

JOSY CAROLINA COVAN PONTES

NÍVEIS DE HIPOCRETINA-1 NO LÍQUIDO
CEFALORRAQUIDIANO DE RATOS TRATADOS
COM ANTIDEPRESSIVOS E EM UM MODELO
ANIMAL DE DEPRESSÃO

Tese apresentada à Universidade Federal de
São Paulo – Escola Paulista de Medicina,
para obtenção do Título de Mestre em
Ciências.

São Paulo

2008

Livros Grátis

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

JOSY CAROLINA COVAN PONTES

NÍVEIS DE HIPOCRETINA-1 NO LÍQUIDO
CEFALORRAQUIDIANO DE RATOS TRATADOS
COM ANTIDEPRESSIVOS E EM UM MODELO
ANIMAL DE DEPRESSÃO

Tese apresentada à Universidade Federal de
São Paulo – Escola Paulista de Medicina,
para obtenção do Título de Mestre em
Ciências.

Orientador: Prof. Dr. Sergio Tufik
Co-orientador: Prof. Dr. Mario Pedrazzoli

São Paulo

2008

JOSY CAROLINA COVAN PONTES

NÍVEIS DE HIPOCRETINA-1 NO LÍQUIDO CEFALORRAQUIDIANO DE RATOS
TRATADOS COM ANTIDEPRESSIVOS E EM UM MODELO ANIMAL DE
DEPRESSÃO.

Presidente da banca: Prof. Dr. _____

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. _____

Prof. Dr. _____

Prof. Dr. _____

Aprovada em: / / 2008.

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO PAULO
ESCOLA PAULISTA DE MEDICINA
DEPARTAMENTO DE PSICOBIOLOGIA**

Esta tese de mestrado foi realizada no Departamento de Psicobiologia da Universidade Federal de São Paulo (UNIFESP) / Escola Paulista de Medicina, no período de março de 2006 à março de 2008, com apoio financeiro da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), processo nº 05/58078-9; Centros de Pesquisa, Inovação e Difusão (CEPID) / FAPESP, processo nº 98/143003-3 e Associação Fundo de Incentivo à Psicofarmacologia (AFIP).

DEDICATÓRIA

DEDICATÓRIA (*in memorian*)

Dedico esta obra ao melhor avô do mundo Carlos Antônio Pontes que sempre foi e será muito presente em minha vida.

Vou trazê-lo comigo em todas as minhas vitórias!

Te amo!

DEDICATÓRIA

Dedico também este trabalho a umas das pessoas mais especiais e importantes que eu já conheci. Ao amigo, pai, irmão e filho Ritchie por ser estar sempre ao meu lado em todos os momentos.

Obrigada por fazer parte da minha vida.

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

5-HT	5-hidroxitriptamina (serotonina)
ACTH	Hormônio adrenocorticotrófico
AMPc	Adenosina monofosfato-cíclico
BDNF	Fator neurotrófico derivado do cérebro
CA	Corno de Amon
CREB	Elemento de ligação à proteína de resposta à AMPc
CRF	Fator liberador das corticotrofinas
DA	Dopamina
DAG	Diacilglicerol
DSM-IV	Classificação dos Transtornos Mentais IV
GABA	Ácido gama amino-butírico
hcrt-1	Hipocretina-1
hcrt-2	Hipocretina-2
Hcrtr-1	Receptor 1 das hipocretinas
Hcrtr-2	Receptor 2 das hipocretinas
HPA	Hipotálamo-Pituitária-Adrenal
IMAO	Inibidor da monoaminoxidase
IP3	Inositol trifosfato
LC	<i>Locus coeruleus</i>
LDT	Núcleo tegmental laterodorsal
LGN	Neurônios glutamatérgicos locais

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

MAO	Monoaminoxidase
NA	Noradrenalina
NREM	Não-REM (<i>Rapid Eye Movement</i>)
OX1R	Receptor 1 das orexinas
OX2R	Receptor 2 das orexinas
PKA	Fosfoquinase A
PPT	Núcleo tegmental pedúnculo-pontino
PVN	Núcleo paraventricular
REM	<i>Rapid Eye Movement</i>
RNA _m	Ácido ribonucléico (mensageiro)
SERT	Transportador de serotonina
SSRI	Inibidor Seletivo da Recaptação de Serotonina
VLPO	Núcleo pré-óptico ventrolateral
i.p.	Intraperitoneal

LISTA DE FIGURAS

	Pág.
Fig. 1: Esquema representando um neurônio monoaminérgico e os principais alvos do mecanismo de ação dos antidepressivos.....	06
Fig. 2: Esquema representativo da regulação do eixo HPA	10
Fig. 3: Efeitos do estresse e do tratamento antidepressivo no giro denteado e CA3 de ratos.....	12
Fig. 4: Mecanismos neurotróficos na depressão.....	15
Fig. 5: Cascata intracelular induzida pelo tratamento antidepressivo com conseqüente produção de BDNF.....	16
Fig. 6: Esquema que mostra a seqüência de aminoácidos das hipocretinas 1 e 2	25
Fig. 7: Esquema que representa o corte sagital de um córtex de rato mostrando a localização dos neurônios hipocretinérgicos e suas projeções	26
Fig. 8: Esquema representativo da prepró-hipocretina, seus peptídeos derivados, receptores e locais de maior expressão dos mesmos	28
Fig. 9: Vigília	32
Fig. 10: Sono NREM	33
Fig. 11: Sono REM	34
Fig. 12: Circuito “flip-flop”.....	40
Fig. 13: Coleta do líquido cefalorraquidiano.....	48
Fig. 14: Desenho experimental (experimento 1).....	50

	Pág.
Fig. 15: Desenho experimental (experimento 2).....	52
Fig. 16: Níveis de hipocretina-1 (pg/ml) em animais controle (tarde) e tratados com imipramina e fluoxetina	56
Fig. 17: Gráfico da média de consumo da solução de sacarose 1%..	61
Fig. 18: Níveis de hipocretina-1 (pg/ml)	63
Quadro 1: Critérios diagnósticos para depressão maior.....	01
Quadro 2: Mecanismos de ação dos antidepressivos.....	05
Quadro 3: Protocolo de estresse brando crônico	47

LISTA DE TABELAS

	Pág.
Tabela 1: Influência dos antidepressivos tricíclicos e inibidores da recaptação de serotonina nos níveis de serotonina e noradrenalina..	04
Tabela 2: Consumo da solução de sacarose (ml) do início do experimento até a segunda semana	59
Tabela 3: Consumo da solução de sacarose (ml) dos grupos controle, controle+imipramina, depressão e depressão+imipramina..	60

O papel fisiológico das hipocretinas no ciclo sono-vigília e principalmente na manutenção da vigília é bem estabelecido, assim como o seu envolvimento na fisiopatologia da narcolepsia. Pacientes narcolépticos com baixos níveis de hipocretina exibem depressão clínica e os pacientes com depressão maior apresentam diversas alterações na arquitetura do sono. Devido a essas evidências clínicas e ao possível efeito antidepressivo desses neuropeptídeos em ratos privados de sono REM, o objetivo desse estudo foi observar se há alterações nos níveis de hipocretina-1 no estado depressivo induzido num modelo animal e após o tratamento com drogas antidepressivas. Foram usados ratos da linhagem Wistar com 3 meses de idade e realizados dois experimentos: no primeiro, os animais foram tratados durante 21 dias com drogas antidepressivas (fluoxetina e imipramina) e no segundo os animais foram submetidos a um protocolo de estresse brando crônico utilizado como modelo animal de depressão e tratados com o antidepressivo tricíclico imipramina. No primeiro experimento observamos que somente os animais tratados com imipramina tiveram os níveis de hipocretina-1 aumentados. No segundo experimento, os animais submetidos ao modelo animal de depressão apresentaram níveis mais baixos de hipocretina, os quais aumentaram após tratamento com imipramina. Esses resultados sugerem que o sistema hipocretinérgico pode ser um dos fatores envolvidos na fisiopatologia da depressão e que drogas agonistas de hipocretina podem ter efeito antidepressivo.

Apoio financeiro: AFIP; FAPESP.

	Pág.
1. INTRODUÇÃO	
1.1. DEPRESSÃO.....	01
1.1.1. As monoaminas.....	03
1.1.2. O hipocampo.....	08
1.1.3. Os fatores neurotróficos.....	13
1.1.4. O sistema de recompensa do cérebro.....	18
Núcleo <i>accumbens</i>	19
Amígdala.....	21
Hipotálamo.....	22
1.2. AS HIPOCRETINAS.....	24
1.2.1. Funções das hipocretinas.....	29
<i>Promoção da vigília</i>	30
<i>Estabilidade da vigília</i>	37
1.3. HIPOCRETINAS E DEPRESSÃO	42
2. OBJETIVOS	
2.1. Objetivo geral	45
2.2. Objetivos específicos	45
3. MATERIAIS E MÉTODOS	
3.1. Animais	46
3.2. Protocolo de Estresse Brando Crônico (EBC)	46
3.3. Coleta de líquido cefalorraquidiano	48
3.4. Dosagem de hipocretina-1.....	49
3.5. Procedimentos experimentais	50
3.5.1. Experimento 1	50
3.5.2. Experimento 2	51
3.6. Análise estatística	54

	Pág.
4. RESULTADOS	
4.1. Experimento 1	55
4.1.1. Níveis de hipocretina-1	55
4.2. Experimento 2	57
4.2.1. Consumo de solução de sacarose 1%	57
4.2.2. Níveis de hipocretina-1	62
5. DISCUSSÃO	
5.1. Modelo animal de depressão	64
5.2. Variação dos níveis de hipocretina-1	66
1.2. AS HIPOCRETINAS.....	24
6. CONCLUSÕES	70
7. ANEXOS	71
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	73

AGRADECIMENTOS

AO MEU TRONCO ENCEFÁLICO: Responsável pela minha existência e pelas minhas funções vitais.

Ao meu pai (bulbo), por ser meu maior exemplo de dignidade, honestidade e força. Obrigada por tudo!

À minha mãe (ponte), por ser a mãe mais estressada e doce ao mesmo tempo. Por não me deixar desistir de nada e estar ao meu lado sempre! Essa tese também é sua!

Às minhas irmãs Vivian e Thaís (mesencéfalo), por serem as melhores irmãs do mundo, vocês são o meu maior tesouro.

AO MEU CEREBELO: Por me coordenar nessa fase importante da minha vida.

Ao meu orientador e ídolo Sergio Tufik pelo exemplo de profissionalismo e dedicação incansável.

AOS MEUS NÚCLEOS DA BASE: Pelo ajuste fino de cada passo dessa fase.

Co-orientador, amigo e conselheiro Mario Pedrazzoli pela oportunidade, pela confiança, pela imensa ajuda e principalmente por ser a escada no meu conhecimento científico. Obrigada por tudo!

AO MEU HIPOCAMPO: Por me lembrar de tudo, mesmo quando o meu próprio hipocampo não funcionava.

À secretária mais elegante da UNIFESP Nereide (CA1) pela imensa ajuda e por me lembrar dos prazos sempre com uma paciência invejável.

Ao pessoal do laboratório (CA3): Renata (minha irmã bipolar), Kimura, Ana, Lhoyane, Flávia, Máyra.

À amiga e exemplo Danyella Pereira (meu giro denteado) pelos ensinamentos, pelas dicas e por ser o meu hipocampo durante todo o mestrado. Você é o meu exemplo! Obrigada!

À MINHA ÁREA TEGMENTAL VENTRAL: Responsável pelos momentos mais intensos de alegria e prazer, nos quais fiquei viciada.

Meus amigos: Alexandre (Anão), Luciana (Mini), Ricardo (Dangola), Celso (Celsinho), Patrícia (Patyzinha), Henrique (Kta), Rafael, Marcos (Farofa), Fábio (Xavas), Lucas (Lucão), Fernanda Giusti, Cláudio (Dinho), Júlia, Jaque, Fernanda (Tic-Toc), Felipe (Filão), Jorge, Luana (Peliço), Jú Camilo, Hemano, Muriel (Gina), Marina (Zaca), César (Tio Chuca), Gabi (Pinhal), Rudy (Smiters), Alexandre (Negô), Carolina (Pudim), Thiago (Bórris), Veri, Eduardo (Dudu), Rodrigo (Digo) e Fábio (Peixe) por regarem dopamina no meu núcleo *accumbens*.

AO MEU CÓRTEX PRÉ-FRONTAL:

À Rosa pelos cafés e intervalos mais culturais e cientificamente produtivos dos últimos dois anos.

Aos eternos mestres e grandes incentivadores: Emílio Sciamarella, Sebastião Faria Jr., Alexandre Rego, Fernando Mazzilli Louzada e Eduardo Bondan.

Ao amigo Fábio Moreira pela inestimável ajuda durante o estágio probatório e no início do mestrado.

Ao amigo Wolfson (e seu apelido inadmissível em uma tese de mestrado) pelas longas conversas e pelos “papos-cabeça”.

Ao amigo Fábio Nascimento por estar sempre comigo (mesmo à distância).

Ao professor Maia (Didática) por renovar de maneira tão cativante minha vontade de ensinar.

Aos amigos Cláudio e Firagi pelos valiosos conselhos. Obrigada!

Às professoras Gaby e Débora Suchecki, das quais sou fã incondicional.

AO MEU CITOESQUELETO (DEPARTAMENTAL): Pela ajuda estrutural durante todo o mestrado.

Diva, Tomé, Marilde, Márcio, Júlio, Valéria, Laurinha, Ricardo, Zé, Daniela (estatística), Vinicius, Danilo, Kleber.

E aos amigos: Nadine, Andrezza (minha irmã gêmea), Carlota, Thiago, Dubiela, Godói, Karina (quase linda), japonesas (Suzy e Shirley ou vice-versa), Gabyzinha, Lyvia, Grazi, Pessoal do CEPE, Sergio, Bruna, Karin, Tati, Nessa, Calegare, Fusuê, Letícia, Adriano, Isabela.

E aos professores: Mônica, José Roberto Leite, Nylson, Débora Hipólide.

AOS MEUS ASTRÓCITOS: Por me darem sustentação.

À *mama* Gordi por me adotar com tanto carinho e me acolher durante grande parte do meu mestrado.

Aos meus “irmãozinhos” Gonzalo (Broto) e Zé Mauro por me aturarem na fase final da redação desta tese.

AOS MEUS NÚCLEOS DA RAFAE: Por ser minha fonte maciça e interminável de serotonina:

- Mariane Domeneghetti, minha parceira de todas as horas.
- Neto, por sempre estar ao meu lado e pela confiança incondicional. Amo você!
- Luís Henrique (Zulmira) por ser minha fonte de serotonina e sinônimo de bem-estar só por sua presença.
- Evaristo, por simplesmente ser o amigo com o maior coração do universo.
- Daniel (Pipeta), minha versão masculina.
- minha “mãe” Veridiana (Skond) pelo carinho e pelos doces cuidados maternos.
- Balão, por ser um amigo pra todas as horas, obrigada!
- Daniel, por tornar tudo mais engraçado e divertido.
- Rafael, por sempre me apoiar em minhas decisões desde a faculdade e por sempre acreditar em mim.

AO MEU NÚCLEO *ACCUMBENS*: Ricardo (Cotonete) que acompanhou tudo desde o início e sempre me deu conselhos e idéias brilhantes. A única criatura da face da Terra com paciência pra me escutar horas falando de cérebro, neurônios e neurotransmissores. Obrigada Kbeça!

AO MEU CÓRTEX OCCIPITAL: Por enxergarem meu caminho mesmo antes de trilhá-lo: Juliana Ciandella, Melissa, Shelly, Rafael, Igor, Giotto, Giovanna, Juzinha Bittar.

AO MEU GABA: Bruna Del Vecchio, por me inibir algumas vezes e por me permitir despolarizar de vez em quando, essa inibição foi essencial pro meu crescimento profissional e emocional. Amo você incondicionalmente.

Agradeço também a uma das pessoas mais importantes da minha vida, pois estive sempre ao meu lado, tanto na vida acadêmica quanto no mestrado:

Nathalie Lima Dadá (Sula)

Por ser meu orgulho, minha parceira e por me mostrar todos os dias o sentido verdadeiro da palavra AMIZADE! Obrigada por fazer parte da minha vida!

1.1. Depressão

Os transtornos do humor são as mais prevalentes formas de distúrbios psiquiátricos. As formas mais severas de depressão afetam de 2 a 5% da população americana e mais de 20% apresenta a forma mais branda (Blazer, 2000 *apud* Nestler *et al.*, 2002).

Desde a década de 60, a depressão tem sido diagnosticada baseada nos critérios diagnósticos do *Diagnostic and Statistical Manual IV* (DSM-IV). Os casos mais brandos são classificados como distímia, embora não exista uma distinção clara entre as duas. Diferente da maioria das patologias, o diagnóstico da depressão é baseado em sintomas (Quadro 1) e não em exames diagnósticos.

Quadro 1: Critérios diagnósticos para depressão maior.

Humor deprimido

Irritabilidade

Baixa auto-estima

Sentimentos de desesperança, desvalorização e culpa

Diminuição ou aumento do apetite

Perda ou ganho de peso

Insônia ou hipersonia

Pouca energia, fadiga ou agitação

Diminuição do interesse por estímulos prazerosos (anedonia)

Pensamentos recorrentes de morte e suicídio

Fonte: DSM-IV (2000).

A depressão não deve ser vista como uma doença simples, mas como um transtorno do humor de causa multifatorial e fisiopatologia complexa. Devido a essa complexidade, surgiram diversas teorias e hipóteses que tentavam explicar como se estabelecia a depressão. Por isso, a pesquisa da depressão teve, no decorrer das décadas, diversos focos:

- As monoaminas;
- O hipocampo;
- Os fatores neurotróficos;
- O sistema de recompensa do cérebro.

Baseado nisso se propunha uma teoria, que posteriormente recebia críticas e as pesquisas tomavam um rumo diferente, encontrava-se um novo foco, uma nova hipótese e mais críticas. Entretanto, todas as hipóteses e teorias não são idéias completamente desconexas, elas se completam. Porém, são necessárias ainda muitas décadas de pesquisa para um melhor entendimento dos circuitos neurais que controlam o humor em condições normais e como ocorrem as alterações observadas na depressão e em outros transtornos do humor.

1.1.1. As monoaminas

A história do tratamento da depressão começou na década de 50, durante a qual foi desenvolvido um fármaco para o tratamento da tuberculose. O tratamento com esse fármaco melhorava os sintomas de humor em pacientes com tuberculose e depressão. Um ano depois, descobriu-se que este medicamento era capaz de inibir a enzima de degradação das monoaminas - a monoaminoxidase (MAO) (Delay *et al.*, 1952 *apud* Nestler *et al.*, 2002).

Poucos anos depois, o antidepressivo imipramina, um composto tricíclico com estrutura semelhante ao antipsicótico clorpromazina foi descoberto acidentalmente. Estes agentes farmacológicos possuem a capacidade de inibir a recaptação de noradrenalina (NA) e serotonina (5-HT) pelo neurônio pré-sináptico. Alguns antidepressivos tricíclicos bloqueiam a recaptação de noradrenalina e serotonina (imipramina e amitriptilina), outros são mais seletivos no bloqueio da recaptação de 5-HT (clormipramina) ou NA (desipramina) (Tabela 1) (Millan *et al.*, 2000).

Tabela 1: Influência dos antidepressivos tricíclicos e inibidores da recaptação de serotonina nos níveis de serotonina e noradrenalina.

Classe	Princípio ativo	Dose (mg/kg)	5-HT	NA
SSRI	Fluoxetina	10,0	↑↑	↑
SSRI	Citalopram	2,5	↑↑	0
SSRI	Paroxetina	10,0	↑↑	↑
SSRI	Sertralina	10,0	↑↑	↑
SSRI	Duloxetina	5,0	↑	↑↑
SSRI	Venlafaxina	10,0	↑↑	↑↑
Tricíclico	Clormipramina	10,0	↑↑	↑↑↑
Tricíclico	Imipramina	10,0	↑	↑↑

Legenda: ↑ aumento de 150 a 250% comparado as níveis basais (definido como 100%), ↑↑ aumento de 250 a 400% e ↑↑↑ aumento superior a 400%. **Fonte: Adaptado de Millan et al., 2000.**

Depois dessas descobertas, surgiram diversos antidepressivos (Quadro 2), incluindo os inibidores seletivos da recaptação de serotonina (*Serotonin-selective reuptake inhibitors* - SSRIs) (paroxetina e fluoxetina) que foram introduzidos na década de 90 (Fuller, 1995).

Embora essas classes de fármacos sejam de estruturas químicas diferentes e atuem em lugares diferentes nos neurônios monoaminérgicos, todos eles possuem uma propriedade em comum, aumentar os níveis das monoaminas na sinapse de maneira aguda. Alguns antidepressivos (tricíclicos, SSRIs e inibidores da recaptação da NA) bloqueiam a recaptação de certas monoaminas, aumentando sua disponibilidade na sinapse. Outros, como os inibidores da MAO (IMAOs) inibem o metabolismo intraneuronal das monoaminas pela inibição da MAO, aumentando a quantidade de monoaminas estocadas nas vesículas e liberadas por exocitose na fenda sináptica (Fig. 1) (Svensson, 2000).

Quadro 2: Mecanismos de ação dos antidepressivos.

Tipo de Tratamento	Mecanismo de Ação
<i>Medicamentoso</i>	
Tricíclicos	Inibição da recaptação de serotonina e noradrenalina
Inibidores seletivos da recaptação de serotonina (ISRSs)	Inibição seletiva da recaptação de serotonina
Inibidores da recaptação de noradrenalina (IRNs)	Inibição seletiva da recaptação de noradrenalina
Inibidores da recaptação de serotonina e noradrenalina (IRSNs)	Inibição da recaptação de serotonina e noradrenalina
Inibidores da MAO	Inibição da MAO _A . Inibição da MAO _B não possui efeito antidepressivo.
Lítio	Possui muitas ações moleculares (inibição da fosfatidil inositol fosfatase, adenil ciclases, quinase glicogênio sintase 3 β e proteínas G). Porém, como essas ações são responsáveis pelos efeitos antidepressivos permanece desconhecido.
Antidepressivos atípicos	Desconhecido. Embora essas drogas tenham mecanismos monoaminérgicos (por exemplo, bupropiona inibe a recaptação de dopamina, mirtazapina é antagonista de α_2 , a tianeptina é um ativador de recaptação monoaminérgica), estas ações não estão envolvidas no efeito antidepressivo.
<i>Não medicamentoso</i>	
Terapia eletroconvulsiva	Estimulação cerebral generalizada
Estimulação eletromagnética	Indução de correntes elétricas e despolarização neuronal
Estimulação vagal	Desconhecido
Psicoterapias	Mecanismo exato ainda desconhecido. Envolve aprendizagem de novas maneiras de como lidar com os problemas

Fonte: Adaptado de Berton & Nestler, 2006.

Por outro lado, fármacos que causam depleção monoaminérgica (por exemplo, o anti-hipertensivo reserpina) podem induzir depressão (Goodwin & Bunney, 1971).

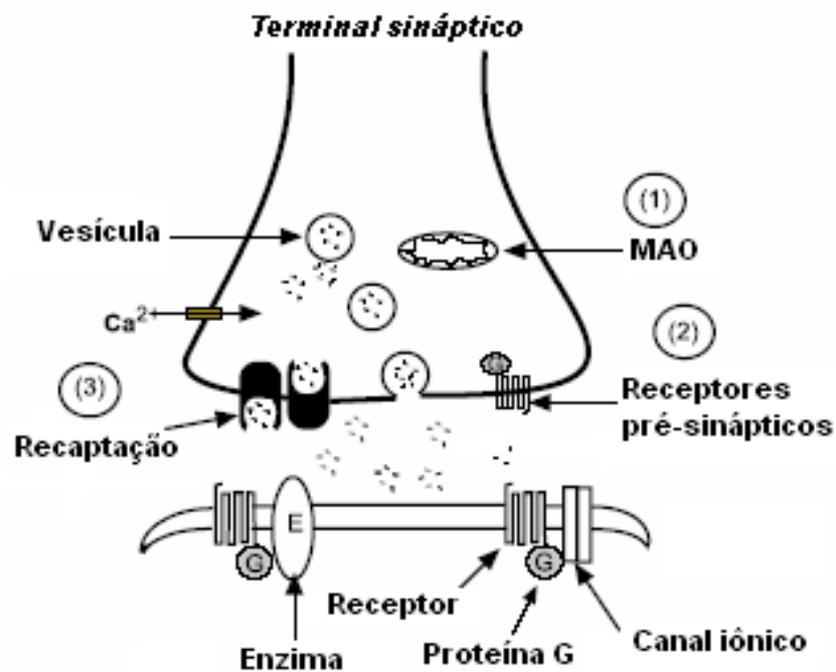


Figura 1: Esquema representando um neurônio monoaminérgico e os 3 principais alvos do mecanismo de ação dos antidepressivos (Modificado de Elhwuegi, 2004).

Por meio da observação que a depressão pode ser tratada com estes medicamentos, pode-se suspeitar da fisiopatologia da depressão baseada no mecanismo de ação desses fármacos. A teoria monoaminérgica propunha que a depressão ocorria devido a uma deficiência na atividade monoaminérgica cerebral e que poderia ser tratada com drogas que aumentassem essa atividade (Schildkraut, 1965).

Porém, essa teoria sofreu diversas críticas, pois não explicava vários fatos (Baldessarini, 1989):

- *Drogas como cocaína e anfetamina aumentam a atividade monoaminérgica, mas não são clinicamente efetivas como antidepressivos;*
- *Nem todos os pacientes com depressão respondem a todos os antidepressivos;*
- *As mudanças nos níveis de monoaminas na sinapse ocorrem em algumas horas depois da administração do antidepressivo, mas a resposta terapêutica requer a administração contínua por semanas.*

1.1.2. O Hipocampo

Um mecanismo pelo qual o cérebro reage ao estresse agudo ou crônico é a ativação do eixo hipotálamo – pituitária (hipófise) – adrenal (HPA). Os neurônios do núcleo paraventricular (*paraventricular nucleus* - PVN) do hipotálamo secretam o fator liberador das corticotrofinas (*corticotropin-releasing factor* - CRF), o qual estimula a síntese e liberação do hormônio adrenocorticotrófico (*adrenocorticotropin hormone* – ACTH) pela pituitária anterior (adenohipófise). O ACTH por sua vez, estimula a síntese e a liberação de glicocorticóides (cortisol, nos humanos; corticosterona, nos roedores) pela camada cortical da glândula adrenal. Os glicocorticóides exercem efeitos no metabolismo e também afetam o comportamento, pois atuam em diversas regiões cerebrais (Nemeroff, 1996; Pariante & Miller, 2001).

A atividade do eixo HPA é controlada por várias vias cerebrais, incluindo o hipocampo (o qual exerce uma influência inibitória nos neurônios do PVN que secretam o CRF) e a amígdala (que exerce uma influência excitatória direta) (Fig. 2) (Sapolsky, 2000).

Os glicocorticóides, por regularem os neurônios hipocampais e do PVN, exercem um poderoso *feedback* no eixo HPA. Níveis de glicocorticóides um pouco acima do normal podem aumentar a inibição hipocampal e da atividade do eixo HPA. Isso pode também aumentar a função hipocampal e promover certas habilidades cognitivas. Porém, um aumento sustentado de glicocorticóides, observado em situações de estresse severo e/ou prolongado pode danificar os neurônios hipocampais, principalmente os neurônios piramidais da região 3 do corno de Amon (CA3) (Bremner *et al.*, 2000). A natureza precisa do dano ainda permanece desconhecida, mas pode envolver uma redução na arborização dendrítica e uma perda de espinhas dendríticas altamente especializadas onde estes neurônios recebem sinapses glutamatérgicas (McEwen, 2000; Sapolsky, 2000).

O estresse e a hipercortisolemia resultante também reduz a formação de novos neurônios da camada granular no giro denteado do hipocampo (Fuchs & Gould, 2000).

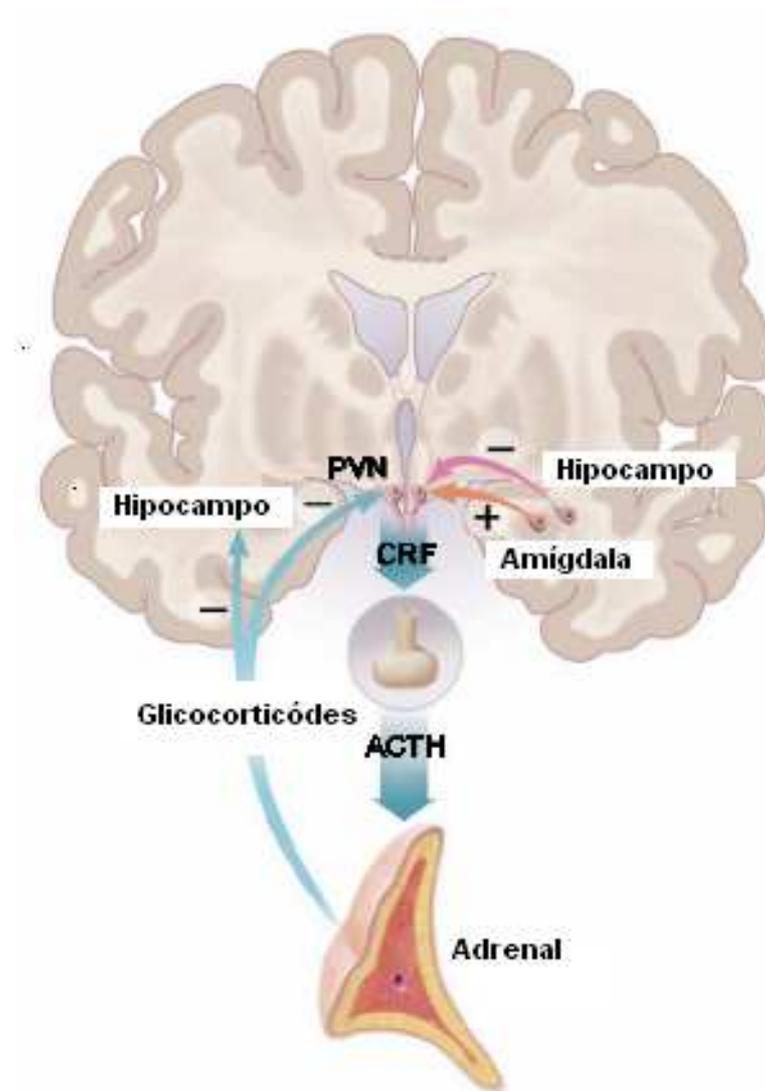


Figura 2: Esquema representativo da regulação do eixo HPA. Os neurônios do núcleo paraventricular (PVN) recebem aferências excitatórias da amígdala e inibitórias do hipocampo. O fator liberador das corticotrofinas (CRF) é liberado por estes neurônios, que estimula a adenohipófise a liberar o hormônio adrenocorticotrófico (ACTH). O ACTH por sua vez, estimula a adrenal a liberar os glicocorticóides que inibem a síntese e liberação do CRF e do ACTH (Modificado de Nestler *et al.*, 2002).

Independente da natureza do dano, o estresse parece reduzir o controle inibitório que o hipocampo exerce sobre o eixo HPA, o qual pode aumentar os níveis de glicocorticóides circulantes e conseqüentemente danificar o hipocampo. Tal *feedback* positivo com conseqüências patológicas tem sido associado à fisiopatologia da depressão. Uma ativação anormal do eixo HPA é observada em aproximadamente metade dos indivíduos com depressão e esta alteração é revertida com o tratamento antidepressivo (Arborelius *et al.*, 1999; Holsboer, 2001).

Em modelos animais, várias classes de antidepressivos revertem os efeitos de diminuição de arborização dendrítica e de neurônios piramidais do hipocampo induzidos pelo estresse (Fig. 3) (Kuroda & McEwen, 1998; Norrholm & Ouimet, 2001; Dranovsky & Hen, 2006).

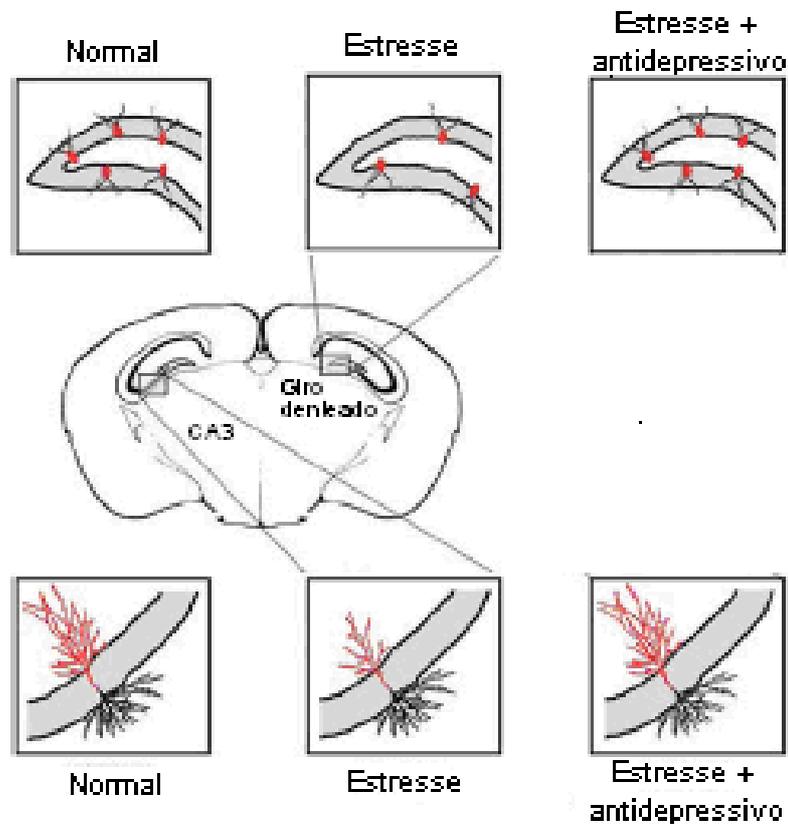


Figura 3: Efeitos do estresse e do tratamento antidepressivo no giro denteado e CA3 de ratos. O esquema mostra um corte coronal do cérebro. Os quadros na parte superior mostram o giro denteado do hipocampo com novos neurônios resultantes do tratamento antidepressivo após a redução neuronal devido ao estresse. Os quadros da parte inferior da figura mostram um neurônio piramidal do CA3 com projeções apicais (vermelho) e basais (cinza). O estresse reduz a arborização dos dendritos apicais e esse efeito é revertido pelo tratamento antidepressivo com tianeptina (Modificado de Dranovsky & Hen, 2006).

Baseado na função exercida pelo hipocampo em condições normais, um dano nessa região pode contribuir com algumas anormalidades cognitivas observadas na depressão. O tratamento antidepressivo pode atuar na reversão dessas alterações através de mecanismos celulares e moleculares induzidos pelo aumento da neurotransmissão monoaminérgica.

1.1.3. Os fatores neurotróficos

Os efeitos patológicos do estresse no hipocampo têm contribuído para uma hipótese recente, que propõe um papel para os fatores neurotróficos na fisiopatologia da depressão e no seu tratamento (Duman *et al.*, 1997; Altar, 1999).

Os fatores neurotróficos foram inicialmente caracterizados por regularem o crescimento neural e a diferenciação durante o desenvolvimento, porém, atualmente sabe-se que eles também são importantes reguladores de plasticidade de neurônios e células da glia. A hipótese neurotrófica da depressão propõe que uma deficiência no suporte neurotrófico pode contribuir com a alteração hipocampal durante o desenvolvimento da depressão. Esta hipótese está focada no *brain-derived neurotrophic factor* (BDNF), um dos fatores neurotróficos mais abundantes no cérebro adulto. Estresse agudo ou crônico diminui os níveis de BDNF no giro denteado e na camada piramidal do hipocampo. Essa redução parece ser mediada parcialmente via glicocorticóides induzidos pelo estresse e parcialmente por outros mecanismos ainda desconhecidos (Smith *et al.*, 1995).

A administração crônica de todas as classes de antidepressivos aumenta a expressão de BDNF em regiões hipocâmpais e pode prevenir a diminuição de BDNF induzida pelo estresse (Nibuya *et al.*, 1995). Segundo Shirayama *et al.* (2002) a administração de BDNF no giro denteado e no CA3 produz efeitos antidepressivos em ratos submetidos ao teste de nado forçado.

O aumento de BDNF pelo tratamento antidepressivo é, em parte, mediado pelo fator de transcrição *cAMP response element binding protein* (CREB) (Fig. 4) (Nair & Vaidya, 2006).

Juntos, esses achados confirmam a possibilidade de que o aumento dos níveis de BDNF induzido pelo tratamento antidepressivo pode ajudar no reparo dos danos a neurônios hipocâmpais induzidos pelo estresse e protegem estes de futuros danos. Esse fato pode explicar porque a resposta terapêutica aos antidepressivos é crônica, pois seria necessário um tempo para que os níveis de BDNF gradualmente aumentassem e exercessem seu efeito neurotrófico (Fig. 5).

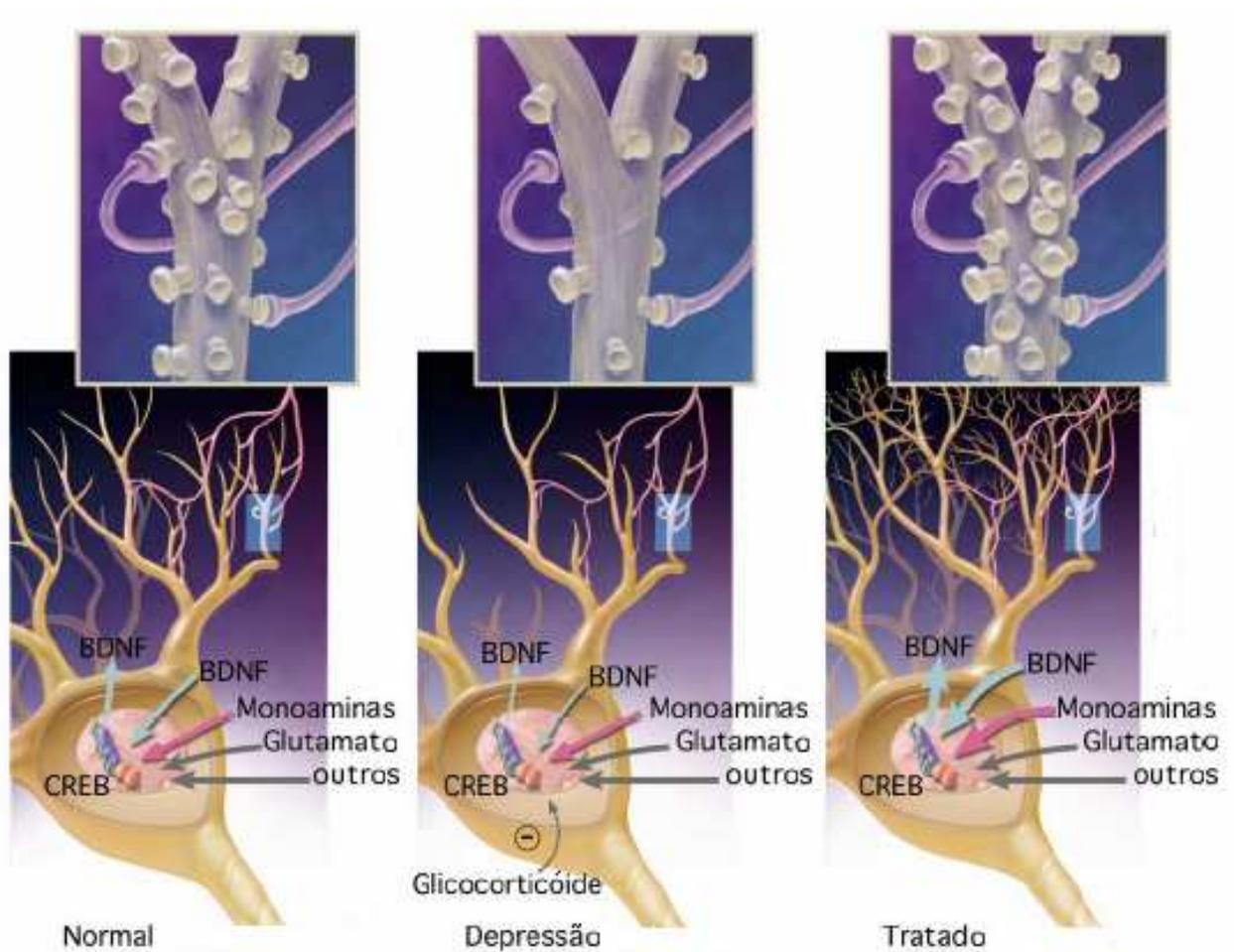


Figura 4: Mecanismos neurotróficos na depressão. A figura à esquerda mostra um neurônio piramidal, suas aferências monoaminérgicas, glutamatérgicas e de outros neurônios e sua regulação pelo BDNF. A figura central mostra que a depressão causa mudanças nesse neurônio incluindo uma redução na arborização dendrítica e na expressão de BDNF (que pode ser um dos fatores responsáveis pelos efeitos causados nos dendritos). A redução de BDNF é mediada parcialmente pelo aumento excessivo dos glicocorticóides, o qual pode interferir com os mecanismos transcricionais (como o CREB) que controlam a expressão de BDNF. Como mostrado na figura à direita os antidepressivos possuem um efeito oposto: aumentam a arborização dendrítica e a expressão de BDNF nos neurônios hipocâmpais (Modificado de Nestler *et al.*, 2002).

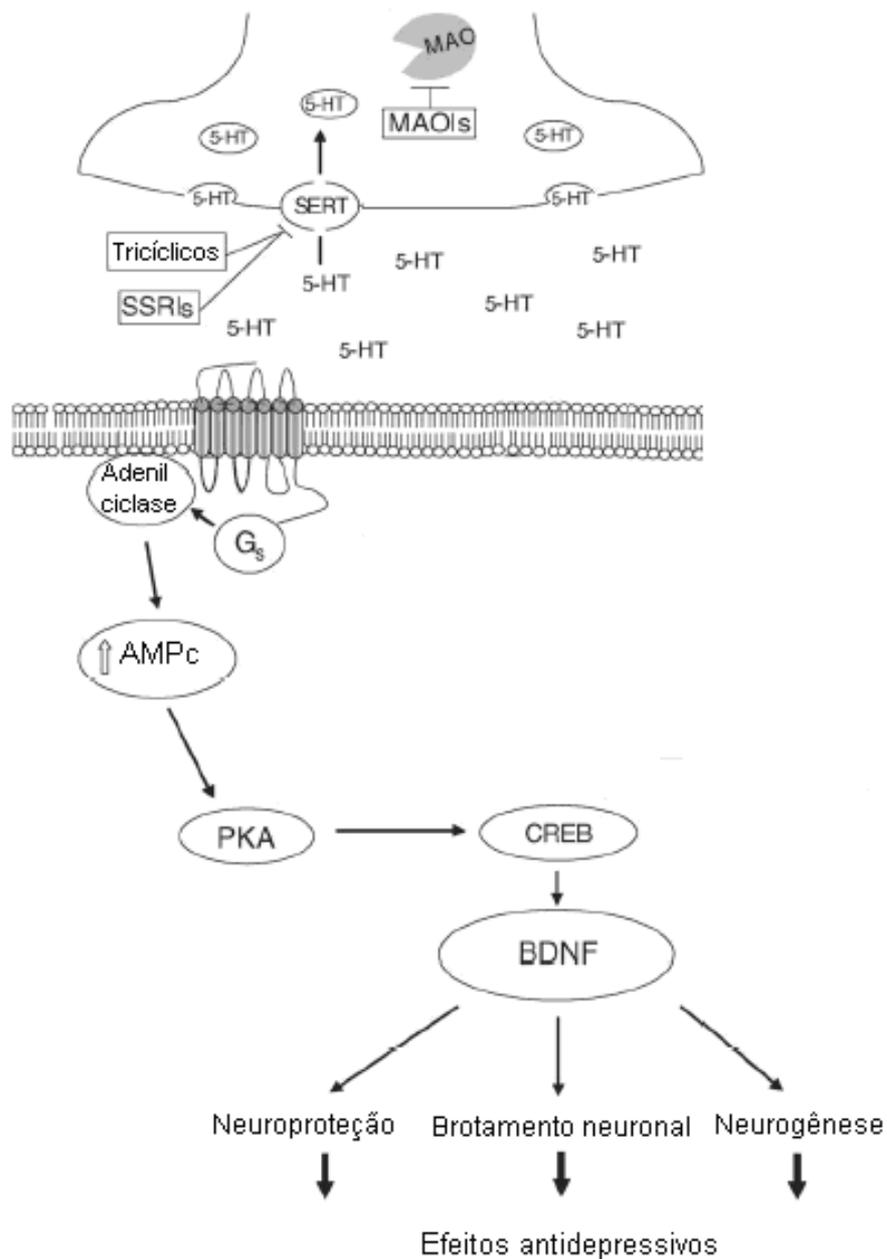


Figura 5: Cascata intracelular induzida pelo tratamento antidepressivo com conseqüente produção de BDNF. A maioria dos antidepressivos aumenta os níveis sinápticos de monoaminas como a noradrenalina e a serotonina pelo bloqueio da degradação enzimática pela MAO ou pelo bloqueio da recaptação do neurotransmissor através do transportador (SERT). Isso leva a ativação da proteína G_s, produção de AMPc e ativação da proteína quinase A (PKA) a qual resulta na expressão de BDNF através do CREB (Modificado de Alt *et al.*, 2006).

Porém, alguns estudos mostram resultados que contestam essa teoria:

- *Kuroda & McEwen (1998) relataram que a habilidade dos antidepressivos em reverter as alterações dendríticas em CA3 causadas pelo estresse não é mediada pelo BDNF.*
- *Camundongos knockout para CREB que não apresentam indução de BDNF no hipocampo, quando submetidos ao teste de nado forçado e tratados apresentam respostas antidepressivas normais (Conti et al., 2002).*

1.1.4. O sistema de recompensa do cérebro

Recentemente, têm aumentado o reconhecimento da importância do papel exercido por algumas estruturas subcorticais na regulação da motivação, sono, apetite, balanço energético, ritmos circadianos e respostas aos estímulos prazerosos e aversivos. Alterações desses processos fisiológicos e comportamentais são freqüentemente observadas na depressão, segundo os critérios diagnósticos mostrados pelo DSM-IV (2000). Estruturas como o núcleo *accumbens* (NAc), o hipotálamo e a amígdala são importantes no controle do humor, o que sugere uma participação na fisiopatologia da depressão.

Núcleo accumbens

O núcleo *accumbens* é o alvo do sistema dopaminérgico mesolímbico. Este núcleo recebe projeções axonais que se originam na área tegmental ventral (*ventral tegmental area* – VTA) que também se projetam para outras estruturas límbicas, incluindo a amígdala e regiões límbicas do neocórtex. Este núcleo e seus *inputs* dopaminérgicos exercem um papel importante no mecanismo de recompensa. Todas as drogas de abuso aumentam a transmissão dopaminérgica no NAc, o qual participa dos efeitos de prazer e recompensa causados pelas drogas (Koob *et al.*, 1998; Wise, 1998).

As drogas de abuso ativam o CREB no NAc, esse aumento da atividade do CREB nesta região diminui a responsividade a outros estímulos, enquanto que a diminuição de CREB possui um efeito oposto (Carlezon *et al.*, 1998; Berke & Hyman, 2000; Nestler, 2001).

Segundo Pliakas *et al.* (2001) o aumento de CREB no NAc também ocorre na resposta ao estresse agudo e crônico. Juntos, esses achados sugerem que o CREB no NAc controla a responsividade comportamental a estímulos emocionais em geral, pois o aumento de CREB observado após o estresse ou a exposição a uma droga pode contribuir em sintomas como a anedonia, observada na depressão, no estresse pós-traumático ou em crises de abstinência a drogas de abuso. O gene que codifica o peptídeo opióide dinorfina pode ser um alvo no qual o CREB produz esse fenótipo comportamental (Carlezon *et al.*, 1998; Pliakas *et al.*, 2001).

É importante notar que a ação do CREB no NAc é diferente de sua ação no hipocampo. Neste último, o CREB induz um aumento de BDNF que exerce seu efeito neurotrófico e conseqüentemente um efeito antidepressivo. Enquanto que no NAc, o CREB produz efeitos como recompensa às drogas de abuso e a anedonia, efeitos estes potencializados pelo BDNF. Isso pode explicar porque camundongos *knockout* para CREB apresentam respostas antidepressivas normais em alguns testes comportamentais (Conti *et al.*; 2002).

Dessa forma, uma molécula pode exercer diferentes papéis em regiões cerebrais distintas, baseados nos diferentes neurônios e em quais circuitos neurais eles estão inseridos.

Amígdala

Os sintomas de ansiedade, medo e respostas anormais a estímulos prazerosos são comuns em muitos indivíduos com depressão (DSM-IV).

A amígdala é uma estrutura amplamente conhecida por sua atuação na respostas de medo condicionado. A informação relacionada ao medo chega à amígdala através dos núcleos basal e lateral, esses núcleos projetam para o núcleo central que projeta fibras (glutamatérgicas ou contendo CRF) para várias regiões cerebrais produzindo os diversos efeitos fisiológicos e comportamentais característicos das respostas de medo. Essas projeções incluem: substância cinzenta periaquedutal, hipotálamo lateral, PVN e vários núcleos monoaminérgicos. Outras regiões cerebrais como o núcleo septal e a *stria terminalis*, que são anatômica e funcionalmente relacionadas à amígdala, também são importantes para as respostas de medo e ansiedade (LeDoux, 2000).

O estresse diminui a expressão de BDNF na amígdala, assim como ocorre no hipocampo, porém o mecanismo envolvido e suas conseqüências funcionais permanecem desconhecidos (Smith *et al.*, 1995).

Hipotálamo

O hipotálamo é uma estrutura diencefálica altamente complexa que possui muitas funções neuroendócrinas e neurovegetativas. Apesar de ser estudado na depressão em virtude do eixo HPA, diversas regiões hipotalâmicas que liberam outros neuropeptídeos (que participam do controle do apetite, sono, ritmos circadianos) permanecem pouco exploradas.

Diversos neuropeptídeos relacionados à alimentação podem estar envolvidos na fisiopatologia da depressão.

- O CRF, fator importante na resposta no eixo HPA, é também um potente anorexígeno (Arborelius *et al.*, 1999; Holsboer, 2001).
- O hormônio concentrador de melanina (*melanin concentrating hormone* – MCH), expresso no hipotálamo lateral é um potente orexígeno, aumenta o comportamento sexual e reduz a ansiedade. Seu receptor é abundante no NAc (Ahima & Osei, 2001; Monzon *et al.*, 2001; Saito *et al.*, 2001).
- A melanocortina (expressa no hipotálamo medial) é um peptídeo anorexígeno e também aumenta o comportamento de ansiedade. O NAc e o estriado dorsal possuem muitos receptores para melanocortina (Hsu *et al.*, 2005)

- As hipocretinas (também chamadas de orexinas) expressas no hipotálamo lateral regulam o ciclo sono-vigília, a alimentação, ativam os neurônios dopaminérgicos da VTA, além de outros núcleos monoaminérgicos (Willie *et al.*, 2001).

1.2. As Hipocretinas

As hipocretinas são peptídeos neurotransmissores importantes na regulação do ciclo sono-vigília encontrados em neurônios localizados no hipotálamo lateral e que possuem efeitos neuroexcitatórios (De Lecea *et al.*, 1998).

Estes neurotransmissores foram descobertos no hipotálamo de ratos por meio da identificação de um RNAm expresso exclusivamente no hipotálamo lateral, posterior e perifornical. Este RNAm codificava um pré-peptídeo que acabava originando estes peptídeos neurotransmissores. Baseados na origem hipotalâmica dos neurotransmissores e na sua similaridade ao hormônio secretina, De Lecea *et al.* (1998) denominaram estes peptídeos como hipocretinas 1 e 2.

Neste mesmo ano, Sakurai *et al.* (1998) identificaram em seus estudos os mesmos peptídeos e receptores através da pesquisa de ligantes endógenos para receptores órfãos ligados a proteína G. Quando administrados via intracerebroventricular em ratos, estes peptídeos induziam o aumento da ingestão de alimentos, sendo por esse motivo tais peptídeos denominados, pelo grupo de Sakurai de orexinas A e B (do grego *orexis* = apetite) e seus receptores OX1R e OX2R. Estes receptores foram bioquimicamente caracterizados e sua localização mapeada.

As hipocretinas 1 e 2 são derivadas da clivagem de um peptídeo precursor, a prepró-hipocretina. A hipocretina-1 (hcrt-1) nos mamíferos é um peptídeo de 33 aminoácidos, enquanto a hipocretina-2 (hcrt-2) possui 28 aminoácidos (Fig. 6) e ambos peptídeos possuem uma amidação no C-terminal (Sakurai *et al.*, 1998).

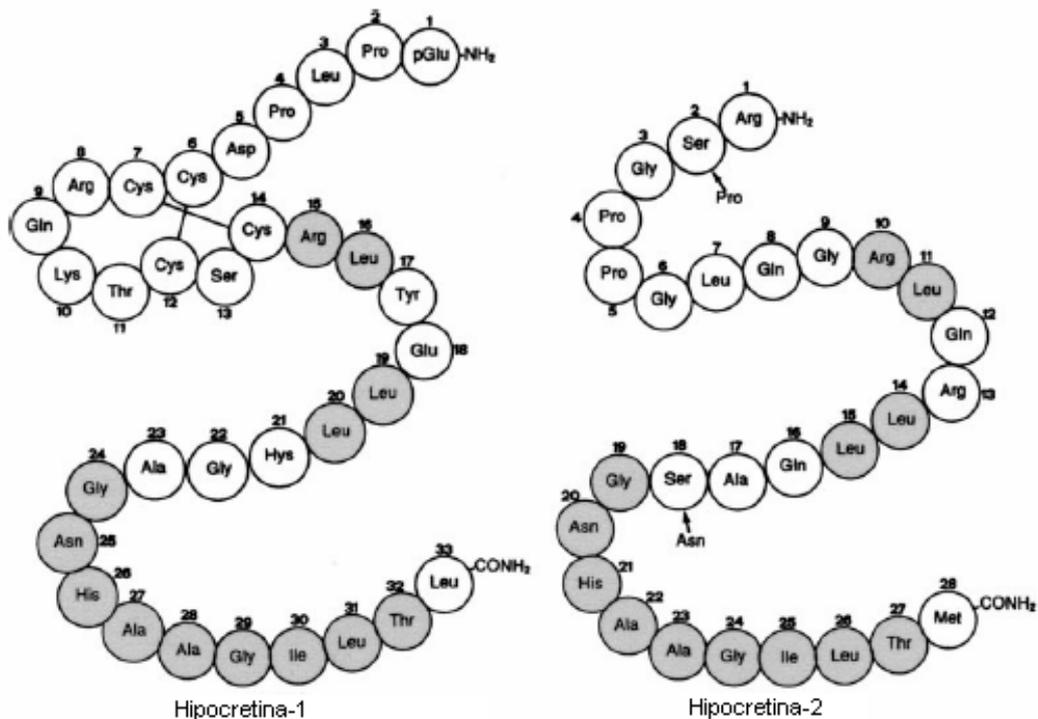


Figura 6: Esquema que mostra a seqüência de aminoácidos das hipocretinas 1 e 2. (Spinazzi *et al.*, 2005).

Estudos anatômicos revelaram que embora os neurônios hipocretinérgicos estejam localizados numa área restrita do hipotálamo, seus axônios se difundem através de projeções densas para diversas áreas do cérebro, para outras regiões do hipotálamo, amígdala, sistema límbico, tálamo, núcleos subtalâmicos, substância cinzenta, centros monoaminérgicos como o *locus coeruleus* (LC), núcleo tuberomamilar (*tuberomammillary nucleus* - TMN), VTA, núcleos da rafe e outras regiões cerebrais (Fig. 7) (Siegel, 1999; Mignot, 2001; Taheri *et al.* 2002; Burdakov, 2004).

As hipocretinas possuem efeitos excitatórios e estes efeitos têm sido relatados no LC, núcleo da rafe, VTA, *substantia nigra* e TMN (Hungs & Mignot, 2001; Mignot, 2001).

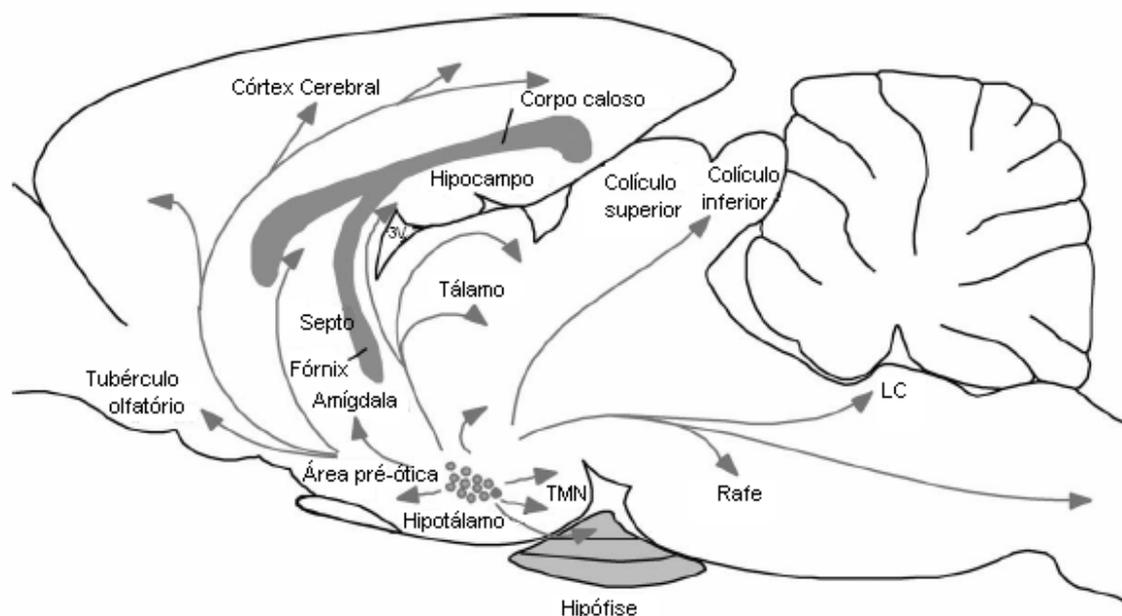


Figura 7: Esquema que representa o corte sagital de um córtex de rato mostrando a localização dos neurônios hipocretinérgicos e suas projeções (Sakurai, 2005).

Existem dois receptores das hipocretinas, o Hcrtr-1 e o Hcrtr-2, o primeiro é seletivo para hcr1, enquanto o Hcrtr-2 é não seletivo para hcr1 e hcr2 (Sakurai *et al.*, 1998).

O Hcrtr-1 é um receptor do tipo metabotrópico, ligado exclusivamente a proteína Gq atuando na cascata de produção de inositol trifosfato (IP3) e diacilglicerol (DAG) a partir da fosfolipase C. O Hcrtr-2 também trata-se de um receptor metabotrópico, porém pode estar ligado a uma proteína Gi/o que diminui a produção de AMPc ou a uma proteína Gq (Zhu *et al.*, 2003).

Os receptores hipocretinérgicos estão distribuídos por todas as regiões inervadas, porém a distribuição dos receptores é diferente nas várias estruturas cerebrais: o LC que libera NA possui Hcrtr-1, mas não tem Hcrtr-2; já o TMN que libera histamina possui Hcrtr-2, porém não contém Hcrtr-1. Os núcleos da rafe que libera 5-HT e a VTA que libera dopamina (DA) possuem ambos receptores (Fig. 8) (Siegel, 1999; Taheri *et al.*, 2002).

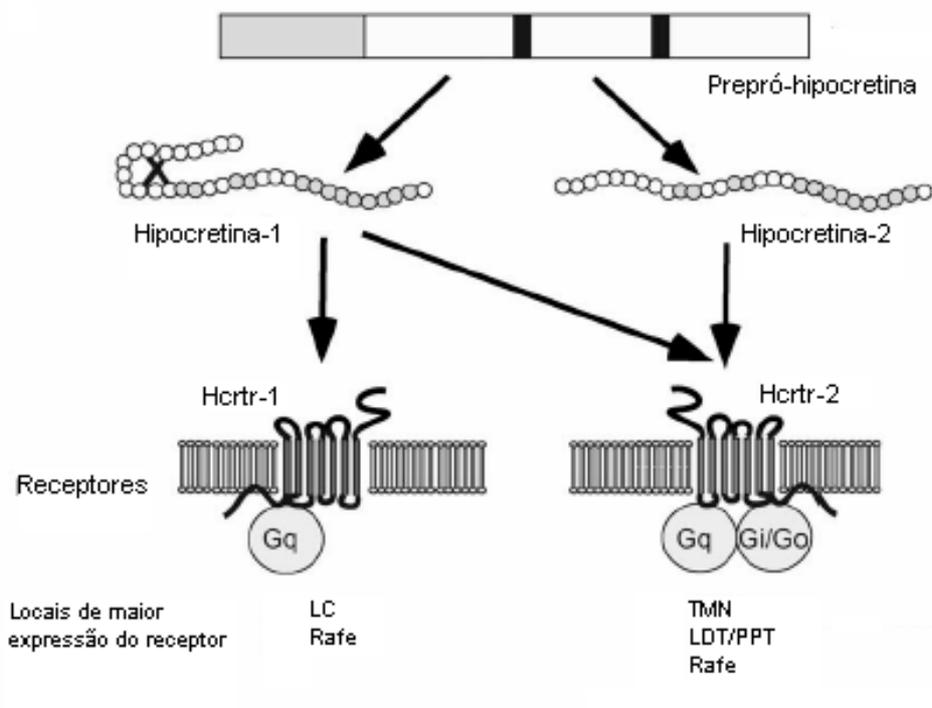


Figura 8: Esquema representativo da pré-hipocretina, seus peptídeos derivados, receptores e locais de maior expressão dos mesmos (Modificado de Sakurai, 2005).

A combinação da descoberta das hipocretinas e da identificação de mutações no receptor de hipocretina como causa da narcolepsia canina mostraram a importância desse sistema e aceleraram a pesquisa sobre estes peptídeos.

1.2.1. Funções das hipocretinas

Homeostase energética

Estudos fisiológicos mostram que os neurônios hipocretinérgicos têm conexões recíprocas com os neurônios hipotalâmicos que contêm neuropeptídeo Y, o qual estimula o apetite, sugerindo que as hipocretinas tenham função na alimentação e no controle do metabolismo. A região hipotalâmica, na qual os neurônios hipocretinérgicos localizam-se é como um centro de controle do apetite. A hipoglicemia induzida pela insulina aumenta os níveis do precursor das hipocretinas (Siegel, 1999; Kilduff & Peyron, 2000; Mignot, 2001).

Devido a essa ação na ingestão de alimentos, a hcrt-1 foi mensurada em ratos submetidos à privação de alimento por 24 horas. Os níveis de hcrt-1 foram altos durante a noite, quando esses animais estão mais ativos; já durante o dia houve uma diminuição de 40%. Depois de 72 horas sem alimento, nesta mesma fase, os níveis de hcrt-1 aumentaram a concentrações similares àquelas vistas durante a fase na qual os ratos estão mais ativos, indicando uma importante ligação entre os controles do sono e energético via sistema hipocretina (Fujiki *et al.*, 2001).

Promoção da vigília

O sono possui uma fisiologia complexa, pois vários neurotransmissores e estruturas cerebrais participam de sua regulação. Diferentes classes moleculares (tais como as monoaminas, a acetilcolina, os aminoácidos e os neuropeptídeos) atuam como neurotransmissores, neuromoduladores ou neuro-hormônios que regulam a promoção e a manutenção da vigília e certos distúrbios do sono.

Uma disfunção no sistema hipocretina (deficiência do sistema hipocretina ou mutação dos receptores de hipocretinas), leva a uma diminuição da atividade monoaminérgica causando em animais e humanos a sonolência diurna excessiva e a cataplexia (perda abrupta do tônus muscular típica do sono REM – *rapid eye movements* – durante a vigília), ambos sintomas da narcolepsia (Lin *et al.*, 1999). Além disso, os fármacos utilizados para o tratamento deste distúrbio aumentam o tônus monoaminérgico (Sakurai, 2002).

Enquanto o papel das hipocretinas na narcolepsia é bem estabelecido, muitos dados têm sugerido o envolvimento desses neuropeptídeos no sono normal e na sua regulação circadiana (Hungs & Mignot, 2001).

Os neurônios hipocretinérgicos estão localizados no hipotálamo lateral e perifornical, porém estes se projetam para regiões importantes no controle do ciclo sono-vigília, tais como o LC, VTA, núcleos da rafe, TMN e os núcleos colinérgicos tegmental laterodorsal (*laterodorsal tegmental nucleus* - LDT) e núcleo tegmental pedúnculo-pontino (*pedunculopontine tegmental nucleus* - PPT) (Peyron *et al.*, 1998; Nambu *et al.*, 1999).

Essas projeções fazem com que a alta quantidade de hipocretinas durante a vigília despolarize os centros monoaminérgicos - núcleos da formação reticular e TMN, o que leva à alta atividade cerebral pela ativação do córtex cerebral (Fig. 9) (Bayer *et al.*, 2001). No sono não-REM (NREM), a diminuição da atividade da hipocretina reduz o tônus monoaminérgico (Fig. 10). No sono REM, esse tônus alcança níveis tão baixos que ocorre a desinibição dos sistemas colinérgicos (Fig. 11) (Hungs & Mignot, 2001; Taheri *et al.*, 2002).

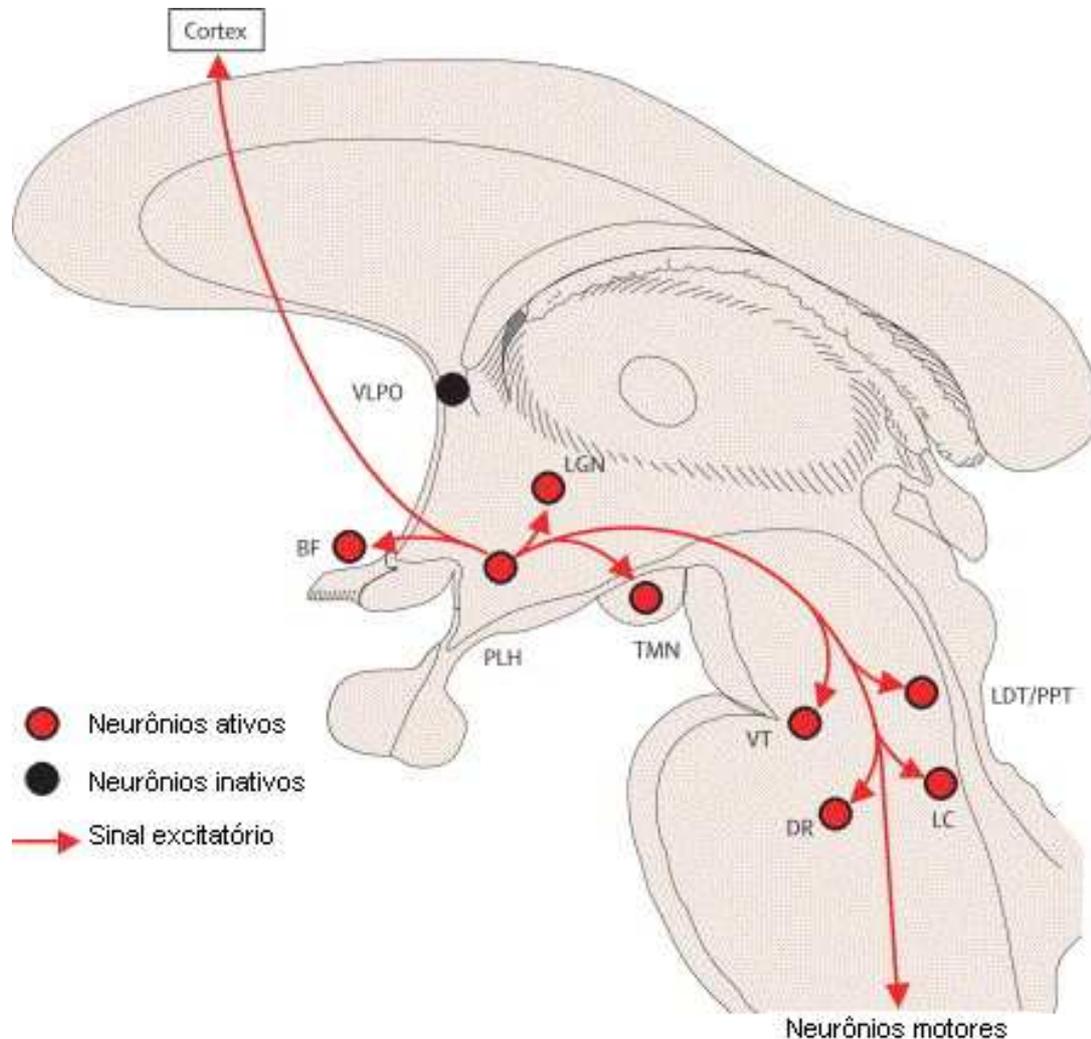


Figura 9: Vigília. Os neurônios hipocretinérgicos no hipotálamo posterolateral (PHL) estimulam vários sistemas de neurotransmissão: neurônios serotoninérgicos na rafe (DR), noradrenérgicos no *locus coeruleus* (LC), colinérgicos no prosencéfalo basal (BF) e LDT/PPT, histaminérgicos no núcleo tuberomamilar (TMN) e dopaminérgicos na *substantia nigra* e área tegmental ventral (VT). Esses sistemas de neurotransmissão enviam sinais excitatórios via prosencéfalo e tálamo para o córtex e inibem os neurônios que promovem o sono na área pré-óptica (VLPO). Neurônios glutamatérgicos locais (LGN) no hipotálamo estimulam os neurônios hipocretinérgicos através de um *feedback* positivo. Os neurônios hipocretinérgicos também inervam os neurônios motores (Modificado de Baumann & Bassetti, 2005).

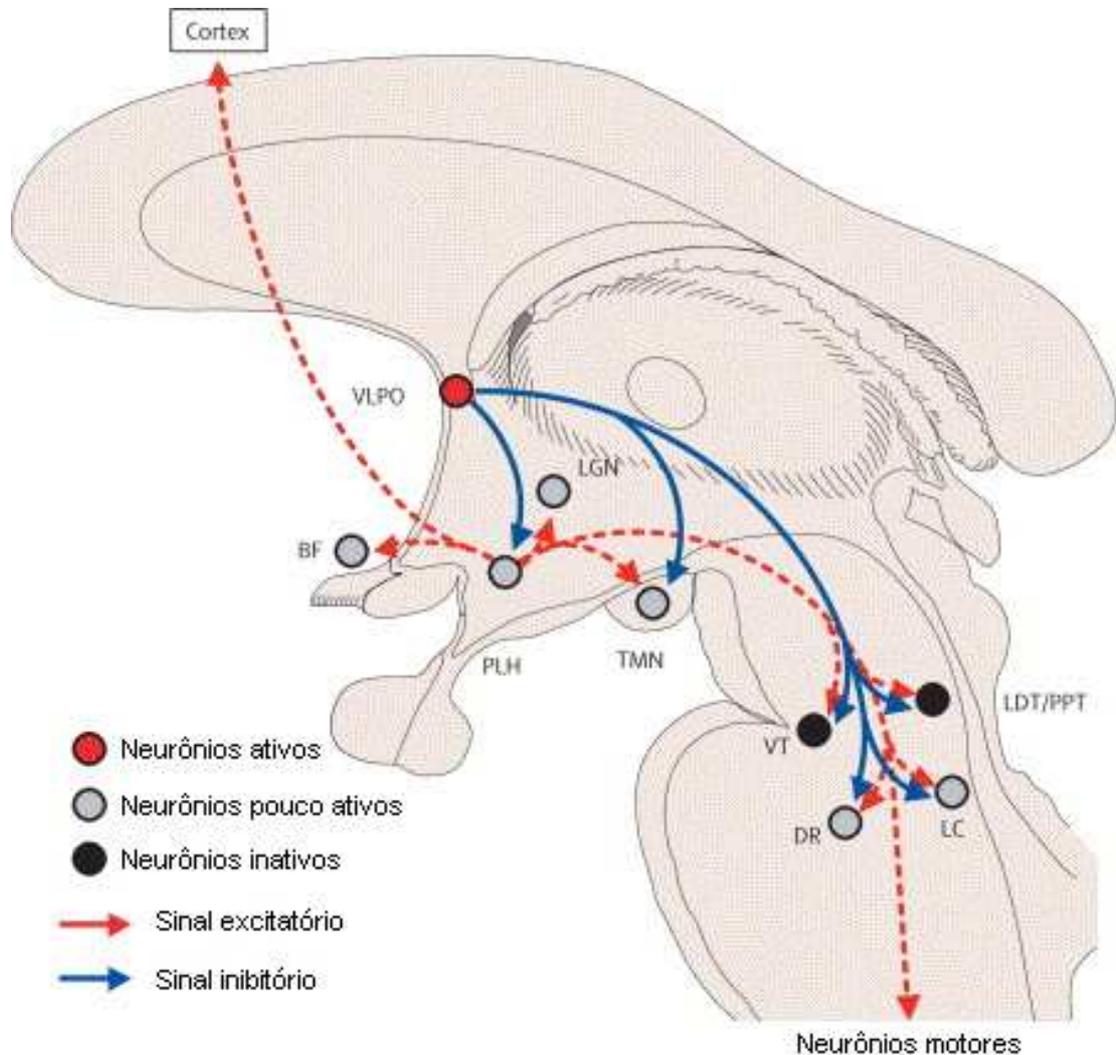


Figura 10: Sono NREM. Durante o sono NREM, a área pré-óptica (VLPO) manda sinais inibitórios GABAérgicos para: rafe (DR), *locus coeruleus* (LC), núcleos tegmental laterodorsal e pedúnculo-pontino (LDT/PPT), núcleo tuberomamilar (TMN) e área tegmental ventral (VT). A inibição desses sistemas leva a uma desinibição recíproca da VLPO. Os neurônios hipocretinérgicos, do TMN, da DR e do LC não estão completamente inativos durante o sono NREM, porém ainda há uma inibição dos neurônios colinérgicos LDT/PPT (que são ativos durante o REM) e uma menor estimulação dos neurônios motores. As linhas pontilhadas significam diminuição da atividade (Modificado de Baumann & Bassetti, 2005).

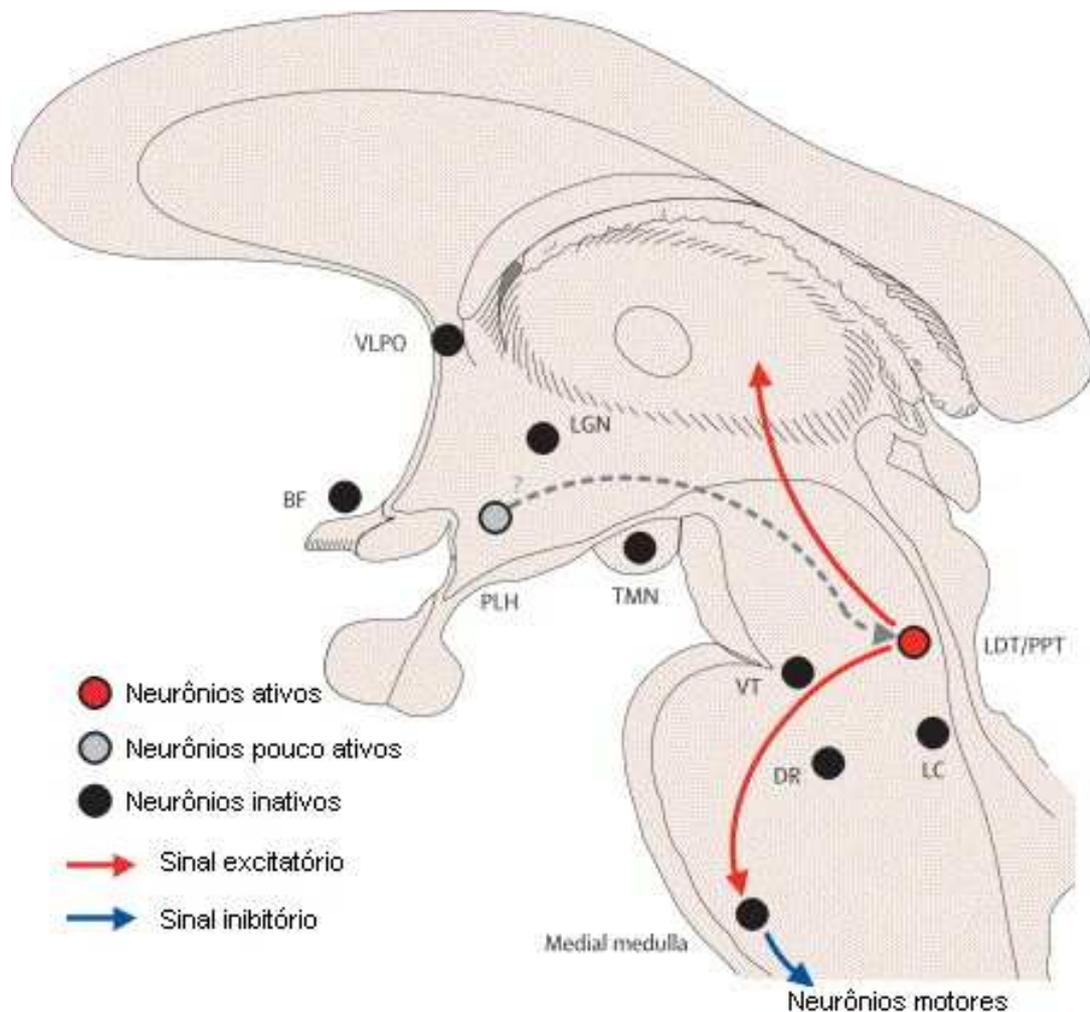


Figura 11: Sono REM. Esta fase do sono é controlada por uma interação dos neurônios colinérgicos dos núcleos tegmental laterodorsal e pedúnculo-pontino (LDT/PPT) e os neurônios monoaminérgicos. Uma população distinta de neurônios colinérgicos do LDT e PPT ativam estruturas talâmicas (produzindo dessincronização cortical) e neurônios medulares (produzindo atonia). Os núcleos monoaminérgicos: rafe (DR), *locus coeruleus* (LC), núcleo tuberomamilar (TMN) ficam quase completamente inativos durante o sono REM. Isso resulta na desinibição dos núcleos colinérgicos LDT e PPT (Modificado de Baumann & Bassetti, 2005).

Baseado no fato que as hipocretinas regulam vários sistemas de neurotransmissão relevantes para o controle da vigília, estudos concluíram que o noradrenérgico LC é o principal responsável pelo efeito promotor da vigília das hipocretinas (Hagan *et al.*, 1999; Bourgin *et al.*, 2000).

As aferências para o sistema hipocretinérgico também foram estudadas e segundo Yoshida *et al.* (2001) os neurônios hipocretinérgicos recebem projeções vindas do allocórtex, *claustrum*, septo lateral, *stria terminalis*, substância cinzenta periaquedutal, núcleo dorsal da rafe e de muitas regiões hipotalâmicas tais como o núcleo pré-óptico ventrolateral (*ventrolateral preoptic nucleus* - VLPO), núcleo dorsomedial, hipotálamo lateral e posterior. Foram observadas também, projeções vindas da amígdala, de neurônios colinérgicos do prosencéfalo basal (LDT e PPT).

Os núcleos colinérgicos LDT e PPT e os neurônios hipocretinérgicos possuem projeções recíprocas. Entretanto, o LC, o TMN e a VTA que recebem projeções hipocretinérgicas, não enviam projeções para esses neurônios (Sakurai, 2005).

Projeções vindas do núcleo supraquiasmático para estes neurônios também sugerem que a atividade hipocretinérgica pode ser modulada pelo sistema de temporização circadiano. Estas projeções podem fornecer uma pista ambiental do ciclo claro-escuro para os neurônios hipocretinérgicos (Yoshida *et al.*, 2001).

Portanto, as hipocretinas têm grande efeito sobre a formação reticular e conseqüentemente sobre o tônus monoaminérgico e colinérgico durante o ciclo sono-vigília, com máxima atividade durante a vigília e mínima durante o sono NREM (Hungs & Mignot, 2001, Taheri *et al.*, 2002).

Estabilidade da vigília

Os neurônios do LC, dos núcleos da rafe e do TMN possuem padrões de disparo dependente do estado comportamental (vigília/sono). Esses núcleos apresentam uma alta taxa de disparo durante a vigília, que diminui durante a fase NREM do sono e praticamente cessa durante a fase REM (Aston-Jones *et al.*, 1991; McGinty & Harper, 1976; Steininger *et al.*, 1999).

Esses núcleos recebem projeções dos neurônios hipocretinérgicos e da área pré-óptica ventrolateral (*ventrolateral preoptic* - VLPO) que também projeta para os núcleos colinérgicos do prosencéfalo basal. Os neurônios da VLPO fazem sinapses do tipo simétrica e liberam ácido gama-aminobutírico (GABA), que hiperpolarizam os neurônios desses núcleos (Sherin *et al.*, 1998; Steininger *et al.*, 2001).

Estudos eletrofisiológicos têm identificado que os neurônios da área pré-óptica possuem o dobro da taxa de disparo durante o sono, quando comparado à vigília (Szymusiak & McGinty, 1989; Szymusiak *et al.*, 1998).

A relação entre a área pré-óptica e os núcleos monoaminérgicos parece ser recíproca. A área pré-óptica é inervada pelos neurônios histaminérgicos do TMN, terminais noradrenérgicos do *locus coeruleus* e serotoninérgicos dos núcleos da rafe (Chou *et al.*, 2002). Gallopin *et al.* (2000) registrando neurônios da área pré-óptica em cortes hipotalâmicos mostraram que estes são inibidos pela NA e pela 5-HT. Entretanto, não foi observada resposta desses neurônios a histamina, porém o TMN também possui neurônios que contêm GABA e galanina, os quais podem inibir a área pré-óptica (Airaksinen *et al.*, 1992).

Devido a estas evidências, Saper *et al.* (2001) desenvolveram uma hipótese baseada na mútua inibição entre a área pré-óptica e os sistemas de ativação. Quando os neurônios da área pré-óptica disparam rapidamente durante o sono, eles inibem os núcleos monoaminérgicos, desinibindo seu próprio disparo. Similarmente, quando os neurônios monoaminérgicos atingem uma alta taxa de disparo durante a vigília, eles podem inibir a área pré-óptica e conseqüentemente desinibir seu próprio disparo. Saper *et al.* (2001) nomearam este circuito de “flip-flop”, no qual são possíveis apenas dois estados (sono e vigília).

Indivíduos com narcolepsia apresentam freqüentes transições de sono durante a vigília e sono fragmentado. Depois da descoberta das hipocretinas e de suas projeções, ficou claro que esses neurônios, assim como a área pré-óptica, inervam vários núcleos monoaminérgicos (Hagan *et al.*, 1999; Brown *et al.*, 2001).

Recentemente, estudos têm mostrado que os neurônios hipocretinérgicos podem influenciar ambos os lados do circuito “flip-flop”: projeções para os núcleos monoaminérgicos (aumentando a taxa de disparo desses núcleos) e para a área pré-óptica. Embora, os neurônios da área pré-óptica não apresentem receptores hipocretinérgicos (Chemelli *et al.*, 1999), Methippara *et al.* (2000) injetando hipocretinas na área pré-óptica de ratos observaram que há um aumento da vigília e uma diminuição de NREM e REM, sugerindo um mecanismo de ação pré-sináptico (assim como ocorre nos neurônios monoaminérgicos) (Fig. 12).

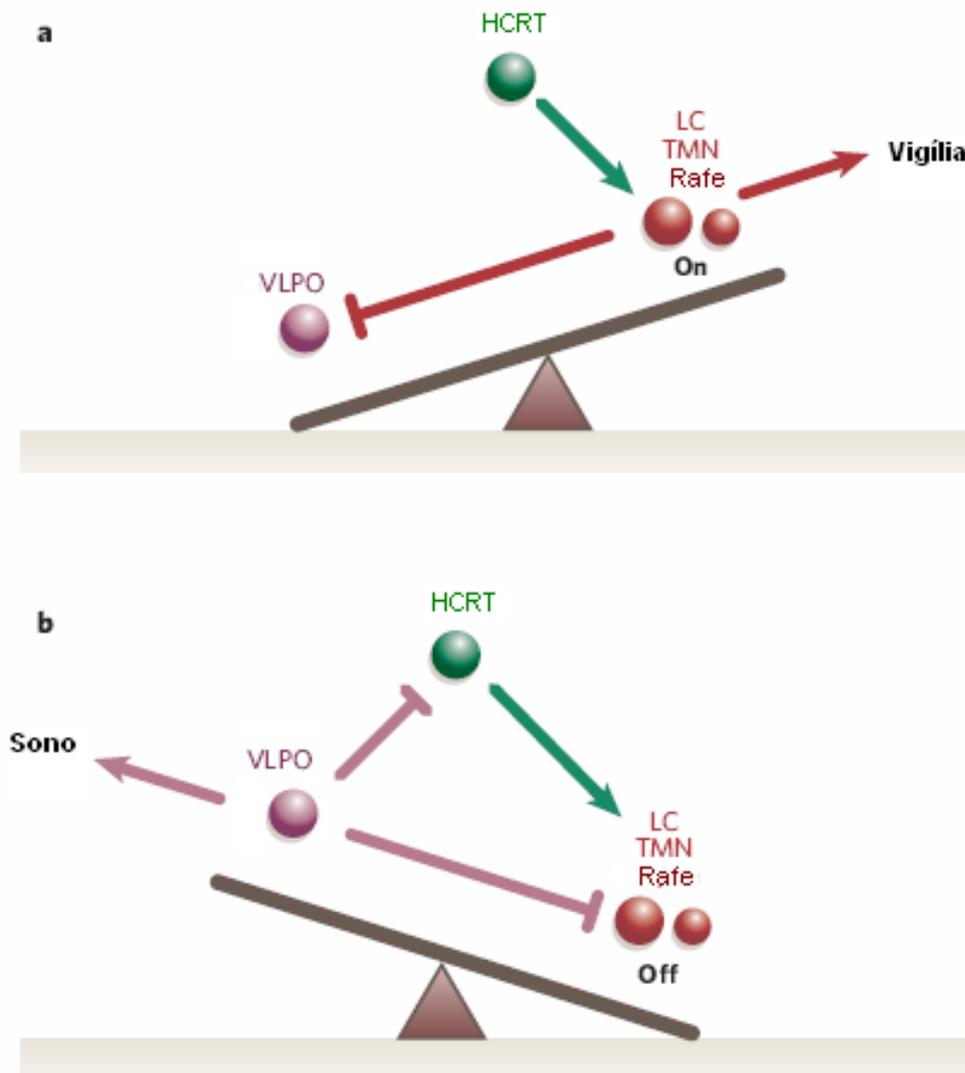


Figura 12: Circuito “flip-flop”. Durante a vigília (a) os neurônios hipocretinérgicos (HCRT) estimulam os núcleos monoaminérgicos (vermelho) que inibem a área pré-óptica (VLPO) diminuindo a inibição dos neurônios monoaminérgicos. Como a VLPO não possui receptores hipocretinérgicos, os neurônios contendo hipocretinas atuam primariamente reforçando o tônus monoaminérgico ao invés de atuar diretamente inibindo a VLPO. Durante o sono (b), o disparo da VLPO inibe os grupos monoaminérgicos diminuindo sua própria inibição. Ela também inibe os neurônios hipocretinérgicos, impedindo a ativação monoaminérgica que pode interromper o sono. A inibição direta mútua entre VLPO e os núcleos monoaminérgicos formam o circuito “flip-flop” que produz transições entre os estados de vigília e sono. Porém, esse é um circuito instável. A adição dos neurônios hipocretinérgicos estabiliza esse circuito. LC, locus coeruleus; TMN, núcleo tuberomamilar (Modificado de Saper *et al.*, 2005).

Este modelo “flip-flop” desenvolvido por Saper *et al.* (2001) pode explicar as rápidas intrusões de REM (durante a vigília) observadas nos pacientes narcolépticos. O TMN, os núcleos da rafe e o LC contêm receptores hipocretinérgicos, esses núcleos inibem o sono REM. Na ausência do *input* excitatório das hipocretinas, essa influência excitatória fica mais fraca e aumenta a atividade da área pré-óptica que promove mais transições para o REM.

1.3. Hipocretinas e Depressão

As hipocretinas têm sido relatadas como tendo efeitos excitatórios em muitas áreas cerebrais relacionadas ao controle da regulação do sono incluindo o *locus coeruleus* e os núcleos da rafe. Estes dois núcleos (amplamente inervados por fibras hipocretinérgicas) não são apenas ligados ao sono, mas também são áreas ligadas à depressão maior (Bourgin *et al.*, 2000; Liu *et al.*, 2002).

Allard *et al.* em 2004, mostraram que ratos da linhagem Wistar-Kyoto (WKY) (usado como modelo animal de depressão por possuir padrões comportamentais e de sono semelhante aos dos pacientes com depressão), possuem 18% a menos neurônios hipocretinérgicos os quais são 15% menores do que os neurônios observados nos ratos da linhagem Wistar. Em vista desses resultados Allard *et al.* (2007) testaram a hipótese que a privação de sono poderia resultar em aumento no número e tamanho desses neurônios no WKY quando comparados aos ratos da linhagem Wistar. De acordo com os resultados prévios o número de neurônios hipocretinérgicos era maior nos ratos Wistar. A privação de sono REM produziu um aumento de 20% no número de neurônios hipocretinérgicos nos WKY quando comparados aos WKY que não foram privados de sono.

A redução dos níveis de hipocretina é observada na narcolepsia, um distúrbio do sono freqüentemente associado com a depressão, pois a cataplexia (sintoma patognomônico da narcolepsia) e a depressão são tratadas com fármacos que aumentam a atividade monoaminérgica e afetam a fisiologia do sono (Salomon *et al.*, 2003).

Padrões alterados de sono, como alterações na continuidade e na arquitetura do sono são freqüentemente caracterizadas por uma curta latência para o primeiro episódio de sono REM durante a primeira parte da noite e por um aumento na fragmentação do sono, são associados com transtornos do humor, especialmente com a depressão. Além disso, a maioria dos pacientes narcolépticos, cujos níveis de hipocretina estão diminuídos exibe depressão clínica. De fato, muitos medicamentos antidepressivos, de diferentes categorias, exibem uma importante supressão do sono REM (Allard *et al.*, 2004; Cheeta *et al.*, 1997; Willner, 1984).

Sabe-se que a privação de sono REM tem um efeito antidepressivo tanto em humanos como em modelos animais de depressão (Vogel *et al.*, 1980). Dados recentes constataram que os níveis de hipocretina-1 aumentavam em ratos privados de sono REM pela ativação do sistema hipocretina. Após essa privação, quando os animais podiam dormir a vontade e entravam em sono REM, num processo chamado rebote de sono, ocorria a diminuição dos níveis de hipocretina-1, o que indica a inibição do sistema hipocretina; mostrando, assim, sua importância na regulação do sono. Esse aumento nos níveis de hipocretina-1 no líquido cefalorraquidiano de ratos com privação de sono REM sugere que as hipocretinas podem estar associadas ao efeito antidepressivo da privação de sono (Pedrazzoli *et al.*, 2004).

Sabendo que a privação de sono REM possui efeito antidepressivo em humanos deprimidos (Vogel *et al.*, 1980), que grande parte dos tratamentos com drogas antidepressivas inibem o sono REM (Vogel *et al.*, 1990) e que os níveis de hipocretina-1 aumentam com a privação, este efeito antidepressivo da privação poderia estar associado às hipocretinas, desta forma no presente estudo pretendemos estudar o efeito de tratamentos antidepressivos e de um modelo animal de depressão nos níveis de hipocretina.

2.1. Objetivo geral

Verificar se o sistema hipocretinérgico está envolvido no tratamento antidepressivo e em um modelo animal de depressão.

2.2. Objetivos específicos

- Verificar se a administração de drogas antidepressivas teria algum efeito nos níveis de hipocretina-1 no líquido cefalorraquidiano de ratos;
- Observar se há alteração nos níveis desse peptídeo no líquido cefalorraquidiano de ratos submetidos a um protocolo de estresse brando crônico - modelo animal de depressão.
- Comparar os níveis de hipocretina-1 dos ratos submetidos ao estresse brando crônico após tratamento com antidepressivo com os ratos não tratados.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. Animais

Foram utilizados no presente trabalho 112 ratos machos da linhagem *Wistar* com 90 dias de idade, provenientes do biotério do Departamento de Psicobiologia da Universidade Federal de São Paulo. O estudo foi conduzido (exceto nos animais submetidos ao protocolo de estresse brando crônico) em um ciclo claro-escuro de 12:12 (claro das 7 às 19 horas) e temperatura ($22 \pm 2^\circ\text{C}$) controlados automaticamente. Ração e água foram mantidos a vontade nas gaiolas padrão de polipropileno. Todos os procedimentos experimentais foram submetidos e aprovados pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal de São Paulo (Processo CEP nº 0513/06 – Anexo 1).

3.2. Protocolo de Estresse Brando Crônico (EBC)

O regime de EBC causa um sintoma conhecido como anedonia (uma diminuição da responsividade a estímulos prazerosos) que é o principal sintoma da depressão maior (D'Aquila *et al.*, 1997).

Neste protocolo, os animais são submetidos a diversos fatores de estresse como no procedimento descrito por Willner *et al.* (1987). Porém, alguns fatores foram acrescentados do experimento de Moreau *et al.* (1992) como o pareamento do bebedouro de sacarose com o bebedouro de água e restrição de ração.

Na primeira semana, os ratos foram treinados a consumir uma solução palatável de sacarose e depois submetidos a uma variedade de fatores estressores brandos. A anedonia foi observada pela redução no consumo da solução de sacarose.

Os animais do grupo estresse foram submetidos ao protocolo de EBC durante 2 semanas. Este protocolo consiste em períodos de privação total de água, privação total de comida, gaiola úmida, gaiola inclinada entre 45 a 60°, dois ratos por gaiola, som contínuo de 85 dB, flanela de gato, luz contínua, luz off, alimento reduzido, garrafa vazia e luz piscante. Os fatores são alternados durante a semana conforme o protocolo esquematizado no quadro 3.

Quadro 3: Protocolo de estresse brando crônico.

DIA DA SEMANA	PRIVAÇÃO TOTAL DE ÁGUA	PRIVAÇÃO TOTAL DE COMIDA	GAIOLA ÚMIDA	INCLINAÇÃO DA GAIOLA 45°-60°	DOIS RATOS POR GAIOLA	SOM CONTÍNUO DE 85dB	FLANELA DE GATO	LUZ CONTÍNUA	LUZ OFF	ALIMENTO REDUZIDO	GARRAFA VAZIA	LUZ PISCANTE
SEGUNDA-FEIRA	8:00 ↓	8:00 ↓				00:00 ↓ 5:00 ↓	9:00 ↓ 10:00 ↓		19:00		15:00 ↓ 16:00 ↓	
TERÇA-FEIRA	14:00 ↓	14:00 ↓	15:00 ↓	17:00 ↓					↓			20:00 ↓ 23:00 ↓
QUARTA-FEIRA	17:00 ↓	17:00 ↓	8:00 ↓	↓	14:00 ↓	00:00 ↓ 5:00 ↓	9:00 ↓ 10:00 ↓		7:00			
QUINTA-FEIRA	9:00 ↓ 18:00 ↓	9:00 ↓	14:00 ↓	10:00 ↓	8:00			19:00 ↓ 7:00		17:00 ↓	8:00 ↓ 9:00 ↓	20:00 ↓ 23:00 ↓
SEXTA-FEIRA	14:00 ↓ 17:00 ↓		8:00 ↓	15:00 ↓	14:00 ↓	19:30 ↓ 23:30 ↓	9:00 ↓ 10:00 ↓		↓	9:00 ↓ 17:00 ↓		
SABADO	12:00 ↓			12:00 ↓	8:00 ↓				7:00	9:00 ↓		
DOMINGO												

3.3. Coleta do líquido cefalorraquidiano

Os animais foram anestesiados com halotano. O líquido cefalorraquidiano coletado dos animais através de uma seringa de 1ml foi colocado imediatamente em gelo seco e depois estocado a -80°C antes de ser analisado.



Fig. 13: Coleta do líquido cefalorraquidiano.

3.4. Dosagem de Hipocretina-1

A dosagem de hipocretina-1 no líquido cefalorraquidiano dos animais foi feita em duplicata com de kits de radioimunoensaio disponíveis comercialmente (*Phoenix Pharmaceutical, Mountain View, CA, USA*).

3.5. Procedimentos Experimentais

3.5.1. Experimento 1

Níveis de hipocretina-1 no líquido cefalorraquidiano de ratos tratados com antidepressivos.

Foram utilizados 28 animais divididos em três grupos denominados grupo controle (n=6), grupo imipramina (n=9) e grupo fluoxetina (n=13) (Fig. 14).

Drogas antidepressivas: Neste experimento os animais foram tratados com os antidepressivos imipramina (10 mg/kg/dia) e fluoxetina (10mg/kg/dia) intraperitonealmente (i.p.) durante 21 dias. Os animais do grupo controle receberam solução salina (0,9%) via intraperitoneal também durante 21 dias.

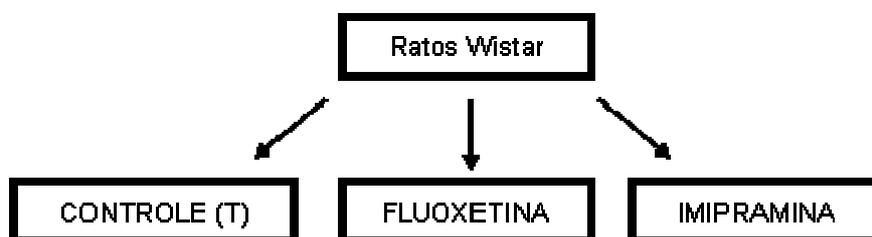


Figura 14: Desenho experimental (experimento 1).

3.5.2. Experimento 2

Níveis de hipocretina-1 no líquido cefalorraquidiano de ratos submetidos a um protocolo de estresse brando crônico tratados com antidepressivo tricíclico e não tratados.

Foram utilizados 84 ratos Wistar machos que foram treinados a consumir uma solução palatável de sacarose (1%). O consumo de sacarose foi mensurado, em intervalos semanais durante o experimento. Neste experimento, os animais foram colocados em gaiolas individuais (Fig. 15).

Grupo controle: este grupo foi submetido a um ciclo claro-escuro de 12:12 e recebeu comida e água a vontade, e não teve nenhum contato com o grupo que foi submetido ao protocolo de estresse. Esse grupo foi subdividido em dois grupos: um que recebeu tratamento com o antidepressivo tricíclico imipramina (n=22) e outro que não foi tratado (n=20).

Grupo depressão: foi submetido a um protocolo de EBC e que também foi subdividido em dois grupos, um deles foi tratado com imipramina (n=22) e o outro não recebeu nenhum tipo de tratamento (n=20).

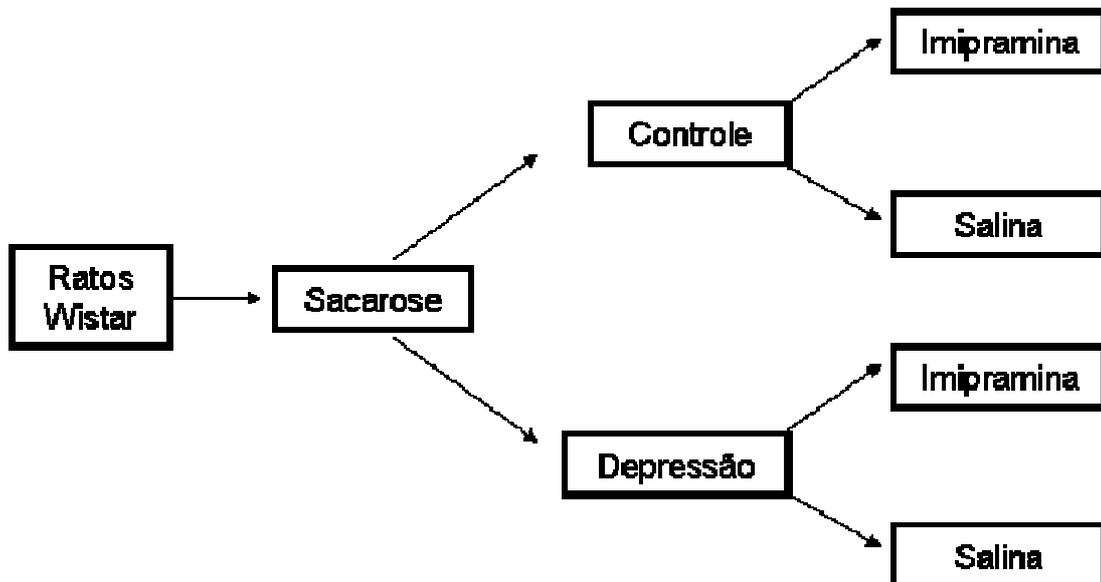


Figura 15: Desenho experimental (experimento 2).

Teste de consumo da solução de sacarose: os animais tiveram o consumo mensurado todas às terças-feiras às 14hs. Os dois bebedouros (um com água e outro com a solução de sacarose) eram colocados ao mesmo tempo nas gaiolas para que os animais não fossem induzidos a consumir o conteúdo do primeiro bebedouro inserido na gaiola.

3.6. Análise estatística

Os valores de hipocretina-1 no líquido cefalorraquidiano foram comparados entre os grupos usando o teste ANOVA de uma via. Quando necessário foi usado o teste *post-hoc* de Duncan. Foi usado o nível de significância $p < 0,05$ para todos os experimentos. Os cálculos foram realizados usando o programa StatSoft®.

4.1. Experimento 1

Níveis de hipocretina-1 no líquido cefalorraquidiano de ratos tratados com antidepressivos.

As hipocretinas têm uma variação diária, apresentando níveis baixos durante o dia e atingindo níveis mais altos à noite. Nesse experimento o líquido cefalorraquidiano foi coletado às 15hs, 8 horas depois das luzes do biotério terem sido acesas, Zeitgeber 8 (ZT 8).

4.1.1. Níveis de Hipocretina-1

Nesse experimento foi observado que os níveis de hipocretina (pg/ml) aumentam quando os animais são tratados com imipramina ($878,61 \pm 57,5$) quando comparado aos animais do grupo controle ($741,94 \pm 91,1$; $p=0,003$). Enquanto no grupo tratado com fluoxetina não houve alteração estatisticamente significativa ($719,05 \pm 97,6$) em comparação com o grupo controle ($p=0,58$) (Fig. 17).

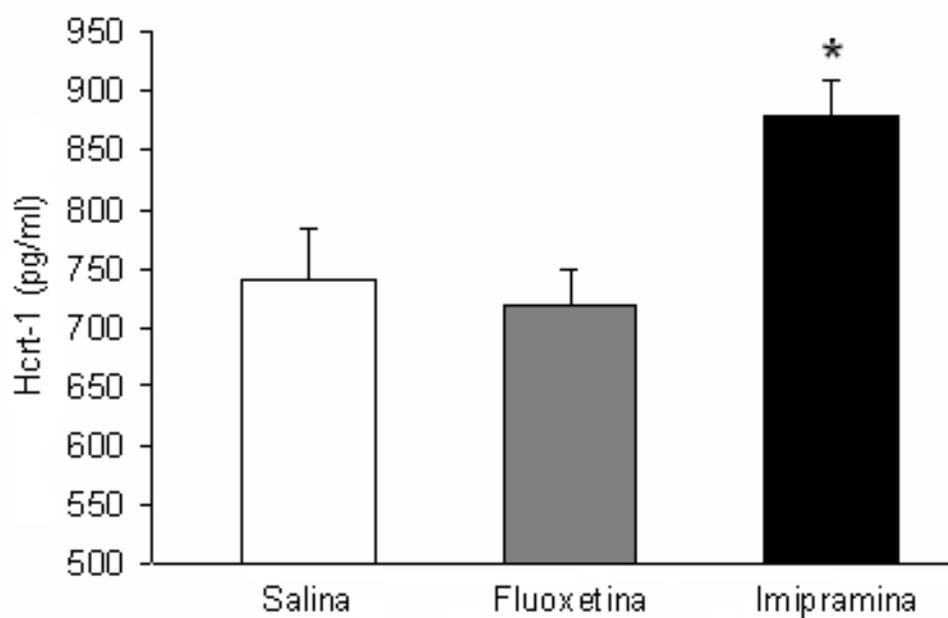


Figura 16: Níveis de hipocretina-1 (pg/ml) em animais controles (tarde): n=6 e tratados com imipramina (n=9) e fluoxetina (n=13). * difere do grupo controle ($p < 0,005$). Valores expressos em média \pm EP.

4.2. Experimento 2

Níveis de hipocretina-1 no líquido cefalorraquidiano de ratos submetidos a um protocolo de estresse brando crônico tratados com antidepressivo tricíclico e não tratados.

4.2.1. Consumo de solução de sacarose 1%

Na primeira semana do experimento os animais receberam a solução de sacarose 1% para reduzir a neofobia. Ao final da primeira semana, foi feito o primeiro teste de consumo e a partir da segunda semana o teste de consumo foi feito semanalmente.

No teste de consumo, os bebedouros com água e sacarose 1% foram pesados antes e depois do teste. Com isso, obteve-se a quantidade ingerida de cada bebedouro (água e sacarose 1%) e o índice de consumo de sacarose de cada rato através da fórmula:

$$\text{Índice} = \frac{\text{Consumo de sacarose}}{\text{Consumo de sacarose} + \text{Consumo de água}}$$

Quando o índice foi igual a zero não houve consumo da solução de sacarose e quando foi igual à 1,0 só houve o consumo da solução de sacarose.

Para evitar que o grupo que fosse submetido ao protocolo de EBC e o grupo controle consumissem diferentes quantidades da solução doce, os animais foram divididos em dois grupos baseado no consumo da solução de sacarose a fim de obter dois grupos com média de consumo semelhante: grupo controle e grupo depressão (grupo que posteriormente foi submetido ao EBC).

Nos dois grupos a média de consumo de sacarose foi semelhante (15,04 no grupo controle e 15,06 no grupo depressão; $p=0,98$) (Tabela 2).

O índice de consumo de sacarose foi de 0,70 nos dois grupos. Portanto, o grupo controle e o grupo que seria submetido ao protocolo de EBC iniciaram o experimento com o mesmo índice de consumo.

Após o balanceamento dos grupos, o grupo controle foi para uma sala onde receberia ração e água *ad libitum*, ciclo claro-escuro 12:12, temperatura controlada de 22 ± 2 °C e não teria contato com o grupo depressão.

Tabela 2 – Consumo da solução de sacarose (ml) do início do experimento até a segunda semana. Na primeira e segunda semanas o grupo Depressão já estava submetido ao protocolo de EBC.

Grupos	Início do Experimento	1ª. Semana	2ª Semana
Controle (n = 42)	15,04±0,9	14,27±0,85	16,51±0,87
Depressão (EBC) (n = 42)	15,06±0,9	11,44±0,89	9,04±0,74

Valores expressos em média ± EP.

A partir da terceira semana, o grupo controle foi subdividido em 2 grupos: controle salina (CS) e controle imipramina (CI). O grupo depressão também foi subdividido em depressão salina (DS) e depressão imipramina (DI).

Para que não houvesse diferença no consumo de sacarose nos grupos CS, e CI houve uma nova distribuição para que os grupos não apresentassem diferenças no consumo da solução. O mesmo foi feito com os grupos DS e DI.

Após o balanceamento do grupo controle, se observou no grupo CS uma média de consumo de sacarose de 16,38ml e no grupo CI uma média de 16,09ml. No grupo depressão salina (DS) observou-se uma média de consumo de sacarose de 10,08ml, enquanto que o grupo DI apresentou uma média de 9,41ml. Conforme mostra a tabela 3.

O consumo de sacarose de todos os grupos a partir da primeira semana a ultima semana do experimento está ilustrada na figura 18.

Tabela 3 - Consumo da solução de sacarose (ml) dos grupos controle, controle + imipramina, controle + fluoxetina, estresse, estresse + imipramina e estresse + fluoxetina durante o tratamento.

Grupos	1ª Semana tratamento	2ª Semana tratamento	3ª Semana tratamento
Controle (Salina) (n = 20)	16,38±1,51	16,85±1,32	17,95±1,26
Controle + Imipramina (n = 22)	16,09±1,21	15,5±0,9	16,27±0,9
Depressão (Salina) (n = 20)	10,08±1,38	6,75±1,11	6,60±0,86
Depressão + Imipramina (n = 22)	9,41±1,2	10,41±1,1	13,14±0,74

Valores expressos em média ± EP.

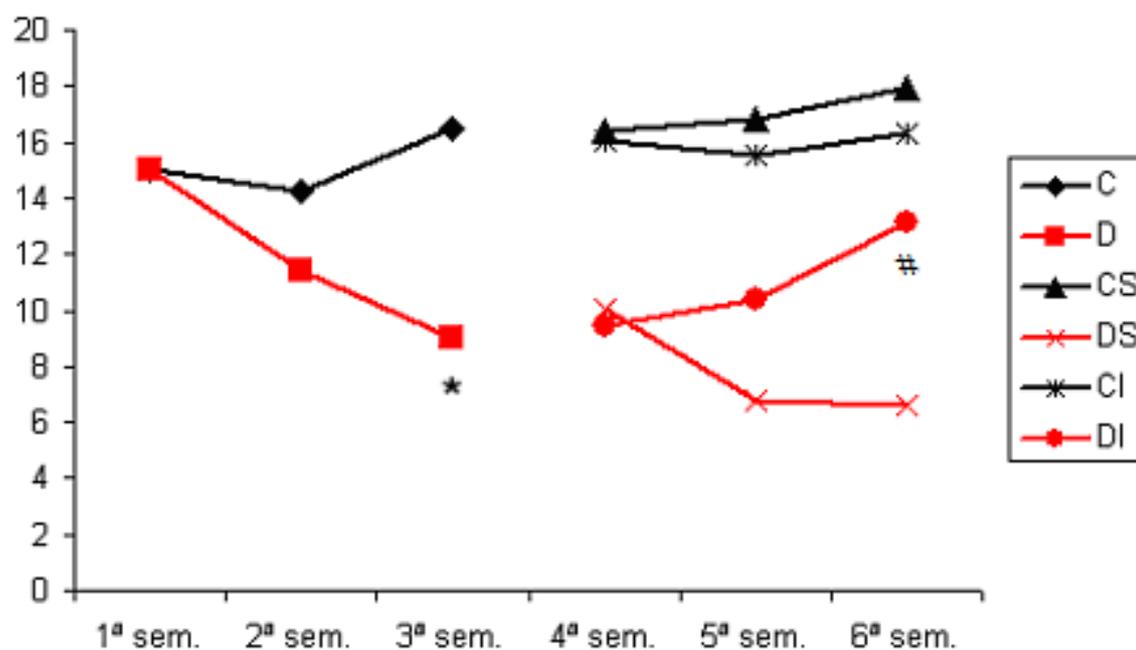


Figura 17: Gráfico da média do consumo da solução de sacarose 1% (ml) nos grupos controle (n=42) e depressão (n=42), que posteriormente foram subdivididos em controle salina (CS): n=20, controle imipramina (CI): n=22, depressão salina (DS): n=20 e depressão imipramina (DI): n=22; durante todo o experimento. * $p < 0.05$ comparado ao grupo C na terceira semana. # $p < 0.05$ comparado ao grupo DS na sexta semana.

4.2.2. Níveis de Hipocretina-1

Como neste experimento, o esperado é que os níveis de hipocretina diminuam com a depressão e depois aumentem com o tratamento com imipramina, o líquido cefalorraquidiano foi coletado pela manhã (7h, Zeitgeber 0), quando os níveis de hipocretina ainda estão baixos.

Os resultados obtidos mostram que os níveis de hipocretina diminuem no modelo animal de depressão (604,4 pg/ml) quando comparados ao controle (821,8 pg/ml; $p=0,007$) e que esses níveis aumentam e alcançam os níveis normais no grupo submetido ao EBC que foi tratado com imipramina (773,0 pg/ml) ($p=0,03$).

Os níveis de hipocretina dos animais do grupo que não foi submetido ao EBC, mas recebeu o tratamento antidepressivo (753,5 pg/ml) não foram diferentes dos níveis de hipocretina do grupo controle CS ($p=0,3$), o que foi observado também no experimento 1. Conforme ilustra a figura 19.

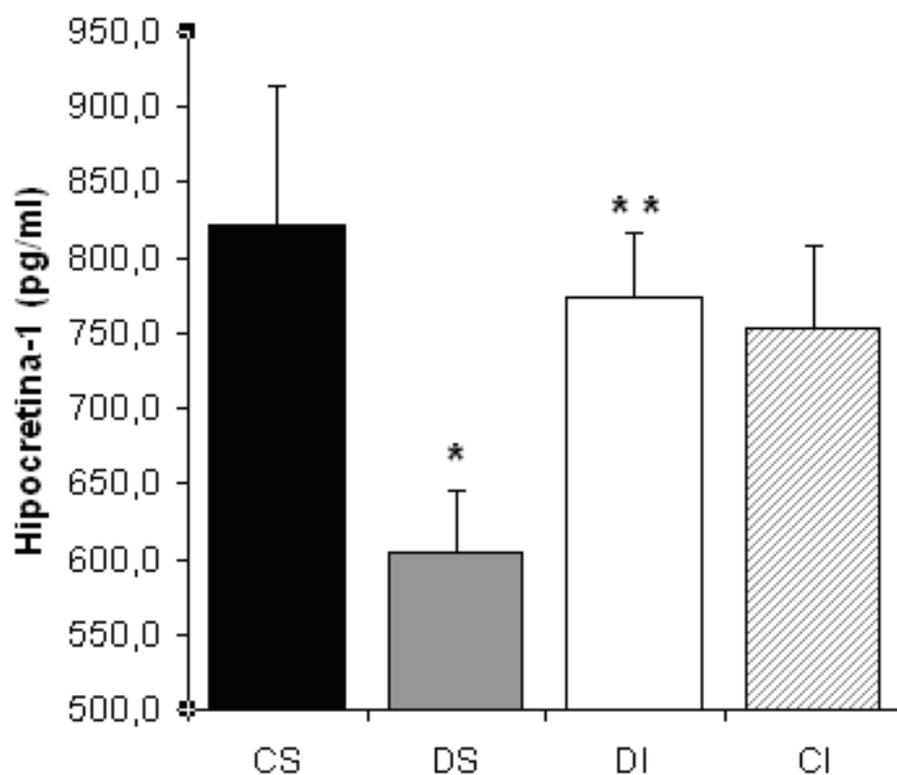


Figura. 18: Níveis de hipocretina-1 (pg/ml) nos grupos controle salina (CS): n=18, depressão salina (DS): n=18, depressão imipramina (DI): n=15 e controle imipramina (CI): n=16. * difere do grupo CS ($p < 0,05$) e ** difere do grupo DS ($p < 0,05$). Valores expressos em média + EP.

5.1. Modelo animal de depressão

A maior dificuldade na pesquisa da depressão é obter um modelo animal de depressão fiel à complexidade da patologia humana. Pois muitos dos sintomas da depressão (humor deprimido, sentimentos de culpa, suicídio) não podem ser reproduzidos ou mensurados nos animais de laboratório (Nestler *et al.*, 2002; Anisman & Matheson, 2005).

Porém, o protocolo de Estresse Brando Crônico utilizado no presente estudo foi o suficiente para produzir anedonia (mensurada pela redução no consumo de uma solução palatável de sacarose) e alterações nos níveis de hipocretina no líquido cefalorraquidiano de ratos.

A relevância deste modelo de depressão é suportada pela evidência que a diminuição na sensibilidade a recompensa é revertida pelo tratamento crônico com todas as principais classes de drogas antidepressivas e pelo choque eletroconvulsivo, mas não por uma variedade de drogas não-antidepressivas. Além disso, o efeito dos antidepressivos no modelo é semelhante na clínica em um importante aspecto: nas duas situações, o tratamento requer uma administração crônica da droga antidepressiva (2 a 5 semanas) (D'Aquila *et al.*, 1994).

O EBC também causa uma variedade de alterações no sono características da depressão, incluindo diminuição da latência do sono REM, aumento no número de episódios de REM, fragmentação do sono e diminuição do sono de ondas lentas (Cheeta *et al.*, 1997; Gronli *et al.*; 2004).

No presente estudo, os animais que não foram submetidos ao protocolo de EBC e não receberam nenhum tipo de tratamento, aumentaram a média de consumo de sacarose gradativamente até a última semana do experimento. Enquanto que os animais do grupo depressão que passaram pelo protocolo de EBC e não receberam nenhum tipo de tratamento tiveram o consumo diminuindo até a última semana do experimento. Essa diminuição no consumo de sacarose pelo EBC foi descrita por Willner *et al.* em 1987 e reproduzida por diversos pesquisadores (Gronli *et al.*, 2005; Forbes *et al.*, 1996; Mathews *et al.*, 1995; Gronli *et al.*, 2004).

Quando tratados com o antidepressivo tricíclico imipramina, os animais do grupo depressão aumentaram o consumo de sacarose e atingiram média semelhante ao do grupo controle nas primeiras semanas de experimento. Mostrando que este antidepressivo reverte o quadro de anedonia deste modelo animal de depressão como também observado por Willner *et al.* (1987) e Papp *et al.* (1996). Entretanto, a imipramina não produziu nenhum efeito nos animais controles, uma vez que a média de consumo foi igual ao do grupo controle que não recebeu nenhum tratamento.

5.2. Variação dos níveis hipocretina-1

Os níveis de hipocretina-1 variam circadianamente, nos ratos esse neuropeptídeo atinge níveis mais altos durante (ZT 0) à noite e mais baixos durante o dia (ZT 8) (Hungs & Mignot, 2001, Taheri *et al.*, 2002, Pedrazzoli *et al.*, 2004). Como no experimento 1, a nossa hipótese era que os níveis de hipocretina aumentassem com o tratamento antidepressivo, o líquido cefalorraquidiano dos ratos foi coletado a tarde 15hs, (ZT 8) quando os níveis de hipocretina estão mais baixos, evitando o possível efeito teto, já descrito anteriormente (Pedrazzoli *et al.*, 2004).

Neste experimento, observou-se que apenas o antidepressivo imipramina, que possui uma maior influência sobre o sistema noradrenérgico quando comparado ao serotoninérgico, produziu alterações nos níveis de hipocretina-1, enquanto que o antidepressivo que possui uma maior influência sobre o sistema serotoninérgico fluoxetina não produziu nenhum efeito significativo nos níveis deste neuropeptídeo. Sugerindo que o efeito antidepressivo da imipramina pode ser mediado pelas hipocretinas, uma vez que a mais densa projeção dos neurônios hipocretinérgicos dirige-se para o *locus coeruleus*, um importante núcleo noradrenérgico que participa da regulação de aspectos emocionais tais como a depressão (Aston-Jones *et al.*, 1996; Murai & Akaike, 2005).

O aumento da ação sináptica da noradrenalina pelos antidepressivos tricíclicos confirma a hipótese monoaminérgica de que a fisiopatologia da depressão maior é caracterizada, em parte, pela deficiência de noradrenalina. Uma alteração da bioquímica noradrenérgica tem sido observada em ratos que foram submetidos ao modelo de depressão, a qual pode ser normalizada com a administração de antidepressivos tricíclicos. Esta classe de antidepressivos aumenta a transmissão noradrenérgica pela ligação ao transportador de noradrenalina, uma proteína de membrana plasmática responsável pela recaptação da noradrenalina na fenda sináptica (Papp *et al.*, 1994).

Em vista desse resultado, no segundo experimento observamos que ratos submetidos a um modelo animal de depressão têm seus níveis de hipocretina-1 reduzidos. Como nesse experimento o esperado era que os níveis diminuíssem, o líquido cefalorraquidiano foi coletado de manhã (7h, ZT 0), quando estes níveis ainda estão altos.

Nos animais que foram submetidos ao protocolo de EBC, os níveis de hipocretina-1 diminuíram. Os animais que passaram pelo EBC e depois foram tratados com o antidepressivo tricíclico imipramina atingiram níveis semelhantes aos dos controles nas primeiras semanas do experimento. Já os controles que receberam imipramina não apresentaram alterações nos níveis de hipocretina-1, provavelmente devido ao efeito teto, diferente do experimento 1 onde o líquido cefalorraquidiano foi coletado à tarde.

Interessantemente, a redução no consumo da solução de sacarose e os baixos níveis de hipocretina são concomitantes, assim como o aumento dos níveis de hipocretina-1 coincidem com o aumento do consumo de sacarose e conseqüentemente com a reversão do quadro de anedonia provocado pelo modelo animal de depressão.

Ratos da linhagem Wistar-Kyoto são considerados um modelo genético de depressão que apresentam padrões alterados de sono e comportamento similares aos observados no pacientes humanos, incluindo aumento no tempo de sono REM total, curta latência de REM e aumento da fragmentação do sono (Dugovic *et al.*, 2000). Allard *et al.* (2004) comparando ratos dessa linhagem com ratos Wistar relataram que os animais considerados modelo genético de depressão possuem 18% a menos neurônios hipocretinérgicos os quais são 15% menores do que os neurônios observados nos ratos da linhagem Wistar. Taheri *et al.* em 2001 encontraram uma diminuição de 22% no RNAm de prepró-hipocretina em ratos Wistar-Kyoto. Assim, um reduzido número de RNAm da prepró-hipocretina nestes ratos pode refletir na redução no número dos neurônios hipocretinérgicos. Juntos, estes achados sustentam que o padrão alterado de sono dos ratos Wistar-Kyoto pode ser causado, em parte, pela redução dos neurônios hipocretinérgicos. Porém, Salomon *et al.* (2003), analisando os níveis de hipocretina-1 no líquido cefalorraquidiano de pacientes com diversos tipos de transtornos de humor (pacientes com transtorno bipolar do tipo I, bipolar do tipo II e outros com transtorno unipolar) observaram que os níveis não diminuem significativamente nestes pacientes.

O tratamento crônico com antidepressivos causa uma diminuição de receptores beta-adrenérgicos, um efeito também observado na privação de sono REM. Essa diminuição (*down-regulation*) é sugerida pelo aumento da liberação de noradrenalina no cérebro durante a privação de sono REM (Pedrazzoli & Benedito, 2004).

A similaridade entre os efeitos do tratamento crônico com antidepressivos e a privação de sono REM em relação ao *down-regulation* de receptores beta-adrenérgicos sugere um envolvimento da neurotransmissão noradrenérgica cerebral no efeito antidepressivo destes dois tipos de tratamento. Os resultados do presente estudo suportam a idéia de que a hipocretina pode estar envolvida neste mecanismo.

Embora a depressão tenha sido freqüentemente associada com alterações de diversas classes de neurotransmissores e hormônios, a relação da depressão com os padrões alterados de sono, ainda não está bem elucidada, o que contribui para a hipótese de que as hipocretinas possuem um possível envolvimento na fisiopatologia deste distúrbio, uma vez que estas atuam na regulação do sono. Os nossos dados até o momento confirmam esta hipótese.

6. CONCLUSÕES

6.1. A administração crônica (21 dias) de imipramina (antidepressivo tricíclico) aumenta os níveis de hipocretina-1 no líquido cefalorraquidiano de ratos, mas esse efeito não é observado com a administração de fluoxetina (inibidor seletivo da recaptação de serotonina).

6.2. O modelo de Estresse Brando Crônico adaptado de Willner *et al.* (1987) utilizado neste estudo produziu anedonia nos ratos, mensurada pela redução no consumo de sacarose.

6.3. Os animais submetidos a este modelo animal de depressão apresentaram níveis de hipocretina-1 significativamente mais baixos quando comparados aos níveis de hipocretina-1 dos animais controles.

6.4. O tratamento com o antidepressivo tricíclico imipramina reverteu o quadro anedônico e os níveis de hipocretina-1 quando comparado aos animais não tratados. **6.5.** Em vista dos resultados obtidos neste presente estudo, o sistema hipocretinérgico pode estar associado, junto com outros sistemas de neurotransmissão, à fisiopatologia da depressão e ao tratamento com algumas classes de antidepressivos.

7.1. Anexo 1



Universidade Federal de São Paulo
Escola Paulista de Medicina

Comitê de Ética em Pesquisa
Hospital São Paulo

São Paulo, 9 de junho de 2006.
CEP 0513/06

Ilmo(a). Sr(a).
Pesquisador(a) JOSY CAROLINA COVAN PONTES
Co-Investigadores: Mario Pedrfazzoli Neto, Sergio Tufik (orientador)
Disciplina/Departamento: Psicobiologia/Medicina e Biologia do Sono da Universidade Federal de São Paulo/Hospital São Paulo
Patrocinador: Recursos Próprios.

PARECER DO COMITÊ DE ÉTICA INSTITUCIONAL

Ref: Projeto de pesquisa intitulado: "Níveis de hipocretina-1 no líquido cefalorraquidiano de ratos tratados com antidepressivos e em um modelo animal em depressão".

CARACTERÍSTICA PRINCIPAL DO ESTUDO: experimental, categoria C.

RISCOS ADICIONAIS PARA O PACIENTE: não se aplica.

OBJETIVOS: Verificar se o tratamento com drogas antidepressivas teria efeito semelhante à privação de sono nos níveis de hipocretina-1 no líquido cefalorraquidiano de ratos. Observar se há alteração nos níveis desse peptídeo no líquido cefalorraquidiano de ratos submetidos a um protocolo de estresse brando crônico. Comparar os níveis de hipocretina-1 dos ratos submetidos ao estresse brando crônico após tratamento com antidepressivo tricíclico, com os não tratados..

RESUMO: Estudo com 98 ratos Wistar. Anestésico: halotano. Eutanásia: hidrato de cloral. No experimento 1, serão utilizados 45 animais divididos em 3 grupos: controle, imipramina e fluoxetina. Os animais serão tratados durante 21 dias com os antidepressivos imipramina (10mg/kg/dia) e fluoxetina (10mg/kg/dia) intraperitonealmente. No experimento 2, os ratos serão treinados a consumir uma solução de sacarose 1%, e divididos em 2 grupos: controle e depressão. O grupo controle será subdividido em 2 subgrupos: tratado com antidepressivo imipramina e outro não tratado. O grupo depressão será submetido a um protocolo de estresse brando crônico e também será subdividido em 2 sub-grupos: tratado com imipramina e controle. Os animais do grupo depressão serão submetidos a um protocolo de estresse brando crônico durante 2 semanas. Será coletado líquido cefalorraquidiano para dosagem de hipocretina-1, dosados por radioimunoensaio.

FUNDAMENTOS E RACIONAL: Estudo visando avaliar o níveis de hipocretina-1 no líquido cefalorraquidiano de ratos tratados com antidepressivos, em modelo de depressão por estresse brando crônico.

MATERIAL E MÉTODO: Descreve o modelo utilizado, e os procedimentos a serem realizados.

DETALHAMENTO FINANCEIRO: sem financiamento externo.

CRONOGRAMA: 24 meses.

OBJETIVO ACADÊMICO: mestrado.

ENTREGA DE RELATÓRIOS PARCIAIS AO CEP PREVISTOS PARA: 4/6/2007 e 29/5/2008.



Universidade Federal de São Paulo
Escola Paulista de Medicina

Comitê de Ética em Pesquisa
Hospital São Paulo

O Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal de São Paulo/Hospital São Paulo **ANALISOU e APROVOU** o projeto de pesquisa referenciado.

1. Comunicar toda e qualquer alteração do projeto.
2. Comunicar imediatamente ao Comitê qualquer evento adverso ocorrido durante o desenvolvimento do estudo.
3. Os dados individuais de todas as etapas da pesquisa devem ser mantidos em local seguro por 5 anos para possível auditoria dos órgãos competentes.

Atenciosamente,

Prof. Dr. José Osmar Medina Pestana
Coordenador do Comitê de Ética em Pesquisa da
Universidade Federal de São Paulo/ Hospital São Paulo

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Ahima RS, Osei SY. Molecular regulation of eating behavior: new insights and prospects for therapeutic strategies. **Trends Mol. Med.** v.7, p. 205-214, 2001.

Airaksinen MS, Alanen S, Szabat E, Visser TJ, Panula P. Multiple neurotransmitters in the tuberomammillary nucleus: comparison of rat, mouse and guinea pig. **J. Comp. Neurol.** v. 323, n. 1, p. 103-116, 1992.

Allard JS, Tizabi Y, Shaffery JP, Truth CO, Manaye K. Stereological analysis of the hypothalamic hypocretin/orexin neurons in an animal model depression. **Neuropeptides**, v.38, p.311-315, 2004.

Allard JS, Tizabi Y, Shaffery JP, Manaye K. Effects of rapid eyes movement sleep deprivation on hypocretin neurons in the hypothalamus of a rat model of depression. **Neuropeptides**, v.41, n.5, p. 329-37, 2007.

Alt A, Nisenbaum ES, Bleakman D, Witkin JM. A role for AMPA receptors in mood disorders. **Biochem. Pharmacol.** V.71, n.9, p. 1273-1288, 2006.

Altar CA. Neurotrophins and depression. **Trends Pharmacol. Sci.** v. 20, p. 59-61, 1999.

Anisman H, Matheson K. Stress, depression, and anhedonia: Caveats concerning animal models. **Neuroscience and Biobehavioral Reviews**, v.29, p.525-546, 2005.

Arborelius L, Owens MJ, Plotsky PM, Nemeroff CB. The role of corticotropin-releasing factor in depression and anxiety disorders. **J. Endocrinol.** v. 160, p. 1-12, 1999.

Aston-Jones G, Akaoka H, Charléty P, Chouvet G. Serotonin selectively attenuates glutamate-evoked activation of noradrenergic locus coeruleus neurons. **J. Neurosci.** v.11, n.3, p. 760-769, 1991.

Aston-Jones A, Rajkowski J, Kubiak P, Valentino RJ, Shipley MT. Role of the locus coeruleus in emotional activation. **Prog. Brain Res.**, v.107, p.379-402, 1996.

Baldessarini RJ. Current status of antidepressants: clinical pharmacology and therapy. **J. Clin. Psychiatry**, v.50, n.4, p. 117-126, 1989.

Baumann CR, Bassetti CL. Hypocretins (orexins) and sleep-wake disorders. **Lancet Neurol.**, v.4, n.10, p. 673-682, 2005.

Bayer L, Eggermann E, Serafin M, Saint-Mieux B, Machard D, Jones B, Mühlethaler M. Orexins (hypocretins) directly excite tuberomammillary neurons. **European Journal of Neuroscience**, v.14, n.9, p.1571-1575, 2001.

Berke JD, Hyman SE. Addiction, dopamine, and the molecular mechanisms of memory. **Neuron**. v. 25, p. 515-532, 2000.

Berton O, Nestler EJ. New approaches to antidepressant drug discovery: beyond monoamines. **Nat. Rev. Neurosci.**, v.7, n.2, p. 137-151, 2006.

Bourgin P, Huitrón-Réndiz S, Spier AD, Fabre V, Morte B, Criado JR, Sutcliffe JG, Henriksen SJ, DeLecea L. Hypocretin-1 modulates rapid eye movement sleep through activation of locus coeruleus neurons. **J. Neurosci.** v.20, n.20, p. 7760-S, 2000.

Bremner JD, Narayan M, Anderson ER, Staib LH, Miller HL, Charney DS. Hippocampal volume reduction in major depression. **Am. J. Psychiatry**. v. 157, p. 115-118, 2000.

Brown RE, Sergeeva O, Eriksson KS, Hass HL. Orexin A excites serotonergic neurons in the dorsal raphe nucleus of the rat. **Neuropharmacology**, v.40, n.3, p. 457-459, 2001.

Burdakov D. Electrical signaling in central orexin/hypocretin circuits: tuning arousal and appetite to fit the environment. **Neuroscientist**, v.10, n.4, p.286-291, 2004.

Carlezon WA, Thome J, Olson VG, Lane-Ladd SB, Brodtkin ES, Hiroi N, Duman RS, Neve RL, Nestler EJ. Regulation of cocaine reward by CREB. **Science**. v. 282, p. 2272-2275, 1998.

Cheeta S, Ruyt G, Proosdij J, Willner P. Changes in sleep architecture following chronic mild stress. **Biological Psychiatry**, v.41, p.419-427, 1997.

Chemelli RM, Willie JT, Sinton CM, Elmquist JK, Scammell T, Lee C, Richardson JA, Williams SC, Xiong Y, Kisanuki Y, Fitch TE, Nakazato M, Hammer RE, Saper CB, Yanagisawa M. Narcolepsy in orexin knockout mice: molecular genetics of sleep regulation. **Cell**, v.98, n.4, p. 437-451, 1999.

Chou TC, Bjorkum AA, Gaus SE, Lu J, Scammell TE, Saper CB. Afferents to the ventrolateral preoptic nucleus. **J. Neurosci.**, v.22, n.3, p. 997-990, 2002.

Conti AC, Cryan JF, Dalvi A, Lucki L, Blendy JA. CREB is essential for the upregulation of BDNF transcription, but not the behavioral or endocrine responses to antidepressant drugs. **J. Neurosci.**, v.22, n.8, p. 3262-3268, 2002.

D'Áquila PS, Brain PF, Willner P. Effects of chronic mild stress in behavioural tests relevant to anxiety and depression. **Physiology & Behavior**, v.56, p.861-867, 1994.

D'Áquila PS, Newton J, Willner P. Diurnal variation in the effect of chronic mild stress on sucrose intake and preference. **Physiology & Behavior**, v.62, n.2, p.421-426, 1997.

DeLecea L, Kilduff TS, Peyron C, Gao XB, Foye PE, Danielson PE, Fukuhara C, Battenberg ELF, Gautvik VT, Bartlett FS, Frankel WN, Van Del Pol AN, Bloom FE, Gautvik KM, Sutcliffe JG. The hypocretins: hypothalamus-specific peptides with neuroexcitatory activity. **Proceedings National Academy of Science**, v.95, n.1, p.322-327, 1998.

Diagnostic and Statistical Manual IV. American Psychiatric Press, Washington, D.C.

Dranovsky A, Hen R. Hippocampal neurogenesis: regulation by stress and antidepressants. **Biol. Psychiatry**, v.59, n.12, p.1136-1143, 2006.

Dugovic C, Solberg LC, Redei E, Van Reeth O, Turek FW. Sleep in the Wistar-Kyoto rat, a putative genetic animal model for depression. **Neuroreport**, v.11, n.3, p. 627-631, 2000.

Duman RS, Heninger GR, Nestler EJ. A molecular and cellular hypothesis of depression. **Arch. Gen. Psychiatry.** v. 54, p. 597-606, 1997.

Elhwuegi AS. Central monoamines and their role in major depression. **Prog. Neuropsychopharmacol. Biol. Psychiatry**, v.28, n.3, p. 435-451, 2004.

Forbes NF, Stewart CA, Matthews K, Reid IC. Chronic mild stress and sucrose consumption: validity as a model of depression. **Physiology and Behavior**, v.60, n.6, p.1481-1484, 1996.

Fuchs E, Gould E. Mini-review: in vivo neurogenesis in the adult brain: regulation and functional implications. **Eur. J. Neurosci.** v. 12, p. 2211-2214, 2000.

Fujiki N, Yoshida Y, Ripley B, Honda K, Mignot E, Nishino S. Changes in CSF hypocretin-1 (orexin A) levels in rats across 24 hours and in response to food deprivation. **Sleep**, v.12, n.5, p.1-5, 2001.

Fuller RW. Serotonin uptake inhibitors: uses in clinical therapy and in laboratory research. **Prog. Drug Res.**, v.45, p. 167-204, 1995.

Gallopin T, Fort P, Eggeman E, Cauli B, Luppi PH, Rossier J, Audinat E, Mühlethaler M, Serafin M. Identification of sleep-promoting neurons in vitro. **Nature**, v.404, n.6781, p. 992-995, 2000.

Goodwin FK, Bunney WE. Depressions following reserpine: a reevaluation. **Semin. Psychiatry**, v.3, n.4, p. 435-448, 1971.

Gronli J, Murison R, Bjorvatn B, Sorensen E, Portas CM, Ursin R. Chronic mild stress affects sucrose intake and sleep in rats. **Behavioural Brain Research**, v. 150, p. 139-147, 2004.

Gronli J, Murison R, Fiske E, Bjorvatn B, Sorensen E, Portas CM, Ursin R. Effects of chronic mild stress on sexual behavior, locomotor activity and consumption of sucrose and saccharine solutions. **Physiology and Behavior**, v. 84, p. 571-577, 2005.

Hagan JJ, Leslie RA, Patel S, Evans ML, Wattam TA, Holmes S, Benham CD, Taylor SG, Routledge C, Hemmati P, Munton RP, Ashmeade TE, Shah AS, Hatcher JP, Hatcher PD, Jones DN, Smith MT, Piper DC, Hunter AJ, Porter RA, Upton N. Orexin A activates locus coeruleus cell firing and increases arousal in the rat. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v.96, n.19, p. 10911-10916, 1999.

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

Hsu R, Taylor JR, Newton SS, Alvaro JD, Haile C, Han G, Hruby VJ, Nestler EJ, Duman RS. Blockade of melanocortin transmission inhibits cocaine reward. **Eur. J. Neurosci.**, v.21, n.8, p. 2233-2242, 2005.

Hungs M, Mignot E. Hypocretin/orexin, sleep and narcolepsy. **BioEssays**, v.23, p.397-408, 2001.

Kilduff TS, Peyron C. The hypocretin/orexin ligand-receptor system: implications for sleep and sleep disorders. **Trends Neuroscience**, v.23, n.8, p.359-365, 2000.

Koob GF, Sanna PP, Bloom FE. Neuroscience of addiction. **Neuron**. v. 21, p. 467-476, 1998.

Kuroda Y, McEwen BS. Effect of chronic restraint stress and tianeptine on growth factors, growth-associated protein-43, and microtubule-associated protein 2 mRNA expression in rat hippocampus. **Mol. Brain Res**. v. 59, p. 35-39, 1998.

LeDoux JE. Emotion circuits in the brain. **Annu. Rev. Neurosci.** v. 23, p. 155-184, 2000.

Lin L, Faraco J, Li R, Kadotani H, Rogers W, Lin X, Qiu X, Jong PJ, Nishino S, Mignot E. The sleep disorder canine narcolepsy is caused by mutation in the hypocretin (orexin) receptor 2 gene. **Cell**, v.98, p.365-376, 1999.

Liu RJ, van den Pol AN, Aghajanian GK. Hypocretins (orexins) regulate serotonin neurons in the dorsal raphe nucleus by excitatory direct and inhibitory indirect actions. **J. Neurosci.**, v.22, n.21, p. 9453-9464, 2002.

Matthews K, Forbes N, Reid IC. Sucrose consumption as an hedonic measure following chronic unpredictable mild stress. **Physiology and Behavior**, v.57, n.2, p.241-248, 1995.

McEwen BS. Allostasis and allostatic load: implications for neuropsychopharmacology. **Neuropsychopharmacology**. v. 22, p. 108-124, 2000.

McGinty DJ, Harper RM. Dorsal raphe neurons: depression of firing during sleep in cats. **Brain Res.**, v.101, n.3, p. 569-575, 1976.

Methippara MM, Alam MN, Szymusiak R, McGinty D. Effects of lateral preoptic area application of orexina-A on sleep-wakefulness. **Neuroreport**, v.11, n.16, p. 3423-3426, 2000.

Mignot E. A commentary on the neurobiology of the hypocretin/orexin system.

Neuropsychopharmacology, 25:5-13, 2001.

Millan MJ, Lejeune F, Gobert A. Reciprocal autoreceptor and heteroreceptor control of serotonergic, dopaminergic and noradrenergic transmission in the frontal cortex: relevance to the actions of antidepressants agents. **J. Psychopharmacol.**, v.14, n.2, p.114-138, 2000.

Monzon ME, Varas MM, Izquierdo LA, Izquierdo I, Barros DM, de Barioglio SR. Anxiogenesis induced by nitric oxide synthase inhibition and anxiolytic effect of melanin-concentrating hormone (MCH) in rat brain. **Peptides**. v. 22, p. 1043-1047, 2001.

Moreau JL, Jenck F, Martin JR, Mortas P, Haefely WE. Antidepressant treatment prevents chronic unpredictable mild stress-induced anhedonia as assessed by ventral tegmentum self-stimulation behavior in rats. **Eur Neuropsychopharmacol**, v. 2, n. 1, p. 43-49, 1992.

Murai Y, Akaike T. Orexin cause depolarization via nonselective cationic and K⁺ channels in isolated locus coeruleus neurons. **Neuroscience Research**, v.51, p.55-65, 2005.

Nair A, Vaidya VA. Cyclic AMP response element binding protein and brain-derived neurotrophic factor: molecules that modulate our mood? **J. Biosci.**, v.31, n.3, p. 423-434, 2006.

Nambu T, Sakurai T, Mizukami K, Hosoya Y, Yanagisawa M, Goto K. Distribution of orexina neurons in the adult rat brain. **Brain Res.**, v.827, n.1-2, p. 243-260, 1999.

Nemeroff CB. The corticotropin-releasing factor (CRF) hypothesis of depression: new findings and new directions. **Mol. Psychiatry**, v.1, n.4, p. 336-342, 1996.

Nestler EJ. Molecular neurobiology of addiction. **Am. J. Addict.**, v.10, n.3, p. 201-217, 2001.

Nestler EJ, Barrot M, Dileone RJ, Eisch AJ, Gold SJ, Monteggia LM. Neurobiology of Depression. **Neuron**, v.34, p.13-25, 2002.

Nibuya M, Morinobu S, Duman RS. Regulation of BDNF and TrkB mRNA in rat brain by chronic electroconvulsive seizure and antidepressant drug treatments. **J. Neurosci.** v. 15, p. 7539-7547, 1995.

Norrholm SD, Ouimet CC. Altered dendritic spine density in animal models of depression and in response to antidepressant treatment. **Synapse.** v. 42, p. 151-153, 2001.

Papp M, Klimek V, Willner P. Effect of imipramine on serotonergic and beta-adrenergic receptor binding in a realistic animal model of depression. **Psychopharmacology**, v.114, p.309-314, 1994.

Papp M, Moryl E, Willner P. Pharmacological validation of the chronic mild stress model of depression. **European Journal of Pharmacology**, n. 296, p. 129-136, 1996.

Pariante CM, Miller AH. Glucocorticoid receptors in major depression: relevance to pathophysiology and treatment. **Biol. Psychiatry**, v.49, n.5, p. 391-404, 2001.

Pedrazzoli M, Benedito MAC. Rapid eye movement sleep deprivation-induced down-regulation of beta-adrenergic receptors in the rat brainstem and hippocampus. **Pharmacology, Biochemistry and Behavior**, v.79, p.31-36, 2004.

Pedrazzoli M, D'Almeida, Martins PJF, Machado RB, Ling L, Nishino S, Tufik S, Mignot E. Increased hypocretin-1 levels in cerebrospinal fluid after REM sleep deprivation. **Brain Research**, v.995, n.1, p.1-6, 2004.

Peyron C, Tighe DK, van den Pol AN, de Lecea L, Heller HC, Sutcliffe JG, Kilduff TS. Neurons containing hypocretin (orexin) project to multiple neuronal systems. **J. Neurosci.**, v.18, n.23, p. 9996-10015, 1998.

Pliakas AM, Carlson RR, Neve RL, Konradi C, Nestler EJ, Carlezon WA. Altered responsiveness to cocaine and increased immobility in the forced swim test associated with elevated CREB expression in the nucleus accumbens. **J. Neurosci.** v. 21, p. 7397-7403, 2001.

Saito Y, Cheng M, Leslie FM, Civelli O. Expression of the melanin-concentrating hormone (MCH) receptor mRNA in the rat brain. **J. Comp. Neurol.** v. 435, p. 26-40, 2001.

Sakurai T, Amemiya A, Ishii M, Matsuzaki I, Chemelli RM, Tanaka H, Williams SC, Richardson JA, Kozlowski GP, Wilson S, Arch JRS, Buckingham RE, Haynes AC, Carr SA, Annan RS, McNulty DE, Liu W, Terrett JA, Elshourbagy NA, Bergsma DJ, Yanagisawa M. Orexins and orexin receptors: A family of hypothalamic neuropeptides and G protein-coupled receptors that regulate feeding behavior. **Cell**, v.92, n.5, p.573-585, 1998.

Sakurai T. Roles of orexins in regulation of feeding and wakefulness. **Neuroreport**, v.18, n.8, p. 987-995, 2002.

Sakurai T. Roles of orexina/hypocretin in regulation of sleep/wakefulness and energy homeostasis. **Sleep Med. Rev.**, v.9, n.4, p. 231-241, 2005.

Salomon RM, Ripley B, Kennedy JS, Johnson B, Schmidt D, Zeitzer JM, Nishino S, Mignot E. Diurnal variation of cerebrospinal fluid hypocretin-1 (orexin-A) levels in control and depressed subjects. **Biological Psychiatry**, v.54, p.96-104, 2003.

Saper CB, Chou TC, Scammell TE. The sleep switch: hypothalamic control of sleep and wakefulness. **Trends Neurosci.**, v.24, n.12, p. 726-731, 2001.

Saper CB, Scammell TE, Lu J. Hypothalamic regulation of sleep and circadian rhythms. **Nature**, v.437, n.7063, p. 1257-1263, 2005.

Sapolsky RM. Glucocorticoids and hippocampal atrophy in neuropsychiatric disorders. **Arch. Gen. Psychiatry**. v. 57, p. 925-935, 2000.

Schildkraut JJ. The catecholamine hypothesis of affective disorders: a review of supporting evidence. **Am. J. Psychiatry**, v.122, n.5, p. 509-522, 1965.

Sherin JE, Elmquist JK, Torrealba F, Saper CB. Innervation of histaminergic tuberomammillary neurons by GABAergic and galaninergic neurons in the ventrolateral preoptic nucleus of the rat. **J. Neurosci.**, v.18, n.12, p. 4705-4721, 1998.

Shirayama Y, Chen ACH, Nakagawa S, Russell DS, Duman RS. Brain derived neurotrophic factor produces antidepressant effects in behavioral models of depression. **J. Neurosci.**, v.22, n.8, p. 3251-3261, 2002.

Siegel JM. Narcolepsy: a key role for hypocretins (orexins). **Cell**, v.98, n.4, p.409-412, 1999.

Smith MA, Makino S, Kvetnansky R, Post RM. Stress and glucocorticoids affect the expressing of brain-derived neurotrophic factor and neurotrophin-3 mRNAs in the hippocampus. **J. Neurosci.** v. 15, p. 1768-1777, 1995.

Spinazzi R, Rucinski M, Neri G, Malendowicz LK, Nussdorfer GG. Preproorexin and orexina receptors are expressed in cortisol-secreting adenocortical adenomas, and orexins stimulate in vitro cortisol secretion and growth of tumor cells. **J. Clin. Endocrinol. Metab.**, v.90, n.6, p. 3544-3549, 2005.

Steininger TL, Alam MN, Gong H, Szymusiak R, McGinty D. Sleep-waking discharge of neurons in the posterior lateral hypothalamus of the albino rat. **Brain Res.**, v.840, n.1-2, p. 138-147, 1999.

Steininger TL, Gong H, McGinty D, Szymusiak R. Subregional organization of preoptic area/anterior hypothalamic projections to arousal-related monoaminergic cell groups. **J. Comp. Neurol.**, v.429, n.4, p. 638-653, 2001.

Svensson TH. Brain noradrenaline and the mechanisms of action of antidepressant drugs. **Acta Psychiatr. Scand. Suppl.**, v.402, p. 18-27, 2000.

Szymusiak R, Alam N, Steininger TL, McGinty D. Sleep-waking discharge patterns of ventrolateral preoptic/anterior hypothalamic neurons in rats. **Brain Res.**, v.803, n.1-2, p. 178-188, 1998.

Szymusiak R, McGinty D. Effects of basal forebrain stimulation on the waking discharge of neurons in the midbrain reticular formation of cats. **Brain Res.**, v.498, n.2, p. 355-359, 1989.

Taheri S, Gardiner J, Hafizi S, Murphy K, Dakin C, Seal L, Small C, Ghatei M, Bloom S. Orexin-A immunoreactivity and prepro-orexin mRNA in the brain of Zucker and WKY rats. **Neuroreport**, n.12, p.459-464, 2001.

Taheri S, Zeitzer JM, Mignot E. The role of hypocretins (orexins) in sleep regulation and narcolepsy. **Annual Review of Neuroscience**, v.25, p.283-313, 2002.

Vogel GW, Vogel F, McAbee RS, Thurmond AJ. Improvement of depression by REM sleep deprivation. **Arch. Gen. Psychiatry**, v.37, p.247-253, 1980.

Vogel GW, Buffenstern A, Minter K, Hennessey A. Drug effects on REM sleep and on endogenous depression. **Neurosci. Biobehav. Rev.**, v.14, p.49-63, 1990.

Willie JT, Chemelli RM, Sinton CM, Yanagisawa M. To eat or to sleep? Orexin in the regulation of feeding and wakefulness. **Annu. Rev. Neurosci.** v. 24, p. 429-458, 2001.

Willner P. The validity of animal models of depression. **Psychopharmacology**, v.83, p.1-16, 1984.

Willner P, Towell A, Sampson D, Sophokleous S, Muscat R. Reduction of sucrose preference by chronic unpredictable mild stress, and its restoration by a tricyclic antidepressant. **Psychopharmacology**, v.93, p.358-364, 1987.

Wise RA. Drug-activation of brain reward pathways. **Drug Alcohol Depend.** v. 51, p. 13-22, 1998.

Yoshida Y, Fujiki N, Nakajima T, Ripley B, Matsumura H, Yoneda H, Mignot E, Nishino S. Fluctuation of extracellular hypocretin-1 (orexin A) levels in the rat in relation to the light-dark cycle and sleep-wake activities. **Eur. J. Neurosci.**, v.14, n.7, p. 1075-1081, 2001.

Zhu Y, Miwa Y, Yamanaka A, Yada T, Shibahara M, Abe Y, Sakurai T, Goto K. Orexin receptor type-1 couples exclusively to pertussis toxin-insensitive G-proteins, while orexin receptor type-2 couples to both pertussis toxin-sensitive and insensitive G-proteins. **J. Pharmacol. Sci.**, v.92, n.3, p. 259-266, 2003.

Livros Grátis

(<http://www.livrosgratis.com.br>)

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)
[Baixar livros de Matemática](#)
[Baixar livros de Medicina](#)
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)
[Baixar livros de Meteorologia](#)
[Baixar Monografias e TCC](#)
[Baixar livros Multidisciplinar](#)
[Baixar livros de Música](#)
[Baixar livros de Psicologia](#)
[Baixar livros de Química](#)
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)
[Baixar livros de Serviço Social](#)
[Baixar livros de Sociologia](#)
[Baixar livros de Teologia](#)
[Baixar livros de Trabalho](#)
[Baixar livros de Turismo](#)