorsal como na porção ventral do hipocampo modulam o comportamento de imobilidade de ratos submetidos ao teste do nado forçado. De maneira geral, pode-se sugerir que estes canais exercem modulem a inibição comportamental, característica de respostas comportamentais ao estresse, embora esta hipótese precise ser confirmada com experimentos adicionais. Com efeito, a avaliação de um tratamento sub-crônico ou crônico com antagonistas TRPV1, associado à execução de modelos e testes adicionais para estudo da depressão (como o teste de anedonia ou o modelo do desamparo aprendido), poderiam subsidiar os presentes resultados;

- Considerando os efeitos anti-estresse promovidos pela ativação dos TRPV1 relatados na literatura, associados aos dados obtidos com a análise comportamental detalhada minuto a minuto, o presente estudo sugere que o antagonismo destes canais potencializou os efeitos prejudiciais de um estresse agudo;

- De maneira geral, tanto a porção dorsal quanto a ventral do hipocampo são susceptíveis à interferência exercida com o sistema vanilóide, embora isso tenha ocorrido em diferentes intensidades;

- Como esperado, a microinjeção intrahipocampal de SB-366791, um antagonista mais seletivo para TRPV1, apresentou um efeito mais notável do que a capsazepina em aumentar a duração da imobilidade dos animais submetidos ao teste do nado forçado, evidenciando a importância destes canais na modulação dos comportamentos observados. Este efeito foi melhor visualizado nas análises minuto a minuto;

- O antagonismo dos TRPV1 potencializou os efeitos de um estresse agudo, e este efeito ocorreu de maneira mais sensível no hipocampo dorsal;

- A inativação das porções dorsal e ventral do hipocampo com muscimol não causou nenhum efeito significativo no tempo total, embora tenha sido observado um aumento da imobilidade ao longo do tempo, na análise minuto a minuto;

- O antagonismo dos TRPV1 hipocampais aumentou o tempo de imobilidade, enquanto que a inativação temporária não causou efeitos significativos nos parâmetros comportamentais analisados. De maneira geral, não necessariamente a inativação temporária de uma região cerebral replicaria resultados observados com a interferência em um único sistema de neurotransmissão.

7 REFERÊNCIAS

AAN HET ROT, M; MATHEW, SJ; CHARNEY, DS. Neurobiological mechanisms in major depressive disorder. **CMAJ**, v.180, n.3, p.305-13. 2009.

ABEL, EL; BILITZKE, PJ. A possible alarm substance in the forced swimming test. **Physiol Behav**, v.48, n.2, p.233-9. 1990.

AGUIAR, DC; TERZIAN, AL; GUIMARAES, FS; MOREIRA, FA. Anxiolytic-like effects induced by blockade of transient receptor potential vanilloid type 1 (TRPV1) channels in the medial prefrontal cortex of rats. **Psychopharmacology (Berl)**, v.205, n.2, p.217-25. 2009.

ALEY, KO; KULKARNI, SK. GABA-mediated modification of despair behavior in mice. **Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol**, v.339, n.3, p.306-11. 1989.

AUTRY, AE; ADACHI, M; NOSYREVA, E; NA, ES; LOS, MF; CHENG, PF; KAVALALI, ET; MONTEGGIA, LM. NMDA receptor blockade at rest triggers rapid behavioural antidepressant responses. **Nature**, v.475, n.7354, p.91-5. 2011.

BANNERMAN, DM; DEACON, RM; OFFEN, S; FRISWELL, J; GRUBB, M; RAWLINS, JN. Double dissociation of function within the hippocampus: spatial memory and hyponeophagia. **Behav Neurosci**, v.116, n.5, p.884-901. 2002.

BANNERMAN, DM; GRUBB, M; DEACON, RM; YEE, BK; FELDON, J; RAWLINS, JN. Ventral hippocampal lesions affect anxiety but not spatial learning. **Behav Brain Res**, v.139, n.1-2, p.197-213. 2003.

BANNERMAN, DM; RAWLINS, JN; MCHUGH, SB; DEACON, RM; YEE, BK; BAST, T; ZHANG, WN; POTHUIZEN, HH; FELDON, J. Regional dissociations within the hippocampus - memory and anxiety. **Neurosci Biobehav Rev**, v.28, n.3, p.273-83. 2004.

BANNERMAN, DM; YEE, BK; GOOD, MA; HEUPEL, MJ; IVERSEN, SD; RAWLINS, JN. Double dissociation of function within

the hippocampus: a comparison of dorsal, ventral, and complete hippocampal cytotoxic lesions. **Behav Neurosci**, v.113, n.6, p.1170-88. 1999.

BARKUS, C; MCHUGH, SB; SPRENGEL, R; SEEBURG, PH; RAWLINS, JN; BANNERMAN, DM. Hippocampal NMDA receptors and anxiety: at the interface between cognition and emotion. **Eur J Pharmacol**, v.626, n.1, p.49-56. 2010.

BELMAKER, RH; AGAM, G. Major depressive disorder. **N Engl J Med**, v.358, n.1, p.55-68. 2008.

BERGINK, V; VAN MEGEN, HJ; WESTENBERG, HG. Glutamate and anxiety. **Eur Neuropsychopharmacol**, v.14, n.3, p.175-83. 2004.

BERTOGLIO, LJ; JOCA, SR; GUIMARÃES, FS. Further evidence that anxiety and memory are regionally dissociated within the hippocampus. **Behav Brain Res**, v.175, n.1, p.183-8. 2006.

BERTON, O; NESTLER, EJ. New approaches to antidepressant drug discovery: beyond monoamines. **Nat Rev Neurosci**, v.7, n.2, p.137-51. 2006.

BEYER, CE; DWYER, JM; PIESLA, MJ; PLATT, BJ; SHEN, R; RAHMAN, Z; CHAN, K; MANNERS, MT; SAMAD, TA; KENNEDY, JD; BINGHAM, B; WHITESIDE, GT. Depression-like phenotype following chronic CB1 receptor antagonism. **Neurobiol Dis**, v.39, n.2, p.148-55. 2010.

CAMPBELL, S; MACQUEEN, G. The role of the hippocampus in the pathophysiology of major depression. **J Psychiatry Neurosci**, v.29, n.6, p.417-26. 2004.

CAMPBELL, S; MARRIOTT, M; NAHMIA, C; MACQUEEN, GM. Lower hippocampal volume in patients suffering from depression: a meta-analysis. **Am J Psychiatry**, v.161, n.4, p.598-607. 2004.

CASTAGNE, V; MOSER, P; ROUX, S; PORSOLT, RD. Rodent models of depression: forced swim and tail suspension behavioral despair tests in rats and mice. **Curr Protoc Neurosci**. 2010.

CATERINA, MJ; SCHUMACHER, MA; TOMINAGA, M; ROSEN, TA; LEVINE, JD; JULIUS, D. The capsaicin receptor: a heat-activated ion channel in the pain pathway. **Nature**, v.389, n.6653, p.816-24. 1997.

CHARNEY, DS. Neuroanatomical circuits modulating fear and anxiety behaviors. **Acta Psychiatr Scand Suppl**, n.417, p.38-50. 2003.

CHEUNG, TH; CARDINAL, RN. Hippocampal lesions facilitate instrumental learning with delayed reinforcement but induce impulsive choice in rats. **BMC Neurosci**, v.6, p.36. 2005.

CORCORAN, KA; DESMOND, TJ; FREY, KA; MAREN, S. Hippocampal inactivation disrupts the acquisition and contextual encoding of fear extinction. **J Neurosci**, v.25, n.39, p.8978-87. 2005.

CORTRIGHT, DN; SZALLASI, A. Biochemical pharmacology of the vanilloid receptor TRPV1. An update. **Eur J Biochem**, v.271, n.10, p.1814-9. 2004.

CRISTINO, L; DE PETROCELLIS, L; PRYCE, G; BAKER, D; GUGLIELMOTTI, V; DI MARZO, V. Immunohistochemical localization of cannabinoid type 1 and vanilloid transient receptor potential vanilloid type 1 receptors in the mouse brain. **Neuroscience**, v.139, n.4, p.1405-15. 2006.

CRYAN, JF; MARKOU, A; LUCKI, I. Assessing antidepressant activity in rodents: recent developments and future needs. **Trends Pharmacol Sci**, v.23, n.5, p.238-45. 2002.

CRYAN, JF; PAGE, ME; LUCKI, I. Differential behavioral effects of the antidepressants reboxetine, fluoxetine, and moclobemide in a modified forced swim test following chronic treatment. **Psychopharmacology (Berl)**, v.182, n.3, p.335-44. 2005.

DE PABLO, JM; PARRA, A; SEGOVIA, S; GUILLAMON, A. Learned immobility explains the behavior of rats in the forced swimming test. **Physiol Behav**, v.46, n.2, p.229-37. 1989.

DI MARZO, V. Anandamide serves two masters in the brain. **Nat Neurosci**, v.13, n.12, p.1446-8. 2010.

DI MARZO, V; LASTRES-BECKER, I; BISOGNO, T; DE PETROCELLIS, L; MILONE, A; DAVIS, JB; FERNANDEZ-RUIZ, JJ. Hypolocomotor effects in rats of capsaicin and two long chain capsaicin homologues. **Eur J Pharmacol**, v.420, n.2-3, p.123-31. 2001.

DREVETS, WC; PRICE, JL; FUREY, ML. Brain structural and functional abnormalities in mood disorders: implications for neurocircuitry models of depression. **Brain Struct Funct**, v.213, n.1-2, p.93-118. 2008.

ELPHICK, MR; EGERTOVA, M. The neurobiology and evolution of cannabinoid signalling. **Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci**, v.356, n.1407, p.381-408. 2001.

FANSELOW, MS; DONG, HW. Are the dorsal and ventral hippocampus functionally distinct structures? **Neuron**, v.65, n.1, p.7-19. 2010.

FRODL, T; MEISENZAHN, EM; ZETZSCHE, T; BORN, C; GROLL, C; JAGER, M; LEINSINGER, G; BOTTLENDER, R; HAHN, K; MOLLER, HJ. Hippocampal changes in patients with a first episode of major depression. **Am J Psychiatry**, v.159, n.7, p.1112-8. 2002.

GOELDNER, C; REISS, D; KIEFFER, BL; OUAGAZZAL, AM. Endogenous nociceptin/orphanin-FQ in the dorsal hippocampus facilitates despair-related behavior. **Hippocampus**, v.20, n.8, p.911-6. 2010.

GORZALKA, BB; HILL, MN. Putative role of endocannabinoid signaling in the etiology of depression and actions of antidepressants. **Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry**, v.35, n.7, p.1575-85. 2011.

GUNTHORPE, MJ; RAMI, HK; JERMAN, JC; SMART, D; GILL, CH; SOFFIN, EM; LUIS HANNAN, S; LAPPIN, SC; EGERTON, J; SMITH, GD; WORBY, A; HOWETT, L; OWEN, D; NASIR, S; DAVIES, CH; THOMPSON, M; WYMAN, PA; RANDALL, AD; DAVIS, JB. Identification and characterisation of SB-366791, a potent and selective vanilloid receptor (VR1/TRPV1) antagonist. **Neuropharmacology**, v.46, n.1, p.133-49. 2004.

HÁJOS, N; LEDENT, C; FREUND, TF. Novel cannabinoid-sensitive receptor mediates inhibition of glutamatergic synaptic transmission in the hippocampus. **Neuroscience**, v.106, n.1, p.1-4. 2001.

HASHIMOTO, K. The role of glutamate on the action of antidepressants. **Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry**, v.35, n.7, p.1558-68. 2011.

HAYASE, T. Differential effects of TRPV1 receptor ligands against nicotine-induced depression-like behaviors. **BMC Pharmacol**, v.11, p.6. 2011.

HERMAN, JP; CULLINAN, WE. Neurocircuitry of stress: central control of the hypothalamo-pituitary-adrenocortical axis. **Trends Neurosci**, v.20, n.2, p.78-84. 1997.

HERMAN, JP; CULLINAN, WE; YOUNG, EA; AKIL, H; WATSON, SJ. Selective forebrain fiber tract lesions implicate ventral hippocampal structures in tonic regulation of paraventricular nucleus corticotropin-releasing hormone (CRH) and arginine vasopressin (AVP) mRNA expression. **Brain Res**, v.592, n.1-2, p.228-38. 1992.

HERMAN, JP; OSTRANDER, MM; MUELLER, NK; FIGUEIREDO, H. Limbic system mechanisms of stress regulation: hypothalamo-pituitary-adrenocortical axis. **Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry**, v.29, n.8, p.1201-13. 2005.

JACOBSON, L; SAPOLSKY, R. The role of the hippocampus in feedback regulation of the hypothalamic-pituitary-adrenocortical axis. **Endocr Rev**, v.12, n.2, p.118-34. 1991.

JOCA, SR; PADOVAN, CM; GUIMARAES, FS. Activation of post-synaptic 5-HT(1A) receptors in the dorsal hippocampus prevents learned helplessness development. **Brain Res**, v.978, n.1-2, p.177-84. 2003.

JOCA, SR; PADOVAN, CM; GUIMARÃES, FS. Stress, depression and the hippocampus. **Rev Bras Psiquiatr**, v.25 Suppl 2, p.46-51. 2003.

KATONA, I; SPERLAGH, B; SIK, A; KAFALVI, A; VIZI, ES; MACKIE, K; FREUND, TF. Presynaptically located CB1 cannabinoid

receptors regulate GABA release from axon terminals of specific hippocampal interneurons. **J Neurosci**, v.19, n.11, p.4544-58. 1999.

KAUER, JA; GIBSON, HE. Hot flash: TRPV channels in the brain. **Trends Neurosci**, v.32, n.4, p.215-24. 2009.

KHEIRBEK, MA; HEN, R. Dorsal vs ventral hippocampal neurogenesis: implications for cognition and mood. **Neuropsychopharmacology**, v.36, n.1, p.373-4. 2011.

KIM, KM; KAWADA, T; ISHIHARA, K; INOUE, K; FUSHIKI, T. Increase in swimming endurance capacity of mice by capsaicin-induced adrenal catecholamine secretion. **Biosci Biotechnol Biochem**, v.61, n.10, p.1718-23. 1997.

KIM, KM; KAWADA, T; ISHIHARA, K; INOUE, K; FUSHIKI, T. Inhibition by a capsaicin antagonist (capsazepine) of capsaicin-induced swimming capacity increase in mice. **Biosci Biotechnol Biochem**, v.62, n.12, p.2444-5. 1998.

KJELSTRUP, KG; TUVNES, FA; STEFFENACH, HA; MURISON, R; MOSER, EI; MOSER, MB. Reduced fear expression after lesions of the ventral hippocampus. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v.99, n.16, p.10825-30. 2002.

KRISHNAN, V; NESTLER, EJ. The molecular neurobiology of depression. **Nature**, v.455, n.7215, p.894-902. 2008.

KRISHNAN, V; NESTLER, EJ. Linking molecules to mood: new insight into the biology of depression. **Am J Psychiatry**, v.167, n.11, p.1305-20. 2010.

KRONMULLER, KT; SCHRODER, J; KOHLER, S; GOTZ, B; VICTOR, D; UNGER, J; GIESEL, F; MAGNOTTA, V; MUNDT, C; ESSIG, M; PANTEL, J. Hippocampal volume in first episode and recurrent depression. **Psychiatry Res**, v.174, n.1, p.62-6. 2009.

LEE, S; KIM, DH; YOON, SH; RYU, JH. Sub-chronic administration of rimonabant causes loss of antidepressive activity and decreases doublecortin immunoreactivity in the mouse hippocampus. **Neurosci Lett**, v.467, n.2, p.111-6. 2009.

LEONARDO, ED; RICHARDSON-JONES, JW; SIBILLE, E; KOTTMAN, A; HEN, R. Molecular heterogeneity along the dorsal-ventral axis of the murine hippocampal CA1 field: a microarray analysis of gene expression. **Neuroscience**, v.137, n.1, p.177-86. 2006.

LI, DP; CHEN, SR; PAN, HL. VR1 receptor activation induces glutamate release and postsynaptic firing in the paraventricular nucleus. **J Neurophysiol**, v.92, n.3, p.1807-16. 2004.

LI, HB; MAO, RR; ZHANG, JC; YANG, Y; CAO, J; XU, L. Antistress effect of TRPV1 channel on synaptic plasticity and spatial memory. **Biol Psychiatry**, v.64, n.4, p.286-92. 2008.

LI, N; LEE, B; LIU, RJ; BANASR, M; DWYER, JM; IWATA, M; LI, XY; AGHAJANIAN, G; DUMAN, RS. mTOR-dependent synapse formation underlies the rapid antidepressant effects of NMDA antagonists. **Science**, v.329, n.5994, p.959-64. 2010.

LINO-DE-OLIVEIRA, C; DE LIMA, TC; CAROBREZ, AP. Structure of the rat behaviour in the forced swimming test. **Behav Brain Res**, v.158, n.2, p.243-50. 2005.

LINO-DE-OLIVEIRA, C; DE OLIVEIRA, RM; PADUA CAROBREZ, A; DE LIMA, TC; DEL BEL, EA; GUIMARAES, FS. Antidepressant treatment reduces Fos-like immunoreactivity induced by swim stress in different columns of the periaqueductal gray matter. **Brain Res Bull**, v.70, n.4-6, p.414-21. 2006.

LOVINGER, DM. Presynaptic modulation by endocannabinoids. **Handb Exp Pharmacol**, n.184, p.435-77. 2008.

LUCKI, I. The forced swimming test as a model for core and component behavioral effects of antidepressant drugs. **Behav Pharmacol**, v.8, n.6-7, p.523-32. 1997.

MACQUEEN, GM; CAMPBELL, S; MCEWEN, BS; MACDONALD, K; AMANO, S; JOFFE, RT; NAHMIAS, C; YOUNG, LT. Course of illness, hippocampal function, and hippocampal volume in major depression. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v.100, n.3, p.1387-92. 2003.

- MALBERG, JE; EISCH, AJ; NESTLER, EJ; DUMAN, RS. Chronic antidepressant treatment increases neurogenesis in adult rat hippocampus. **J Neurosci**, v.20, n.24, p.9104-10. 2000.
- MALYKHIN, NV; CARTER, R; SERES, P; COUPLAND, NJ. Structural changes in the hippocampus in major depressive disorder: contributions of disease and treatment. **J Psychiatry Neurosci**, v.35, n.5, p.337-43. 2010.
- MAREN, S; HOBIN, JA. Hippocampal regulation of context-dependent neuronal activity in the lateral amygdala. **Learn Mem**, v.14, n.4, p.318-24. 2007.
- MARINELLI, S; DI MARZO, V; BERRETTA, N; MATIAS, I; MACCARRONE, M; BERNARDI, G; MERCURI, NB. Presynaptic facilitation of glutamatergic synapses to dopaminergic neurons of the rat substantia nigra by endogenous stimulation of vanilloid receptors. **J Neurosci**, v.23, n.8, p.3136-44. 2003.
- MARINELLI, S; VAUGHAN, CW; CHRISTIE, MJ; CONNOR, M. Capsaicin activation of glutamatergic synaptic transmission in the rat locus coeruleus in vitro. **J Physiol**, v.543, n.Pt 2, p.531-40. 2002.
- MARSCH, R; FOELLER, E; RAMMES, G; BUNCK, M; KOSSL, M; HOLSBOER, F; ZIEGLGANSBERGER, W; LANDGRAF, R; LUTZ, B; WOTJAK, CT. Reduced anxiety, conditioned fear, and hippocampal long-term potentiation in transient receptor potential vanilloid type 1 receptor-deficient mice. **J Neurosci**, v.27, n.4, p.832-9. 2007.
- MCARTHUR, R; BORSINI, F. Animal models of depression in drug discovery: a historical perspective. **Pharmacol Biochem Behav**, v.84, n.3, p.436-52. 2006.
- MCEOWN, K; TREIT, D. Inactivation of the dorsal or ventral hippocampus with muscimol differentially affects fear and memory. **Brain Res**, v.1353, p.145-51. 2010.
- MCEWEN, BS. Stress and hippocampal plasticity. **Annu Rev Neurosci**, v.22, p.105-22. 1999.

MCLAUGHLIN, RJ; HILL, MN; MORRISH, AC; GORZALKA, BB. Local enhancement of cannabinoid CB1 receptor signalling in the dorsal hippocampus elicits an antidepressant-like effect. **Behav Pharmacol**, v.18, n.5-6, p.431-8. 2007.

MEZEY, E; TOTH, ZE; CORTRIGHT, DN; ARZUBI, MK; KRAUSE, JE; ELDE, R; GUO, A; BLUMBERG, PM; SZALLASI, A. Distribution of mRNA for vanilloid receptor subtype 1 (VR1), and VR1-like immunoreactivity, in the central nervous system of the rat and human. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v.97, n.7, p.3655-60. 2000.

MONTELL, C. The TRP superfamily of cation channels. **Sci STKE**, v.2005, n.272, p.re3. 2005.

MOREIRA, FA; AGUIAR, DC; TERZIAN, AL; GUIMARAES, FS; WOTJAK, CT. Cannabinoid type 1 receptors and transient receptor potential vanilloid type 1 channels in fear and anxiety-two sides of one coin? **Neuroscience**. 2011.

MOSER, E; MOSER, MB; ANDERSEN, P. Spatial learning impairment parallels the magnitude of dorsal hippocampal lesions, but is hardly present following ventral lesions. **J Neurosci**, v.13, n.9, p.3916-25. 1993.

MOSER, MB; MOSER, EI. Functional differentiation in the hippocampus. **Hippocampus**, v.8, n.6, p.608-19. 1998.

MUSELLA, A; DE CHIARA, V; ROSSI, S; PROSPERETTI, C; BERNARDI, G; MACCARRONE, M; CENTONZE, D. TRPV1 channels facilitate glutamate transmission in the striatum. **Mol Cell Neurosci**, v.40, n.1, p.89-97. 2009.

NAGATANI, T; SUGIHARA, T; KODAIRA, R. The effect of diazepam and of agents which change GABAergic functions in immobility in mice. **Eur J Pharmacol**, v.97, n.3-4, p.271-5. 1984.

NAGATANI, T; YAMAMOTO, T; SUGIHARA, T; UEKI, S. The effect of agonists at the GABA-benzodiazepine receptor complex on the duration of immobility of mice in the forced swimming test. **Eur J Pharmacol**, v.142, n.1, p.17-22. 1987.

NEMEROFF, CB; VALE, WW. The neurobiology of depression: inroads to treatment and new drug discovery. **J Clin Psychiatry**, v.66 Suppl 7, p.5-13. 2005.

NESTLER, EJ; BARROT, M; DILEONE, RJ; EISCH, AJ; GOLD, SJ; MONTEGGIA, LM. Neurobiology of depression. **Neuron**, v.34, n.1, p.13-25. 2002a.

NESTLER, EJ; GOULD, E; MANJI, H; BUNCAN, M; DUMAN, RS; GRESHENFELD, HK; HEN, R; KOESTER, S; LEDERHENDLER, I; MEANEY, M; ROBBINS, T; WINSKY, L; ZALCMAN, S. Preclinical models: status of basic research in depression. **Biol Psychiatry**, v.52, n.6, p.503-28. 2002b.

NESTLER, EJ; HYMAN, SE. Animal models of neuropsychiatric disorders. **Nat Neurosci**, v.13, n.10, p.1161-9. 2010.

NETTLES, KW; PESOLD, C; GOLDMAN, MB. Influence of the ventral hippocampal formation on plasma vasopressin, hypothalamic-pituitary-adrenal axis, and behavioral responses to novel acoustic stress. **Brain Res**, v.858, n.1, p.181-90. 2000.

NORMANN, C; SCHMITZ, D; FURMAIER, A; DOING, C; BACH, M. Long-term plasticity of visually evoked potentials in humans is altered in major depression. **Biol Psychiatry**, v.62, n.5, p.373-80. 2007.

O'DONNELL, P; GRACE, AA. Synaptic interactions among excitatory afferents to nucleus accumbens neurons: hippocampal gating of prefrontal cortical input. **J Neurosci**, v.15, n.5 Pt 1, p.3622-39. 1995.

O'NEIL, MF; MOORE, NA. Animal models of depression: are there any? **Hum Psychopharmacol**, v.18, n.4, p.239-54. 2003.

PADOVAN, CM; GUIMARÃES, FS. Antidepressant-like effects of NMDA-receptor antagonist injected into the dorsal hippocampus of rats. **Pharmacol Biochem Behav**, v.77, n.1, p.15-9. 2004.

PAGE, ME; DETKE, MJ; DALVI, A; KIRBY, LG; LUCKI, I. Serotonergic mediation of the effects of fluoxetine, but not desipramine, in the rat forced swimming test. **Psychopharmacology (Berl)**, v.147, n.2, p.162-7. 1999.

PALAZZO, E; DE NOVELLIS, V; MARABESE, I; CUOMO, D; ROSSI, F; BERRINO, L; MAIONE, S. Interaction between vanilloid and glutamate receptors in the central modulation of nociception. **Eur J Pharmacol**, v.439, n.1-3, p.69-75. 2002.

PANDIS, C; SOTIRIOU, E; KOUVARAS, E; ASPRODINI, E; PAPTAEODORPOULOS, C; ANGELATOU, F. Differential expression of NMDA and AMPA receptor subunits in rat dorsal and ventral hippocampus. **Neuroscience**, v.140, n.1, p.163-75. 2006.

PARIANTE, CM; LIGHTMAN, SL. The HPA axis in major depression: classical theories and new developments. **Trends Neurosci**, v.31, n.9, p.464-8. 2008.

PASSARGE, E. **Color Atlas of Genetics**. Stuttgart · New York: Thieme. 2001. 457 p.

PAXINOS, G; WATSON, C. **The rat brain in stereotaxic coordinates**. San Diego: Academic Press. 2009

PORSOLT, RD; ANTON, G; BLAVET, N; JALFRE, M. Behavioural despair in rats: a new model sensitive to antidepressant treatments. **Eur J Pharmacol**, v.47, n.4, p.379-91. 1978.

PORSOLT, RD; BROSSARD, G; HAUTOBOIS, C; ROUX, S. Rodent models of depression: forced swimming and tail suspension behavioral despair tests in rats and mice. **Curr Protoc Neurosci**, v.Chapter 8, p.Unit 8 10A. 2001.

PORSOLT, RD; LE PICHON, M; JALFRE, M. Depression: a new animal model sensitive to antidepressant treatments. **Nature**, v.266, n.5604, p.730-2. 1977.

RÉNÉRIC, JP; LUCKI, I. Antidepressant behavioral effects by dual inhibition of monoamine reuptake in the rat forced swimming test. **Psychopharmacology (Berl)**, v.136, n.2, p.190-7. 1998.

RODRIGUEZ-LANDA, JF; CONTRERAS, CM; GARCIA-RIOS, RI. Allopregnanolone microinjected into the lateral septum or dorsal

hippocampus reduces immobility in the forced swim test: participation of the GABAA receptor. **Behav Pharmacol**, v.20, n.7, p.614-22. 2009.

ROOZENDAAL, B; PHILLIPS, RG; POWER, AE; BROOKE, SM; SAPOLSKY, RM; MCGAUGH, JL. Memory retrieval impairment induced by hippocampal CA3 lesions is blocked by adrenocortical suppression. **Nat Neurosci**, v.4, n.12, p.1169-71. 2001.

RUBINO, T; REALINI, N; CASTIGLIONI, C; GUIDALI, C; VIGANO, D; MARRAS, E; PETROSINO, S; PERLETTI, G; MACCARRONE, M; DI MARZO, V; PAROLARO, D. Role in anxiety behavior of the endocannabinoid system in the prefrontal cortex. **Cereb Cortex**, v.18, n.6, p.1292-301. 2008.

SAHAY, A; HEN, R. Adult hippocampal neurogenesis in depression. **Nat Neurosci**, v.10, n.9, p.1110-5. 2007.

SANACORA, G; TRECCANI, G; POPOLI, M. Towards a glutamate hypothesis of depression: an emerging frontier of neuropsychopharmacology for mood disorders. **Neuropharmacology**, v.62, n.1, p.63-77. 2012.

SANACORA, G; ZARATE, CA; KRYSTAL, JH; MANJI, HK. Targeting the glutamatergic system to develop novel, improved therapeutics for mood disorders. **Nat Rev Drug Discov**, v.7, n.5, p.426-37. 2008.

SANTARELLI, L; SAXE, M; GROSS, C; SURGET, A; BATTAGLIA, F; DULAWA, S; WEISSTAUB, N; LEE, J; DUMAN, R; ARANCIO, O; BELZUNG, C; HEN, R. Requirement of hippocampal neurogenesis for the behavioral effects of antidepressants. **Science**, v.301, n.5634, p.805-9. 2003.

SANTOS, CJ; STERN, CAJ; BERTOGLIO, LJ. Attenuation of anxiety-related behaviour after the antagonism of transient receptor potential vanilloid type 1 channels in the rat ventral hippocampus. **Behav Pharmacol**, v.19, n.4, p.357-60. 2008.

SCHLICKER, E; KATHMANN, M. Modulation of transmitter release via presynaptic cannabinoid receptors. **Trends Pharmacol Sci**, v.22, n.11, p.565-72. 2001.

SEN, S; SANACORA, G. Major depression: emerging therapeutics. **Mt Sinai J Med**, v.75, n.3, p.204-25. 2008.

SIRIANNI, RW; OLAUSSON, P; CHIU, AS; TAYLOR, JR; SALTZMAN, WM. The behavioral and biochemical effects of BDNF containing polymers implanted in the hippocampus of rats. **Brain Res**, v.1321, p.40-50. 2010.

SKOLNICK, P. Antidepressants for the new millennium. **Eur J Pharmacol**, v.375, n.1-3, p.31-40. 1999.

SOLEIMANI, L; LAPIDUS, KA; IOSIFESCU, DV. Diagnosis and treatment of major depressive disorder. **Neurol Clin**, v.29, n.1, p.177-93, ix. 2011.

STAROWICZ, K; MAIONE, S; CRISTINO, L; PALAZZO, E; MARABESE, I; ROSSI, F; DE NOVELLIS, V; DI MARZO, V. Tonic endovanilloid facilitation of glutamate release in brainstem descending antinociceptive pathways. **J Neurosci**, v.27, n.50, p.13739-49. 2007.

STAROWICZ, K; NIGAM, S; DI MARZO, V. Biochemistry and pharmacology of endovanilloids. **Pharmacol Ther**, v.114, n.1, p.13-33. 2007.

SURGET, A; TANTI, A; LEONARDO, ED; LAUGERAY, A; RAINER, Q; TOUMA, C; PALME, R; GRIEBEL, G; IBARGUEN-VARGAS, Y; HEN, R; BELZUNG, C. Antidepressants recruit new neurons to improve stress response regulation. **Mol Psychiatry**, v.16, n.12, p.1177-88. 2011.

SWANSON, CJ; BURES, M; JOHNSON, MP; LINDEN, AM; MONN, JA; SCHOEPP, DD. Metabotropic glutamate receptors as novel targets for anxiety and stress disorders. **Nat Rev Drug Discov**, v.4, n.2, p.131-44. 2005.

SZALLASI, A; BLUMBERG, PM. Vanilloid (Capsaicin) receptors and mechanisms. **Pharmacol Rev**, v.51, n.2, p.159-212. 1999.

SZALLASI, A; CORTRIGHT, DN; BLUM, CA; EID, SR. The vanilloid receptor TRPV1: 10 years from channel cloning to antagonist proof-of-concept. **Nat Rev Drug Discov**, v.6, n.5, p.357-72. 2007.

TAKAHASHI, KA; CASTILLO, PE. The CB1 cannabinoid receptor mediates glutamatergic synaptic suppression in the hippocampus. **Neuroscience**, v.139, n.3, p.795-802. 2006.

TERZIAN, AL; AGUIAR, DC; GUIMARAES, FS; MOREIRA, FA. Modulation of anxiety-like behaviour by Transient Receptor Potential Vanilloid Type 1 (TRPV1) channels located in the dorsolateral periaqueductal gray. **Eur Neuropsychopharmacol**, v.19, n.3, p.188-95. 2009.

TOMINAGA, M; CATERINA, MJ; MALMBERG, AB; ROSEN, TA; GILBERT, H; SKINNER, K; RAUMANN, BE; BASBAUM, AI; JULIUS, D. The cloned capsaicin receptor integrates multiple pain-producing stimuli. **Neuron**, v.21, n.3, p.531-43. 1998.

TOMINAGA, M; TOMINAGA, T. Structure and function of TRPV1. **Pflugers Arch**, v.451, n.1, p.143-50. 2005.

TOTH, A; BOCZAN, J; KEDEI, N; LIZANECZ, E; BAGI, Z; PAPP, Z; EDES, I; CSIBA, L; BLUMBERG, PM. Expression and distribution of vanilloid receptor 1 (TRPV1) in the adult rat brain. **Brain Res Mol Brain Res**, v.135, n.1-2, p.162-8. 2005.

TRULLAS, R; SKOLNICK, P. Functional antagonists at the NMDA receptor complex exhibit antidepressant actions. **Eur J Pharmacol**, v.185, n.1, p.1-10. 1990.

TUVNES, FA; STEFFENACH, HA; MURISON, R; MOSER, MB; MOSER, EI. Selective hippocampal lesions do not increase adrenocortical activity. **J Neurosci**, v.23, n.10, p.4345-54. 2003.

TZAVARA, ET; DAVIS, RJ; PERRY, KW; LI, X; SALHOFF, C; BYMASTER, FP; WITKIN, JM; NOMIKOS, GG. The CB1 receptor antagonist SR141716A selectively increases monoaminergic neurotransmission in the medial prefrontal cortex: implications for therapeutic actions. **Br J Pharmacol**, v.138, n.4, p.544-53. 2003.

VAN PRAAG, HM. Can stress cause depression? **Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry**, v.28, n.5, p.891-907. 2004.

VERWER, RW; MEIJER, RJ; VAN UUM, HF; WITTER, MP. Collateral projections from the rat hippocampal formation to the lateral and medial prefrontal cortex. **Hippocampus**, v.7, n.4, p.397-402. 1997.

VIDEBECH, P; RAVNKILDE, B. Hippocampal volume and depression: a meta-analysis of MRI studies. **Am J Psychiatry**, v.161, n.11, p.1957-66. 2004.

VIEIRA, C; DE LIMA, TC; CAROBREZ ADE, P; LINO-DE-OLIVEIRA, C. Frequency of climbing behavior as a predictor of altered motor activity in rat forced swimming test. **Neurosci Lett**, v.445, n.2, p.170-3. 2008.

WONG, ML; LICINIO, J. Research and treatment approaches to depression. **Nat Rev Neurosci**, v.2, n.5, p.343-51. 2001.

XING, J; LI, J. TRPV1 receptor mediates glutamatergic synaptic input to dorsolateral periaqueductal gray (dl-PAG) neurons. **J Neurophysiol**, v.97, n.1, p.503-11. 2007.

YAROM, O; MAROUN, M; RICHTER-LEVIN, G. Exposure to forced swim stress alters local circuit activity and plasticity in the dentate gyrus of the hippocampus. **Neural Plast**, v.2008, p.194097. 2008.

YILMAZ, A; SCHULZ, D; AKSOY, A; CANBEYLI, R. Prolonged effect of an anesthetic dose of ketamine on behavioral despair. **Pharmacol Biochem Behav**, v.71, n.1-2, p.341-4. 2002.

YOU, IJ; JUNG, YH; KIM, MJ; KWON, SH; HONG, SI; LEE, SY; JANG, CG. Alterations in the emotional and memory behavioral phenotypes of transient receptor potential vanilloid type 1-deficient mice are mediated by changes in expression of 5-HT(1A), GABA(A), and NMDA receptors. **Neuropharmacology**. 2011.

8 ANEXO A – COLORAÇÃO DE GIEMSA MODIFICADA

1. Hidratação das lâminas em cuba contendo água destilada – 2 baterias de 3 min cada;
2. Imersão em corante Giemsa modificado (GS1L, Sigma-Aldrich, EUA) por 6 min;
3. Lavagem rápida com água destilada;
4. Repetir passo 1;
5. Lavagem rápida com etanol 70%;
6. Lavagem rápida com etanol 95%;
7. Lavagem rápida com água destilada;
8. Imersão em etanol 100% - 3 baterias de 3 min cada;
9. Imersão em CitroSolv® - 2 baterias de 5 min cada;
10. Cobrir com *permount* ou *entellan* e lamínula.