

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

Departamento de Farmacologia

Leonardo de Castro e Souza (Aluno de Graduação)

Prof. Dr. Roberto Andreatini (Orientador)

Dr. André Twardowschy (Co-Orientador)

**PARTICIPAÇÃO DO SISTEMA CATECOLAMINÉRGICO SOBRE AS RESPOSTAS
DO TIPO ANTIDEPRESSIVA DO BAN ORL 24, UM ANTAGONISTA DE
RECEPTORES NOP**

CURITIBA

2013

RESUMO

A depressão é um dos transtornos de humor mais comuns mundialmente. As drogas hoje empregadas no tratamento dessa patologia ainda possuem vários tipos de efeitos colaterais, além de um início lento da melhora clínica. Existe ainda o fato de que uma importante parcela dos pacientes não responde bem a terapia com essas drogas. Por essas e outras razões, que a busca por drogas antidepressivas inovadoras é necessária. Sistemas neuropeptidérgicos são um importante alvo para o desenvolvimento de tais drogas. Dentre esses sistemas, nociceptina/orfanina FQ (N/OFQ) e seu receptor (o receptor de peptídeo N/OFQ, NOP) constituem um sistema peptídeo-receptor expresso em áreas cerebrais envolvidas no processamento emocional. Estudos anteriores já demonstraram que a administração de antagonistas desses receptores geram efeitos do tipo antidepressivo nos animais submetidos a testes de “desespero comportamental”, como o Teste de Natação Forçada. Mas os mecanismos de ação desses antagonistas ainda não estão claros, alguns autores apontam como fator principal a participação monoaminérgica induzida pelo sistema N/OFQ-NOP. O objetivo do presente trabalho foi investigar a participação das catecolaminas nos mecanismos de ação de BAN ORL 24 (BAN), um antagonista NOP. Realizou-se o Teste de Natação Forçada Modificado (NFM), onde os ratos foram pré-tratados com BAN (doses de 1, 10 e 100 nmol/0,2µl), intra-hipocampo, e α -metil-p-tirosina (AMPT), inibidor seletivo da produção de noradrenalina e dopamina, (doses de 100 e 200mg/kg), intraperitoneal (i.p.). Esse teste procurou mensurar as respostas de imobilidade, natação e escalada dos animais (onde a diminuição no tempo de imobilidade demonstra um efeito do tipo antidepressivo; as drogas noradrenérgicas e dopaminérgicas diminuem o tempo de imobilidade aumentando a resposta de escalada, enquanto as drogas serotoninérgicas diminuem a imobilidade aumentando a resposta de natação). Os resultados mostraram que a AMPT reverteu significativamente os efeitos do tipo antidepressivos do BAN, ao aumentar o tempo de imobilidade, e também bloqueou a resposta de escalada induzida pelo antagonista NOP. Dessa maneira, os resultados sugerem que o BAN apresenta efeito do tipo antidepressivo e que os receptores NOP no hipocampo dorsal estão envolvidos nesse efeito, ainda pode ser observado que as catecolaminas parecem ter um importante papel nos mecanismos de ação subjacentes as respostas produzidas pelo antagonista de receptor NOP.

ABSTRACT

Major depression is one of the most common psychiatric disorders worldwide, the drugs currently used in this pathology treatments still have several side effects, in addition, most therapies require several weeks of treatment before improvement of signs and symptoms is observed, and, a significant proportion of individuals do not respond well to any marketed antidepressants or treatments. Therefore, the search for new drugs to treat depression is needed. Neuropeptidergic systems are an important target for the development of novel antidepressant drugs. Among these, nociceptin/orphanin FQ (N/OFQ) and its receptor (NOP) are a peptide-receptor system expressed in brain areas involved with emotional processing. Previous investigations have shown that the administration of antagonists of these receptors leads to antidepressant-like effects in animals submitted to "behavioral despair" tests, such as Forced Swim Test. However, the mechanisms of these antagonists are not clear; some researchers suggest that the main role is played by the monoaminergic participation elicited by the N/OFQ-NOP system. The main aim of this study was to investigate the part of catecholamines in the mechanism of BAN ORL 24, a NOP receptor antagonist. The Modified Swim Test was conducted, where rats were pretreated with BAN (1, 10 and 100 nmol/0,2µl), intra-hippocampal, and α-methyl-p-tyrosine (100 and 200mg/kg), a selective inhibitor of dopamine and noradrenaline production, intraperitoneal. This test tried to measure immobility, climbing and swimming responses; where a decrease in the time of immobility demonstrates an antidepressant-like effect; noradrenergic and dopaminergic drugs decrease the time of immobility by an increase in climbing response, while serotonergic drugs decrease it by an increase in swimming response. Results showed AMPT reversed significantly BAN antidepressant-like effect, by a decrease in the immobility response, and blocked the climbing response induced by the NOP receptor antagonist. Thus, results suggest that BAN exhibits an antidepressant-like effect and the NOP receptors from the dorsal hippocampus are involved in this effect, it still can be observed that catecholamines seem to play an important role in the mechanisms of the NOP receptor antagonist.

1. INTRODUÇÃO

A depressão é um dos transtornos psiquiátricos mais comuns e mais dispendiosos, levando a distúrbios cognitivos e afetivos, causando um impacto negativo na qualidade de vida. É uma desordem heterogênea, normalmente manifestando sintomas nos níveis psicológico, comportamental e fisiológico; que compreendem humor deprimido, perda da capacidade de sentir prazer (anedonia), alterações no sono (insônia ou hipersonia), alterações no apetite, sentimentos de inutilidade e culpa, e pensamentos suicidas (American Psychiatric Association, 1994) (GAVIOLI et al., 2013).

As atuais evidências indicam que a patologia da depressão envolve disfunção nos circuitos neurotransmissores de monoaminas (serotonina, dopamina e noradrenalina) no sistema nervoso central (SNC) (GAVIOLI et al., 2013). O paradigma da depleção de monoaminas tem sido usado para investigar os mecanismos de ação de antidepressivos em estudos pré-clínicos e clínicos (KASTER et al., 2007; MACHADO et al., 2008). Investigações anteriores mostraram que a depleção de monoaminas com reserpina leva a efeitos depressogênicos em indivíduos já vulneráveis a transtornos afetivos (GOODWIN e BUNNEY, 1971). A maior parte das pesquisas em depressão têm focado principalmente nos sistemas noradrenérgicos e serotoninérgicos. Atualmente, os tratamentos mais eficazes para a depressão maior envolvem um aumento da neurotransmissão de 5-HT e/ou NA (GAVIOLI et al., 2013; MACHADO et al., 2008).

Tem sido demonstrado que o neurotransmissor noradrenalina tem relação tanto com a patogênese da depressão maior como com os mecanismos de ação de medicamentos antidepressivos. Isto ocorre em função da maior parte da primeira geração de antidepressivos, os tricíclicos, aumentarem as concentrações sinápticas de noradrenalina (MACHADO et al., 2008).

As drogas antidepressivas clássicas possuem três mecanismos de ação: bloqueio de proteínas pré-sinápticas transportadoras de monoaminas, que removem transmissores liberados no espaço extracelular; inibição da enzima monoamina oxidase, que degrada as monoaminas neurotransmissoras; ou interação com receptores pré ou pós-sinápticos que regulam a liberação das monoaminas e/ou a taxa de disparo neuronal (NEMEROFF e OWENS, 2002).

Sabe-se que muitos pacientes depressivos tratados com um único tipo de antidepressivo acabam por ter remissão total ou parcial dos sintomas, outros ainda são intolerantes ao tratamento, o que demonstra a necessidade de identificar novas classes de antidepressivos (BERTON e NESTLER, 2006; BOGDANOVA et al., 2013; GIRISH et al., 2012). De acordo com um relatório da Organização Mundial da Saúde (OMS, 2001), os transtornos de humor são a maior causa de anos vividos com incapacitação em todo o mundo, em todas as idades. Cada droga usada para tratar esse tipo de desordem tem uma taxa de sucesso de 60%. Além disso, a maior parte das terapias requerem várias semanas de tratamento antes de se observar melhoras nos sinais e sintomas, e são muitos os efeitos colaterais dos antidepressivos. Assim, a alta prevalência da depressão e o fato de que uma grande proporção dos indivíduos não responde bem a nenhum antidepressivo ou tratamento vendidos atualmente também suportam a necessidade de novas terapias para o tratamento da depressão (GIRISH et al., 2012; LIU et al., 2012; MACHADO et al., 2008; ZHEN et al., 2012).

Sistemas neuropeptidérgicos representam um importante alvo para o desenvolvimento de antidepressivos inovadores. Dentre esses sistemas, nociceptina/orfanina FQ (N/OFQ) e seu receptor (o receptor de peptídeo N/OFQ, NOP) constituem um sistema peptídeo-receptor expresso em áreas cerebrais envolvidas no processamento emocional. Além disso, um grande corpo de evidências sugere um papel crucial do sistema N/OFQ na modulação de efeitos do estresse em estruturas límbicas, principalmente o hipocampo e o eixo hipotálamo-pituitária-adrenal (HPA) (GAVIOLI et al., 2013).

O peptídeo N/OFQ é o ligante endógeno do receptor NOP, e foi isolado do cérebro de animais pela primeira vez em 1995 (MEUNIER et al., 1995; REINSCHEID et al., 1995). N/OFQ é estruturalmente relacionado com peptídeos opióides, entretanto não se liga a receptores opióides clássicos, e ligantes opióides endógenos não possuem afinidade pelo receptor NOP. Em um nível celular, o receptor NOP é acoplado à proteína G. Assim, a ativação da sinalização de N/OFQ através do receptor NOP leva a uma redução da formação de cAMP, bloqueio de canais de Ca²⁺, e estimula a condução de K⁺ para fora da célula. Portanto, a ativação dos receptores NOP evoca efeitos inibitórios causando uma redução na liberação de neurotransmissores, e/ou inibição do disparo neuronal, dependendo do sítio (pré ou pós-sináptico) de expressão do receptor NOP (GAVIOLI et al., 2013).

O receptor NOP é amplamente expresso no sistema nervoso bem como em órgãos periféricos e no sistema imune. Em relação a sua expressão encefálica, é

importante mencionar que o receptor NOP é encontrado no prosencéfalo, incluindo áreas corticais, regiões olfativas, tálamo e uma variedade de estruturas límbicas, tais como o hipocampo, o septo, a banda diagonal de Broca e o complexo amigdalóide. Ao longo do tronco cerebral, o receptor NOP também é expresso em áreas tais como a substância cinzenta periaqueductal e vários núcleos sensoriais e motores. Além disso, o receptor NOP é densamente localizado em núcleos serotoninérgicos, noradrenérgicos e dopaminérgicos, como o complexo da rafe, o locus coeruleus, o núcleo do trato solitário, a área tegmental ventral e a substância negra, respectivamente (MOGIL e PASTERNAK, 2001; MOLLEREAU e MOULEDOUS, 2000; NEAL et al., 1999).

A ampla distribuição de N/OFQ e seu receptor NOP sugere um variado espectro de ações biológicas deste sistema peptidérgico. Estudos *in vivo* demonstraram que o complexo N/OFQ-NOP modula uma variedade de funções biológicas, tais como nocicepção, ingestão de alimentos, aprendizagem e memória, atividade locomotora espontânea, hipotensão e bradicardia, diurese, alteração da motilidade gastrointestinal e alguns reflexos, como tosse e o reflexo da micção (LAMBERT, 2008).

Além dessas ações descritas do receptor NOP, alguns grupos de pesquisa vêm intensificando seus estudos a respeito das interessantes descobertas em relação a respostas ao estresse, ansiedade e depressão (JENCK et al., 1997; GAVIOLI et al., 2003, 2004; UCHIYAMA et al., 2008; GOELDNER et al., 2010).

A exposição contínua a eventos estressantes tem um papel crucial no desenvolvimento de transtornos depressivos. Os mecanismos envolvidos nesta relação, no entanto, ainda são pouco conhecidos, mas algumas evidências sugerem a participação da formação hipocampal (GUIMARAES et al., 1993; GRAEFF et al., 1996; LATHE, 2001; JOCA et al., 2003), embora essa estrutura seja mais comumente relacionado a processos cognitivos, como aprendizado e memória (RIEDEL e MICHEAU, 2001). O hipocampo também parece ter um papel importante na mediação dos efeitos terapêuticos dos tratamentos antidepressivos (JOCA et al., 2003). Outros estudos sugerem que o hipocampo dorsal é um sítio de ação importante onde os antagonistas do receptor NOP induzem efeitos do tipo antidepressivo (GOELDNER et al., 2010).

A variada série de sintomas que caracterizam a depressão demonstra a dificuldade de reproduzir essa desordem em animais. No entanto, várias tentativas vêm sendo realizadas para se estabelecerem modelos animais úteis para investigar os efeitos antidepressivos de drogas. Entre os testes mais utilizados para rastrear a

atividade de antidepressivos estão o teste da natação forçada (TNF) e o teste de suspensão pela cauda (TSC), conhecidos como testes de desespero comportamental (CRYAN e MOMBÉREAU, 2004; MACHADO et al., 2008). Nestes testes, que são baseados nas consequências comportamentais ao estresse, o roedor é colocado em uma situação estressante e desenvolve movimentos iniciais de tentativa de fuga da situação aversiva, seguido de uma postura de imobilidade, devido à impossibilidade de escapar ao evento estressante. Assim, o efeito das drogas do tipo antidepressivo é mensurado nesses ensaios como uma redução no tempo de imobilidade (MACHADO et al., 2008).

Um avanço no teste da natação forçada foi proposto por Detke e colaboradores (1995) através do modelo de Natação Forçada Modificado (NFM). Nesse teste é possível verificar se drogas que diminuem o tempo de imobilidade possuem uma atividade noradrenérgica, dopaminérgica ou serotoninérgica. O teste baseia-se em colocar o animal num cilindro com água, do qual não se consegue fugir. Inicialmente, o animal apresenta movimentos para tentar escapar do cilindro, como por exemplo: escalar e nadar de um lado para o outro, mas, após certo tempo, o animal desenvolve uma postura imóvel. As drogas noradrenérgicas e dopaminérgicas diminuem o tempo de imobilidade, aumentando o comportamento de escalada, enquanto as drogas serotoninérgicas diminuem a imobilidade, aumentando o comportamento de natação (DETKE et al., 1995; CRYAN et al., 2002; CONSONI et al., 2006; CODAGNONE et al., 2007).

Evidências da participação do sistema N/OFQ-NOP na modulação de comportamentos relacionados a transtornos de humor vem de estudos realizados com roedores submetidos a testes de “desespero comportamental”. Redrobe e colaboradores (2002) verificaram, em um estudo pioneiro, que dois antagonistas do receptor NOP, o peptídeo [Nphe1] N/OFQ(1-13) NH₂ e o não-peptídeo J-113397, reduziram o tempo de imobilidade de camundongos submetidos ao teste de natação forçada. Posteriormente, esses achados foram confirmados e estendidos com a utilização do UFP-101, um antagonista sintético do receptor NOP, que demonstrou produzir efeitos do tipo antidepressivo tanto em ratos como em camundongos e em diferentes ensaios comportamentais (teste do nado forçado e testes da suspensão pela cauda) (GAVIOLI et al., 2003, 2004).

Em relação aos mecanismos de ação que geram os efeitos do tipo antidepressivo dos antagonistas de NOP, são poucos os trabalhos na literatura. Alguns autores têm descrito que os efeitos do tipo antidepressivo provêm da

participação monoaminérgica induzida pelo sistema N/OFQ-NOP. Vários estudos descreveram a participação do sistema N/OFQ–NOP na liberação de neurotransmissores. Utilizando preparações com sinaptossomas ou *slices*, foi demonstrado que a N/OFQ inibe a liberação de noradrenalina e serotonina e, por outro lado, esse efeito inibitório da N/OFQ foi completamente revertido pelos antagonistas NOP (UFP-101 e J-113397) (MARTI et al., 2003; MELA et al. 2004). Em adição, estudos eletrofisiológicos demonstraram que a N/OFQ provoca marcantes efeitos inibitórios na excitabilidade neuronal (ativação da condutância de K⁺ e inibição de canais de Ca²⁺) em uma grande variedade de preparações do sistema nervoso central (HEINRICHER et al., 2003; MORAN et al., 2000).

Investigações preliminares já demonstraram a ação antidepressiva do antagonista do receptor NOP, BAN ORL 24 (BAN), mas não evidenciaram seus mecanismos de ação. Evidências recentes sugerem a participação da 5-HT nos efeitos antidepressivos induzidos por antagonistas NOP. Foi visto que o pré-tratamento com p-Clorofenilalanina (pCPA), inibidor da síntese de 5-HT, impediu os efeitos do tipo antidepressivos do antagonista UFP-101 no teste de nado forçado (GAVIOLI et al., 2004). Entretanto, ainda não foi possível chegar a conclusões definitivas.

Para investigar o possível envolvimento do sistema catecolaminérgico no efeito tipo antidepressivo de BAN ORL 24, α -metil-p-tirosina, um inibidor seletivo da enzima tirosina hidroxilase, foi usado. Essa é a enzima mais importante na limitação da síntese de noradrenalina e dopamina (KASTER et al, 2007; MACHADO et al., 2008; WIDERLOV e LEWANDER, 1978). A α -metil-p-tirosina reduz os níveis de dopamina e noradrenalina (57% e 53%, respectivamente) em camundongos, sem afetar os níveis de serotonina (MAYORGA et al., 2001). Em um estudo passado do grupo do Professor Dr. Roberto Andreatini, o pré-tratamento com α -metil-p-tirosina (nas doses de 100 e 250 mg/kg) foi capaz de prevenir o efeito tipo antidepressivo da lamotrigina, uma droga anticonvulsivante mas que também é efetiva no tratamento de transtornos de humor, no teste de nado forçado (KASTER et al., 2007). Em outro estudo, essa enzima também reverteu o efeito do tipo antidepressivo da rutina, um flavonoide isolado do extrato etanólico da planta *Schinus molle*, na dose de 100 mg/kg, i.p. (MACHADO, 2008).

Os antagonistas do receptor NOP podem, de maneira semelhante aos dos antidepressivos clássicos, atingirem o mesmo objetivo, ou seja, o aumento das concentrações sinápticas corticais de monoaminas, mas atuando em diferentes níveis e com diferentes mecanismos primários. Assim, o presente estudo apresenta novas

evidências em relação aos mecanismos de ação do antagonista de receptores NOP, BAN ORL 24, através da verificação da participação do sistema catecolaminérgico nos efeitos do tipo antidepressivo de BAN.

2. OBJETIVOS

O presente trabalho teve por objetivo verificar a participação do sistema catecolaminérgico nos mecanismos de ação dos efeitos do tipo antidepressivo de um antagonista de receptores NOP (BAN ORL 24).

2.1. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Verificar o efeito antidepressivo do BAN ORL 24 administrado perifericamente no teste de suspensão pela cauda.
- Verificar a participação do sistema catecolaminérgico, sobre as respostas do tipo antidepressiva do BAN, utilizando-se o AMPT.
- Verificar a participação do hipocampo dorsal nos efeitos do tipo antidepressivo do BAN ORL 24 no teste da Natação Forçada Modificado.
- Verificar a participação do sistema catecolaminérgico nas respostas do tipo antidepressivas do BAN ORL 24, microinjetado no hipocampo dorsal (HIPd), no teste da Natação Forçada Modificado.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. ANIMAIS

Foram utilizados ratos albinos (*Rattus norvegicus*, *Rodentia*, *Muridae*), da linhagem Wistar, pesando entre 260-290g, e camundongos (*Mus musculus*), da linhagem Swiss (pesando entre 25–35g). Esses animais ficaram em caixas de polipropileno e acondicionados sob ciclo claro/escuro de 12/12h (luzes ligadas às 7h), e com temperatura entre 21-23°C, sendo-lhes permitido livre acesso à comida e água.

3.2. DROGAS

Nos ratos Wistar foi microinjetada no hipocampo dorsal (HIPd) a seguinte droga: BAN ORL 24 (1, 10 e 100 nmol/0,2µl) e salina (0,9%) 10min antes do teste; e foi injetada intraperitonealmente a droga α -metil-p-tirosina (100 e 200mg/kg), 4h antes do teste. Nos camundongos Swiss foram injetadas intraperitonealmente as drogas: α -metil-p-tirosina (200 mg/kg), 4h antes do teste; BAN ORL 24 (5 mg/kg), venlafaxina (8mg/kg), e salina (0,9%), todas 30min antes do teste. As dosagens foram baseadas em estudos anteriores.

3.3. CIRURGIA

Os animais foram anestesiados com cetamina na dose de 20mg/kg (Ketamina®) e xilasina na dose de 16mg/kg (Dopaser®) e levados a um aparelho estereotáxico (David Kopf, EUA), onde suas cabeças foram fixadas pelo rochedo temporal e incisivos superiores. Cânulas-guia, confeccionadas a partir de agulhas de injeção hipodérmica (diâmetro externo = 0,6mm; diâmetro interno = 0,4mm), foram implantadas e dirigidas ao hipocampo dorsal (AP= -4,0mm, ML= \pm 2,8mm, e DV= -2,1mm), tomando-se o bregma como ponto de referência para as coordenadas, sendo que as cânulas-guia permaneceram 2mm acima do sítio de microinjeção. Coordenadas estipuladas de acordo com o atlas de Paxinos e Watson (2005).

3.4. TESTE DE NATAÇÃO FORÇADA MODIFICADO (NFM)

Os ratos machos Wistar foram colocados em cilindro de PVC (21x 46cm) preenchido de água (22-25°C) a uma profundidade de 30cm. Os ratos foram colocados no cilindro para uma sessão de teste durante 15 minutos. Após 24 horas da primeira exposição, os animais (pré-tratados com as drogas citadas acima) foram novamente colocados no tanque com água por 5 minutos e tiveram seus comportamentos monitorados por uma câmera localizada em cima do cilindro. Os comportamentos predominantes (escalada, natação ou imobilidade) do animal foram

verificados durante os 5 minutos de teste (DETKE et al.,1995; CRYAN et al.,2002; CONSONI et al.,2006; CODAGNONE et al., 2007).

O comportamento de escalada consiste em movimentos verticais, com os quais o animal tenta, com as patas dianteiras fora da água, escalar as paredes do cilindro. O comportamento de natação é definido como movimentos horizontais, quando então o animal realiza movimentos circulares e cruzamentos de um quadrante para o outro. A imobilidade é verificada quando não existe nenhum movimento adicional além daqueles necessários para manter a cabeça do animal fora da água.

3.5. TESTE DE SUSPENSÃO PELA CAUDA (TSC)

O teste de suspensão pela cauda foi conduzido conforme previamente descrito por Steru e colaboradores (1985). No teste, os camundongos foram fixados pela cauda com uma fita adesiva (em uma posição constante a 3/4 da distância da base da cauda) e suspensos em uma barra horizontal a 30cm do piso da caixa de observação. Os animais receberam as injeções intraperitoneais 30 minutos antes do teste (BAN, salina e venlafaxina) e quando houve administração do AMPT, essa foi administrada 4h antes do teste. As observações foram conduzidas por um período de 6 minutos e registrados por uma câmera, para posterior análise. Os camundongos demonstraram várias tentativas de escape alternadas com períodos de imobilidade passiva, sendo que o tempo total de imobilidade durante os 6 minutos do teste foram registrados.

3.6. ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os dados estão apresentados como média \pm EPM. Os dados de tempo de imobilidade e de escalada foram analisados pelo teste ANOVA de uma via. No caso de significância nos testes ANOVA, foi realizado o teste *post-hoc* de Tukey. O nível de significância considerado foi de 5%.

4. RESULTADOS

4.1 PARTICIPAÇÃO CATECOLAMINÉRGICA NO EFEITO DO TIPO ANTIDEPRESSIVO DO BAN ORL 24 INJETADOS PERIFERICAMENTE NO TSC

Pode ser observado na figura 1 o tempo de imobilidade dos camundongos tratados intraperitonealmente com salina, BAN (5mg/kg), AMPT (200mg/kg), venlafaxina (8mg/kg), BAN + AMPT, ou venlafaxina + AMPT. O teste ANOVA de uma via mostrou diferença significativa entre os grupos [$F(5,37)= 12,0$, $p<0,001$]. Os camundongos que receberam BAN i.p (B5), e venlafaxina (V8), um antidepressivo inibidor dos transportadores de serotonina e noradrenalina, reduziram de maneira significativa a resposta de imobilidade em relação aos que receberam salina (Sal), $p<0,01$ e $p<0,001$ respectivamente. O tratamento conjunto de BAN + AMPT200 e venlafaxina + AMPT200 reverteu esse efeito anti-imobilidade das duas drogas significativamente, $p<0,001$ para ambas associações.

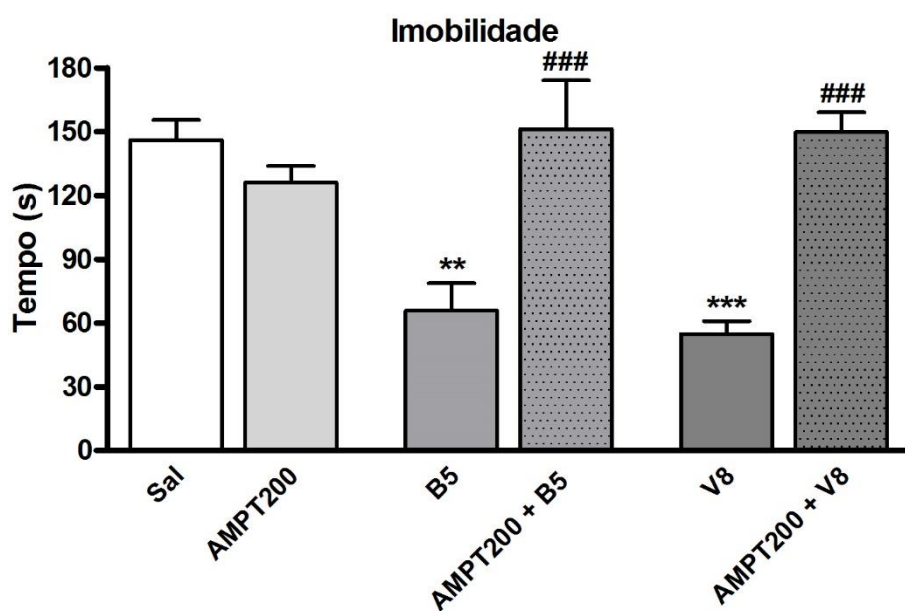


Figura 1. Efeitos da coadministração de α -metil-p-tirosina (AMPT200, 200mg/kg) e BAN ORL 24 (B5, 5 mg/kg), ou venlafaxina (V8, 8mg/kg), i.p., no Teste de Suspensão pela Cauda. Os valores acima representam a média \pm EPM dos parâmetros registrados ($n = 7$ /grupo). ** $p<0,01$; e *** $p<0,001$ em relação ao grupo Salina; ###, $p<0,001$ em relação aos grupos B5 ou V8, respectivamente. Segundo ANOVA de uma via seguida pelo teste *post hoc* de Tukey.

4.2 EFEITOS DA ADMINISTRAÇÃO DE BAN ORL 24 NO TESTE DA NATAÇÃO FORÇADA MODIFICADO

A figura 2 apresenta o tempo de imobilidade, latência para a primeira resposta de imobilidade, tempo de natação e de escalada, no teste do NFM, de ratos tratados por via intra-HIPd com BAN ou salina e animais naïve. É possível observar nos quatro parâmetros registrados, que os animais naïve (que não passaram pela cirurgia estereotóxica) não apresentaram diferença significativa em relação aos animais operados que receberam salina por via intra-hipocampal. Com relação aos tratamentos com o antagonista de receptores NOP, foi observado uma redução significativa, em relação ao grupo salina, no tempo de imobilidade (fig. 1a) dos animais tratados [$F(4,44)= 12,77$, $p<0,001$ para as doses de 1 e 10nmol/0,2 μ l e $p<0,01$ para a dose de 100nmol/0,2 μ l], aumento significativo da latência (fig. 1b) para imobilidade [$F(4,44)= 7,14$, $p<0,01$ para a dose de 1 e 10nmol/0,2 μ l e $p<0,05$ para a dose de 100nmol/0,2 μ l] e aumento significativo do tempo de escalada (fig. 1c) para as doses de 1 e 10nmol/0,2 μ l [$F(4,44)= 4,3$, $p<0,05$]. Com relação ao tempo de natação (fig. 1d), o teste ANOVA não mostrou diferença entre os grupos [$F(4,44)= 1,24$].

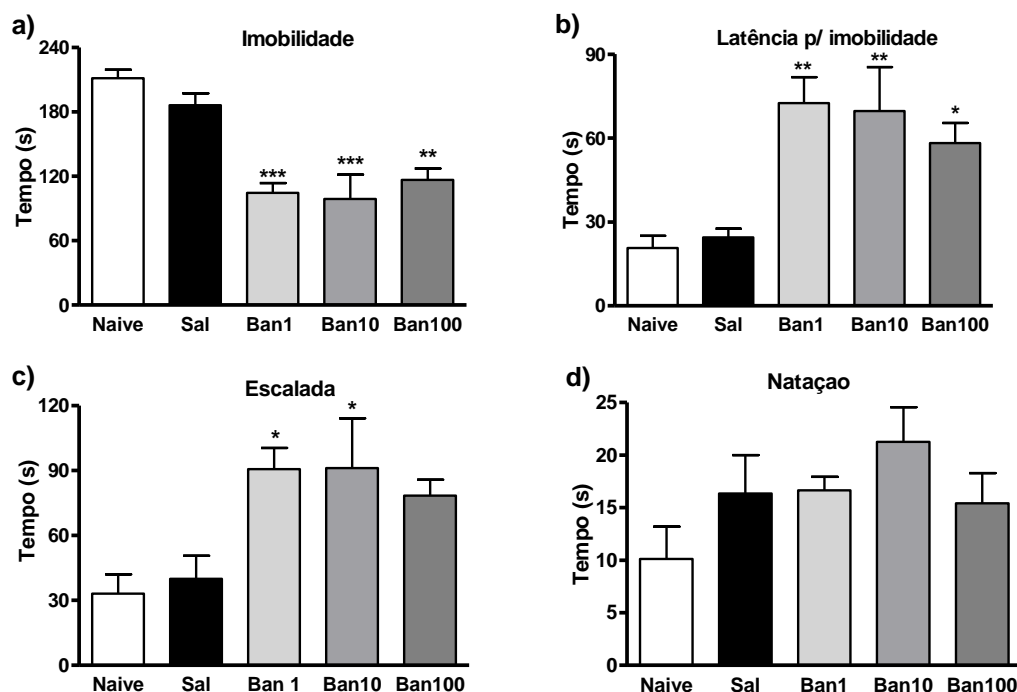


Figura 2. Efeitos do BAN ORL 24 (1, 10 e 100 nmol/0,2 μ l) microinjetado no hipocampo dorsal nas respostas de imobilidade (a), latência para imobilidade (b), escalada (c) e natação (d) no modelo de Natação Forçada Modificado. Sal = salina intra-hipocampal; Naïve = ratos não submetidos à cirurgia estereotóxica. Os valores acima representam

a média \pm EPM dos parâmetros registrados (n = 9 a 12/grupo, exceto grupo naïve com n=6). *, $p<0,05$, **, $p<0,01$, e ***, $p<0,001$, em relação ao grupo salina, segundo a ANOVA de uma via seguida pelo teste *post hoc* de Tukey.

4.3 PARTICIPAÇÃO CATECOLAMINÉRGICA NO EFEITO DO TIPO ANTIDEPRESSIVO DO BAN ORL 24 MICROINJETADOS NO HIPd NO TESTE DO NFM

A figura 3 mostra os tempos das respostas de imobilidade, escalada e natação, no teste NFM, dos ratos que foram tratados i.p. com AMPT ou salina, e intra- HIPd com BAN ou salina. O teste ANOVA de uma via mostrou diferença significativa entre os grupos [$F(5,36)= 15,76$, $p<0,001$] na resposta de imobilidade, onde foi observado que os animais que receberam microinjeções de BAN apresentaram redução significativa em relação ao grupo salina ($p<0,001$). Os ratos tratados previamente com AMPT 100 e 200mg/kg i.p, bloquearam a redução da imobilidade do tratamento intra-HIPd com BAN de maneira significativa, $p<0,05$ e $p<0,001$, respectivamente. Com relação a resposta de escalada foi observado que o teste ANOVA mostrou diferença significativa entre os grupos [$F(5,36)= 7,67$, $p<0,001$], os animais que receberam salina i.p e BAN intra-HIPd aumentaram significativamente essa resposta quando comparados ao seu grupo controle (Sal + Sal) ($p<0,01$). Enquanto que os animais pré-tratados i.p com AMPT 200mg/kg e posteriormente com BAN intra-HIPd apresentaram bloqueio estatisticamente significativo do aumento da escalada induzida pelo BAN ($p<0,01$). Finalmente, com relação a resposta de natação [$F(5,36)= 3,97$, $p<0,01$] o teste de *post hoc* não mostrou diferença entre os tratamentos e seus respectivos grupos controles.

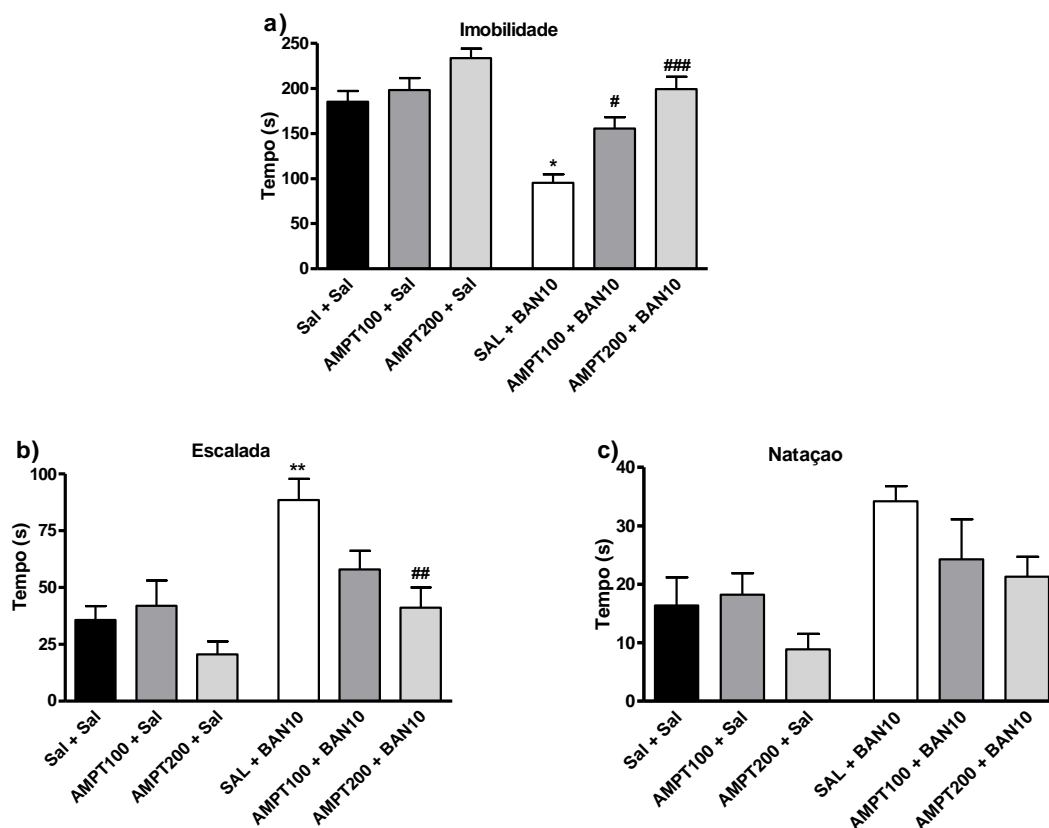


Figura 3. Efeitos da coadministração de BAN ORL 24 (10 nmol/0,2 μ l), microinjetado intra-HIPd, e α -metil-p-tirosina (100 e 200mg/kg), i.p., nas respostas de imobilidade (a), escalada (b) e natação (c) no modelo de Natação Forçada Modificado. Os valores acima representam a média \pm EPM dos parâmetros registrados (n = 7/grupo). *p<0,05; e **p<0,01 em relação ao grupo Sal + Sal; #p<0,05, ##p<0,01 e ###p<0,001 em relação ao grupo Sal + Ban10. Segundo a ANOVA de uma via seguida pelo teste *post hoc* de Tukey.

4.3 SÍTIOS DAS MICROINJEÇÕES DAS DROGAS

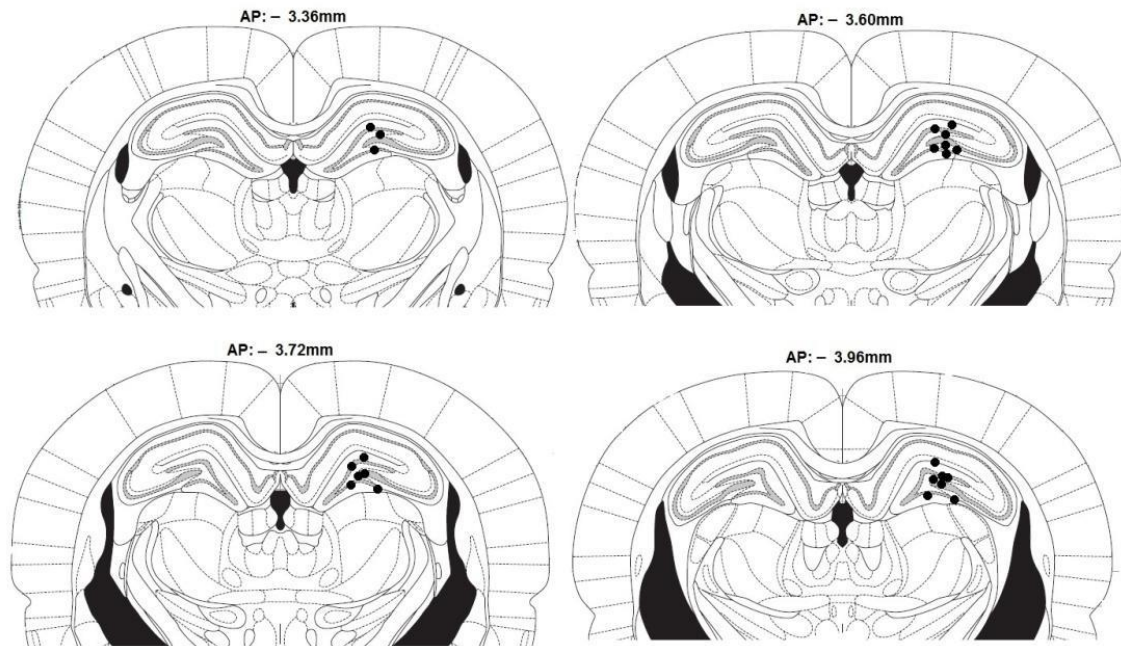


Figura 4. Representação esquemática em anagramas do Atlas de Paxinos e Watson (2005) de cortes coronais do cérebro de ratos Wistar, passando pelo hipocampo dorsal, demonstrando os sítios de microinjeções das drogas (●). As medidas AP (ântero-posterior) indicam a distância em mm em relação ao bregma. Os pontos indicados na figura são menores do que o número de animais usados devido as várias sobreposições de pontos.

5. DISCUSSÃO

No Teste de Suspensão pela Cauda (TSC), os presentes resultados demonstraram a ação do tipo antidepressiva do BAN, administrado intraperitonealmente, ao evidenciar um efeito anti-imobilidade estatisticamente significativo nos camundongos tratados. Ainda, foi observado que o AMPT reverteu significativamente os efeitos do tipo antidepressivos causados nos camundongos pelo tratamento i.p. com BAN e venlafaxina, o que sugere uma participação catecolaminérgica importante.

A α -metil-p-tirosina (AMPT) é um inibidor seletivo da enzima tirosina hidroxilase, enzima essa que é de suma importância na síntese das catecolaminas (KASTER et al., 2007; MACHADO et al., 2008; WIDERLOV e LEWANDER, 1978). A AMPT reduz os níveis de dopamina e noradrenalina (57% e 53%, respectivamente) em camundongos, sem afetar os níveis de serotonina (MAYORGA et al., 2001). Miller et al. (1996a,b) examinaram a capacidade da AMPT, através da rápida depleção de catecolaminas, de causar a reincidência da depressão em pacientes deprimidos já tratados com um inibidor da recaptação de noradrenalina. Observou-se que a AMPT tem pouco efeito no humor de indivíduos normais, mas quando dada a pacientes depressivos em remissão, produz um retorno dos sintomas da depressão (MACHADO et al., 2008).

A venlafaxina foi utilizada como controle positivo para a AMPT, por se tratar de uma droga antidepressiva que possui mecanismo de ação que envolve a inibição da recaptação de serotonina e noradrenalina, ao inibir os transportadores de ambos os neurotransmissores (BERROCOSO et al, 2009; YILMAZ et al, 2011).

Em estudos preliminares de nosso laboratório foi administrado agonista de receptores NOP, SCH 221510 (SCH), juntamente com o BAN, na tentativa de bloquear a ação antidepressiva do antagonista. Os resultados mostraram que o SCH, quando coadministrado com BAN, reverteu os efeitos antidepressivos do último, o que indica uma ação direta de BAN sobre os receptores NOP, corroborando estudos anteriores que demonstraram a ação do tipo antidepressiva de drogas antagonistas de receptores NOP (GAVIOLI et al. 2003, GAVIOLI e CALO, 2006).

Sabendo-se do efeito do tipo antidepressivo do antagonista de receptores NOP quando administrado i.p. e do papel do hipocampo na patologia e nos tratamentos da depressão (GUIMARAES et al., 1993; GRAEFF et al., 1996; LATHE, 2001; JOCA et al., 2003), realizou-se, no presente estudo, o teste do nado forçado modificado (NFM)

em ratos com o objetivo de verificar se os receptores NOP presentes no hipocampo dorsal estariam envolvidos com o efeito tipo antidepressivo do BAN.

Com relação ao teste do NFM, os animais que receberam a implantação de cânulas guias intra-hipocampais, e tratados com salina, não apresentaram alterações significativas das respostas comportamentais registradas (imobilidade, natação e escalada), quando comparada ao grupo naive, indicando que o procedimento cirúrgico estereotáxico não afetou as respostas mensuradas.

O NFM fornece a possibilidade de se delinear os possíveis mecanismos de ação de drogas antidepressivas ao analisarem-se os comportamentos de escalada e natação dos animais. Vários estudos mostraram que os antidepressivos que possuem atividade serotoninérgica diminuem a imobilidade e aumentam o comportamento de natação (DETKE et. al., 1995; LUCKI, 1997), enquanto que o aumento do tempo de escalada é relacionado ao aumento da atividade das catecolaminas (PAGE et al., 1999; CRYAN et. al., 2002).

Os ratos que receberam microinjeções intra-hipocampais de BAN apresentaram um menor tempo de imobilidade, no NFM, em relação aos controles, nas três doses administradas (Figura 2), e também latência maior para o primeiro comportamento de imobilidade (Figura 2b), mostrando que o antagonismo dos receptores NOP no hipocampo dorsal está diretamente envolvido com os efeitos antidepressivos do BAN. Ainda, pode ser observado, que as doses de BAN de 1 e 10 nmol/0,2µl aumentaram de maneira significativa o tempo de escalada (Figura 2c), e não alteraram o tempo de natação, em relação ao grupo controle. Essa última observação sugere a participação catecolaminérgica nos efeitos do BAN, de acordo com a diferença das respostas comportamentais observadas no teste do NF modificado.

A administração intraperitoneal de α -metil-p-tirosina (AMPT) reverteu significativamente os efeitos anti-imobilidade (tipo antidepressivo) causados pelo BAN (intra-hipocampal) no NFM (Figura 3a), tanto na dose de 100 mg/kg quanto na de 200 mg/kg. Ainda, os ratos que receberam BAN e AMPT200 diminuíram significativamente o comportamento de escalada (Figura 3b) em relação aos animais que receberam BAN e salina, confirmando a evidência da participação catecolaminérgica na expressão dessa resposta. Como esperado, a AMPT administrada isoladamente não alterou as respostas comportamentais dos animais no teste do NFM, em relação ao grupo controle (salina), evidenciando a ausência de efeito dessa droga em indivíduos fisiologicamente normais.

Em resumo, os resultados obtidos no presente trabalho mostraram que o antagonismo sobre os receptores NOP produzem respostas do tipo antidepressiva e que o bloqueio da síntese de catecolaminas, tanto periféricamente como no hipocampo dorsal, bloqueou os efeitos do BAN. Assim, parece haver um importante papel do sistema catecolaminérgico envolvido nos mecanismos de ação subjacentes aos efeitos antidepressivos de drogas antagonistas de receptores NOP, no entanto, futuras investigações acerca da participação das catecolaminas, e mais especificamente da noradrenalina, ainda precisam ser realizadas.

6. CONCLUSÃO

O presente estudo confirmou os efeitos do tipo antidepressivo do antagonista de receptores NOP, BAN ORL 24, no Teste do Nado Forçado Modificado. Os animais tratados intra-HIPd com BAN mostraram uma diminuição significativa no tempo de imobilidade no NFM. Também se demonstrou que o sistema catecolaminérgico participa dos mecanismos de ação de BAN no Sistema Nervoso Central, mais especificamente no Hipocampo Dorsal. O tratamento com α -metil-p-tirosina administrada conjuntamente com BAN reverteu os efeitos do tipo antidepressivo do antagonista NOP significativamente, e diminuiu, também significativamente, o tempo de escalada dos animais submetidos ao NFM que receberam a maior dose de AMPT (200 mg/kg).

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Berton O, Nestler EJ. **New approaches to antidepressant drug discovery: beyond monoamines.** Nat Rev Neurosci 7(2): 137–151, 2006.

Bogdanova OV, Kanekar S, D'anci KE, Renshaw PF. **Factors influencing behavior in the forced swim test.** Physiology and Behavior, 118: 227-239, 2013.

Codagnone FT, Consoni FT, Rodrigues AL, Vital MA, Andreatini R. **Veratrine blocks the lamotrigine-induced swimming increase and immobility decrease in the modified forced swimming test.** Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry. 31(6): 1307-11, 2007.

Consoni FT, Vital MA, Andreatini R. **Dual monoamine modulation for the antidepressant-like effect of lamotrigine in the modified forced swimming test.** Eur Neuropsychopharmacol. 16(6): 451-8, 2006.

Cryan JF, Markou A, Lucki I. **Assessing antidepressant activity in rodents: Recent developments and future needs.** Trends in Pharmacological Sciences, v. 23, n. 5, p. 238 245, 2002.

Cryan JF, Mombereau C. **In search of a depressed mouse: utility of models for studying depression-related behavior in genetically modified mice.** Mol Psychiatry 9:326–357, 2004.

Detke MJ, Rickels M, Lucki I. **Active behaviors in the rat forced swimming test differentially produced by serotonergic and noradrenergic antidepressant.** Psychopharmacology, v. 121, p. 66 72, 1995.

Gavioli EC, Calo' G. **Nociceptin/orphanin FQ receptor antagonists as innovative antidepressant drugs.** Pharmacology & Therapeutics, In Press, Corrected Proof, 2013.

Gavioli EC & Calo G. **Antidepressant- and anxiolytic-like effects of nociceptin/orphanin FQ receptor ligands.** Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol. 372: 319–330, 2006.

Gavioli EC, Marzola G, Guerrini R, Bertorelli R, Zucchini S, De Lima TC, Rae GA, Salvadori S, Regoli D, Calo G. **Blockade of nociceptin/orphanin FQ-NOP receptor signaling produces antidepressant-like effects: pharmacological and genetic**

evidences from the mouse forced swimming test. Eur J Neurosci 17:1987–1990, 2003.

Gavioli EC, Vaughan CW, Marzola G, Guerrini R, Mitchell VA, Zucchini S, De Lima TC, Rae GA, Salvadori S, Regoli D, Calo' G. **Antidepressant-like effects of the nociceptin/orphanin FQ receptor antagonist UFP-101: new evidence from rats and mice.** Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol 369:547–553, 2004.

Girish C, Raj V, Arya J, Balakrishnan S. **Evidence for the involvement of the monoaminergic system, but not the opioid system in the antidepressant-like activity of ellagic acid in mice.** European Journal of Pharmacology 682: 118-125, 2012.

Goeldner C, Reiss D, Kieffer BL, Ouagazzal AM. **Endogenous nociceptin/orphanin-FQ in the dorsal hippocampus facilitates despair-related behavior.** Hippocampus 20:911–916, 2010.

Goodwin FK, Bunney Jr. WE. **Depressions following reserpine: a reevaluation.** Semin Psychiatry 3: 435-448, 1971.

Graeff FG, Guimaraes FS, Andrade TG, Deakin JF. **Role of 5-HT in stress, anxiety and depression.** Pharmacology, Biochemistry and Behavior 54: 129-141, 1996.

Guimaraes FS, Del Bel EA, Padovan CM, Netto SM, de Almeida RT. **Hippocampal 5-HT receptors and consolidation of stressful memories.** Behav Brain Res. 58 (1-2):133-9, 1993.

Heinricher MM. **Orphanin FQ/nociceptin: from neural circuitry to behavior.** Life Sci 73:813–822, 2003.

Jenck F, Moreau JL, Martin JR, Kilpatrick GJ, Reinscheid RK, Monsma FJ Jr, Nothacker HP, Civelli O. **Orphanin FQ acts as an anxiolytic to attenuate behavioral responses to stress.** Proc Natl Acad Sci USA 94:14854–14858, 1997.

Joca SR, Padovan CM, Guimarães FS. **Estresse, depressão e hipocampo.** Rev Bras Psiquiatr. 25 Suppl 2:46-51, 2003.

Kaster MP, Raupp I, Binfaré RW, Andreatini R, Rodrigues ANS. **Antidepressant-like effect of lamotrigine in the mouse forced swimming test: Evidence for the involvement of the noradrenergic system.** European Journal of Pharmacology 565: 119–124, 2007.

Lambert DG. **The nociceptin/orphanin FQ receptor: a target with broad therapeutic potential.** Nat Rev Drug Discov 7(8): 694–710, 2008.

Lathe R. **Hormone and hippocampus.** J Endocrinol 169:205-31, 2001.

Liu J, Qiao W, Yang Y, Ren L, Sun Y, Wang S. **Antidepressant-like effect of the ethanolic extract from *Suanzaorenhehuan* Formula in mice models of depression.** Journal of Ethnopharmacology 141: 257-264, 2012.

Lucki I. **The forced swimming test as a model for core and component behavioral effects of antidepressant drugs.** Behavioral Pharmacology 8: 523-532, 1997.

Machado DG, Bettio LEB, Cunha MP, Santos ARS, Pizzolatti MG, Brighente IMC, Rodrigues ALS. **Antidepressant-like effect of rutin isolated from the ethanolic extract from *Schinus molle* L. in mice: Evidence for the involvement of the serotonergic and noradrenergic systems.** European Journal of Pharmacology 587: 163–168, 2008.

Marti M, Stocchi S, Paganini F, Mela F, De Risi C, Calo' G, Guerrini R, Barnes TA, Lambert DG, Beani L, Bianchi C, Morari M. **Pharmacological profiles of presynaptic nociceptin/orphanin FQ receptors modulating 5-hydroxytryptamine and noradrenaline release in the rat neocortex.** Br J Pharmacol 138:91–98, 2003.

Mayorga AJ, Dalvi A, Page ME, Zimov-Levinson S, Hen R, Lucki I. **Antidepressant-like behavioral effects in 5-hydroxytryptamine_{1A} and 5-hydroxytryptamine_{1B} receptor mutant mice.** J. Pharmacol. Exp. Ther. 298: 1101–1107, 2001.

Mela F, Marti M, Ulazzi L, Vaccari E, Zucchini S, Trapella C, Salvadori S, Beani L, Bianchi C, Morari M. **Pharmacological profile of nociceptin/orphanin FQ receptors regulating 5-hydroxytryptamine release in the mouse neocortex.** Eur J Neurosci 19:1317–1324, 2004.

Meunier JC, Mollereau C, Toll L, Suaudeau C, Moisand C, Alvinerie P, Butour JL, Guillemot JC, Ferrara P, Monserrat B, Mazarguil H, Vassart G, Parmentier M, Costentin J. **Isolation and structure of the endogenous agonist of opioid receptor-like ORL1 receptor.** Nature 377:532–535, 1995.

Miller HL, Delgado PL, Salomon RM, Berman R, Krystal JH, Heninger GR, Charney DS. **Clinical and biochemical effects of catecholamine depletion on antidepressant-induced remission of depression.** Arch. Gen. Psychiatry 53: 117–128, 1996a.

Miller HL, Delgado PL, Salomon RM, Heninger GR, Charney DS. **Effects of α -methyl-para-tyrosine (AMPT) in drug-free depressed patients.** *Neuropsychopharmacology* 14: 151–157, 1996b.

Mogil JS and Pasternak GW. **The molecular and behavioral pharmacology of the orphanin FQ/nociceptin peptide and receptor family.** *Pharmacol Rev.* 53:381–415, 2001.

Mollereau C, Mouledous L. **Tissue distribution of the opioid receptor-like (ORL1) receptor.** *Peptides* 21:907–917, 2000.

Moran TD, Abdulla FA, Smith PA. **Cellular neurophysiological actions of nociceptin/orphanin FQ.** *Peptides* 21:969–976, 2000.

Neal CR Jr, Mansour A, Reinscheid R, Nothacker HP, Civelli O, Akil H, Watson SJ Jr. **Opioid receptor-like (ORL1) receptor distribution in the rat central nervous system: comparison of ORL1 receptor mRNA expression with (125)I-[(14)Tyr]-orphanin FQ binding.** *J Comp Neurol* 412:563–605, 1999.

Nemeroff, C. B., Owens, M. J.. **Treatment of mood disorders.** *Nat Neurosci* 5: 1068–1070, 2002.

Page ME, Detke MJ, Dalvi A, Kirby LG, Lucki I. **Serotonergic mediation of effects of fluoxetine, but not desipramine, in rat forced swimming test.** *Psychopharmacology* 167: 162-167, 1999.

Paxinos G & Watson C. **“The Rat Brain” In stereotaxic coordinates,** 2005.

Redrobe JP, Calo' G, Regoli D, Quirion R. **Nociceptin receptor antagonists display antidepressant-like properties in the mouse forced swimming test.** *Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol* 365:164–167, 2002.

Reinscheid RK, Nothacker HP, Bourson A, Ardati A, Henningsen RA, Bunzow JR, Grandy DK, Langen H, Monsma FJ Jr, Civelli O. **Orphanin FQ: a neuropeptide that activates an opioidlike G protein-coupled receptor.** *Science* 270:792–794, 1995.

Riedel G, Micheau J. **Function of the hippocampus in memory formation: desperately seeking resolution.** *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* 25:835-53, 2001.

Uchiyama H, Yamaguchi T, Toda A, Hiranita T, Watanabe S, Eyanagi R. **Involvement of the GABA/benzodiazepine receptor in the axiolytic-like effect of nociceptin/orphanin FQ.** European Journal of Pharmacology, 590:185–189, 2008.

Widerlov E, Lewander T. **Inhibition of the in vivo biosynthesis and changes of catecholamine levels in rat brain after α -methyl-p-tyrosine; time-and dose-response relationships.** Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol. 304: 111-123, 1978.

Zhen L, Zhu J, Zhao X, Huang W, An Y, Li S, Du X, Lin M, Wang Q, Xu Y, Pan J. **The antidepressant-like effect of fisetin involves the serotonergic and noradrenergic system.** Behavioral Brain Research, 228: 359-366, 2012.