

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
DEPARTAMENTO DE CIÊNCIAS FISIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FISIOLOGIA**

Martina Podolan

**EFEITO DE UMA ÚNICA INJEÇÃO
INTRACEREBROVENTRICULAR DE IMPRAMINA SOBRE O
COMPORTAMENTO E A NEUROGÊNESE NO HIPOCAMPO
DE CAMUNDONGOS SUÍÇOS ADULTOS: INFLUÊNCIA DA
DOSE, DO AMBIENTE E DO INTERVALO ENTRE
TRATAMENTO E SACRIFÍCIO**

Dissertação submetida ao Programa Multicêntrico de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas da Universidade Federal de Santa Catarina para a obtenção do Grau de Mestre em Ciências Fisiológicas.

Orientadora: Prof^ª. Dr^ª. Cilene Lino de Oliveira

Co-Orientadora: Prof^ª. Dr^ª. Elaine A. Del Bel

Florianópolis
2011

Martina Podolan

**EFEITO DE UMA ÚNICA INJEÇÃO
INTRACEREBROVENTRICULAR DE IMPRAMINA SOBRE O
COMPORTAMENTO E A NEUROGÊNESE NO HIPOCAMPO
DE CAMUNDONGOS SUÍÇOS ADULTOS: INFLUÊNCIA DA
DOSE, DO AMBIENTE E DO INTERVALO ENTRE
TRATAMENTO E SACRIFÍCIO**

Esta Dissertação foi julgada adequada para obtenção do Título de “Mestre em Ciências Fisiológicas” e aprovada em sua forma final pelo Programa Multicêntrico de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas.

Florianópolis, 25 de Fevereiro de 2011.

Prof.^a, Dr.^a Cilene Lino de Oliveira
Coordenadora do Curso

Banca Examinadora:

Prof.^a, Dr.^a Cilene Lino de Oliveira,
Orientadora
Universidade Federal de Santa Catarina

Prof.^a, Dr.^a Thereza Christina Monteiro de Lima,
Universidade Federal de Santa Catarina

Prof.^a, Dr.^a Carla Inês Tasca,
Universidade Federal de Santa Catarina

Prof., Dr. José Marino Neto,
Universidade Federal de Santa Catarina

Dedico este trabalho,
À minha mãe,
Meu filho e
Meu pai

AGRADECIMENTOS

Estava pensando em como fazer esses agradecimentos e não sabia como começar, então fiquei pensando em todos que me ajudaram, não só em meu experimento, mas também com todos os aprendizados que tive nesses últimos dois anos. Foram tantas pessoas que me ajudaram nessa jornada que é difícil nomear a todos, mas se esqueci de algum nome sinta-se agradecido.

As primeiras pessoas que devo agradecer são minha mãe e meu filho por toda a paciência que tiveram durante esse tempo, e meu pai que me apóia em todos os momentos difíceis.

Agradeço a todos do laboratório, que foram muito mais que colegas, foram amigos, a Cris por me ajudar nos primeiros passos, ao Fernando, que considero como um irmão, ao Tiago, sem h mesmo, ao Crispim, o intelectual da turma (pelo menos na pose), a Fernanda que apesar de chegar nos últimos minutos me ajudou mais do que imagina e a nossa técnica Sandra. A todos os estagiários pelas conversas engraçadas: Bia, Fernandinha e Vivi. À Thais, por me ajudar com os vídeos e especialmente ao meu fiel escudeiro Juliano, que me ajudou em todos os momentos.

Não posso esquecer-me das pessoas que me acolheram em seus lares, as irmãs do pensionato (em especial a Irmã Leonila), a Lauren por me aguentar falando de fisiologia todos os dias. A Mariana que me recebeu em sua casa em Ribeirão. E ao pessoal dos laboratórios que me recebeu (à prof^a Elaine) e me ensinou muitas coisas, aos professores que me deram aula em cada uma das nucleadoras e ao Dr. Antunes, pois sem ele não estaria nesse curso de mestrado. À minha orientadora prof^a Cilene e ao prof. Marino, que me ensinaram a ouvir mais (“Martina! fica quieta e escuta”).

KEEP WALKING....

Johnnie Walker®

RESUMO

A imipramina é um fármaco antidepressivo que promove alterações comportamentais e aumenta a neurogênese hipocampal (formação de novos neurônios) após o tratamento crônico. Em contraste com o tratamento crônico, os mecanismos responsáveis pelos efeitos agudos desse fármaco são pouco estudados. Este trabalho teve por objetivo avaliar os efeitos agudos deste fármaco sobre a neurogênese no giro denteado do hipocampo do cérebro de camundongos adultos. Foram utilizados camundongos Suíços machos, em idade reprodutiva (~60 dias), alojados em ambiente padrão ou em ambiente enriquecido por 30 dias. No 30º dia foi realizada cirurgia estereotáxica para inserção de uma cânula no ventrículo lateral direito. No 7º dia de recuperação os animais receberam intracerebroventricularmente (icv) salina (sal, 1 µl) ou imipramina (imi, 0,2; 0,06 nmol/µl; 1 µl) e foram submetidos ao teste de campo aberto imediatamente após a injeção e sacrificados 24 h ou 2h após o teste por perfusão cardíaca. Os cérebros foram retirados e seccionados (50 µm) em micrótomo de congelamento. Foi empregada imunistoquímica para detecção das proteínas Ki-67 ou doublecortina (DCX) para revelar a presença de células proliferativas (Ki-67+) ou de células imaturas comprometidas com o fenótipo neuronal no GD (DCX+), respectivamente. As secções foram fotografadas (mínimo de 5/animal) em microscópio óptico de campo claro (objetiva de 20x) e o número de células Ki-67+ e DCX+ foi contado com auxílio do programa ImageJ® (NIH). A análise estatística foi feita com teste ANOVA não paramétrico Kruskal-Wallis seguido do teste pos hoc Mann-Whitney. Os resultados mostram uma redução no número de células Ki-67+ na dose de 0,06 nmol/µl e um aumento das células DCX+ na dose de 0,2 nmol/µl nos animais do ambiente padrão. Não houve alterações comportamentais no teste de campo aberto, em nenhum dos grupos avaliados. Concluindo, o tratamento agudo icv com imipramina afeta a neurogênese hipocampal de forma dose-, ambiente- e tempo entre tratamento e sacrifício- dependente. O ambiente enriquecido não alterou os parâmetros avaliados, no entanto reverteu os efeitos da imipramina que ocorreram no ambiente padrão.

Palavras-chaves: Hipocampo, neurogênese, doublecortina, Ki-67, ambiente enriquecido, intracerebroventricular.

ABSTRACT

Imipramine is an antidepressant drug which induces behavioral alterations and increased adult hippocampal neurogenesis (generation of newborn neurons) after chronic treatment. In contrast to chronic treatment, the mechanisms underlying the acute effects of this drug are not well studied. This work aimed to assess the effect of acute treatment with this drug on the neurogenesis in the dentate gyrus (DG) of hippocampus of the adult mice brain. Male Swiss mice, on reproductive age (~60 days), were housed on a standard environment (SE) or an enriched environment (EE) for 30 days. At the 30th day, a stereotactic surgery was performed to insert a cannula into the right lateral ventricle. On the 7th recovery day, mice received an intracerebroventricular (icv) injection of saline (sal, 1µl) or imipramine (Imi, 0.2 or 0.06 nmol/µl, 1 µl) and were tested in an open field immediately after the injection. They were sacrificed by cardiac perfusion, at 24 or 2 h after icv injections. The brains were collected and sectioned by a freezing microtome into 50µm sections. Immunohistochemical detection to Ki-67 protein and doublecortin were used to reveal the presence of proliferative cells (Ki-67+) and immature cells committed to neuronal phenotype on DG (DCX+), respectively. The sections were photographed (minimum of 5/animal) in bright field optical microscope (objective lens of 20x) and the number of Ki-67+ or DCX+ cells in the DG were counted using the ImageJ[®] software (NIH). Non-parametric Kruskal-Wallis ANOVA test followed by Mann-Whitney's test or Mann-Whitney's test alone were used in the statistical analysis. Results showed that, in the animals housed in SE and sacrificed 24 h after treatment, imi 0.06 nmol/µl decreased counts of Ki-67+ cells in DG, while Imi 0.2 nmol/µl increased significantly the scores of DCX+ cells in this region. No significant alteration was observed on open field test after any treatment. In conclusion, acute icv treatment with imipramine affects hippocampal neurogenesis in a dose-, environment- and time-dependent fashion. Moreover, the enriched environment did not alter the evaluated parameters *per se*, however reverted the effects of acute imipramine on hippocampal neurogenesis.

Key-words: Hippocampus, neurogenesis, doublecortin, Ki-67, enriched environment, intracerebroventricular.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Esquema das células nas diferentes fases da neurogênese ..	32
Figura 2 - Etapas da proliferação, diferenciação e maturação celular e a expressão dos marcadores celulares	33
Figura 3 – Desenho Experimental	39
Figura 4 – Tipos de Alojamento	42
Figura 5 – Esquema da seqüência das fotos da microscopia	46
Figura 6 – Marcação de DCX e Ki-67.....	48
Figura 7 – Critério para inclusão na análise	49
Figura 8 – Efeito das injeções icv de imipramina sobre o número de células proliferativas no GD de camundongos Suíço sacrificados 24 h após a injeção	53
Figura 9 – Efeito das injeções icv de imipramina sobre o número de neurônios novos no GD de camundongos Suíço sacrificados 24 h após a injeção	54
Figura 10 – Efeito do alojamento em camundongos Suíço machos sem cirurgia e sem tratamento farmacológico	59
Figura 11 - Efeito da injeção icv de imipramina sobre o número de células Ki-67+ do grupo sacrificado 2 h após a injeção	64
Figura 12 – Efeito da injeção icv de imipramina sobre o número de células DCX+ do grupo sacrificado 2 h após a injeção	65
Figura 13 – Animais excluídos da análise	87
Figura 14 - Tempo de locomoção no teste de campo aberto	89
Figura 15 - Tempo de imobilidade no teste de campo aberto.....	90

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Exemplos de fármacos antidepressivos e seus mecanismos de ação.	24
Tabela 2 – Comportamento de diferentes espécies animais no TNF....	26
Tabela 3 – Comportamentos de ratos e camundongos no teste de campo aberto.....	28
Tabela 4 – Marcadores Celulares	33
Tabela 5 – Efeitos do tratamento com fármacos antidepressivos sobre a neurogênese.....	35
Tabela 6 – Tempo gasto em cada um dos comportamentos do teste de campo aberto	51
Tabela 7 – Número de animais, média e erro padrão da média para células Ki67+, dos animais sacrificados 24 h após a injeção	52
Tabela 8 – Número de animais, média e erro padrão da média para células DCX+, do grupo sacrificado 24 h após a injeção	54
Tabela 9 – Correlações entre os comportamentos avaliados no teste de campo aberto com o número de células Ki-67+	57
Tabela 10 – Correlações entre os comportamentos avaliados no teste de campo aberto com o número de células DCX+.....	57
Tabela 11 - Número de animais, média e erro padrão da média para células Ki-67+ e DCX+ dos animais sem cirurgia e sem tratamento farmacológico.....	58
Tabela 12 – Número de animais, média, erro padrão da média e estatística para células Ki67+ do grupo sacrificado 2h após a injeção	64
Tabela 13 – Efeito da injeção icv de imipramina sobre o número de células DCX+ do grupo sacrificado 2 h após a injeção	65
Tabela 14 – Dados estatísticos para as medidas de células Ki-67+, dos animais sacrificados 24 h após a injeção	90
Tabela 15 – Dados estatísticos para as medidas de células DCX+, dos animais sacrificados 24 h após a injeção	91
Tabela 16 – Dados estatísticos para as medidas das células DCX+ e Ki-67+ dos animais sem cirurgia e sem tratamento farmacológico.....	91

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

MAO – Monoamina-oxidase
SNC – Sistema Nervoso Central
NA – Noradrenalina
5-HT – 5-hidroxitriptamina (Serotonina)
DA - Dopamina
INSRNS – Inibidor não seletivo de recaptção de noradrenalina e serotonina
ISRN – Inibidor seletivo de recaptção de noradrenalina
ISRS – Inibidor seletivo de recaptção de serotonina
iMAO – Inibidor da monoamina-oxidase
ISRD – Inibidor seletivo de recaptção de Dopamina
IRSN – Inibidor de recaptção de serotonina e noradrenalina
TNF – Teste de nado forçado
DCX – Doublecortina
ZSV – Zona sub-ventricular
ZSG – Zona sub-granular
GD – Giro denteado
HD – hipocampo dorsal
HV – hipocampo ventral
BrdU – 5'-bromo-2'-deoxyuridine
icv – intracerebroventricular
i.p – Intraperitoneal
VL – ventrículo lateral
Imi - imipramina
TCA – Teste de campo aberto
POP – Procedimento operacional padrão
DAB – 3,3'-diaminobenzidina

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	01
1.1	AS MONOAMINAS E OS EFEITOS DO TRATAMENTO COM FÁRMACOS ANTIDEPRESSIVOS SOBRE O COMPORTAMENTO DE ROEDORES ADULTOS	01
1.2	NEUROGÊNESE NO HIPOCAMPO DE ROEDORES ADULTOS E SUA IMPORTÂNCIA PARA O EFEITO COMPORTAMENTAL DOS FÁRMACOS ANTIDEPRESSIVOS	30
1.3	HIPÓTESES	36
1.4	OBJETIVOS	37
1.4.1	Objetivos Específicos.....	37
1.5	ESTRATÉGIA DE AÇÃO	37
1.6	DESENHO EXPERIMENTAL	38
2	MATERIAIS E MÉTODOS.....	41
2.1	OBTENÇÃO DOS ANIMAIS E AS CONDIÇÕES DE ALOJAMENTO	41
2.2	CIRURGIA ESTEREOTÁXICA	42
2.3	VIA DE ADMINISTRAÇÃO	43
2.4	TESTE PARA OBSERVAÇÃO DE COMPORTAMENTOS DE DEFESA	43
2.5	ANÁLISE DO COMPORTAMENTO NO TCA	43
2.6	EUTANÁSIA	44
2.7	MICROTOMIA	44
2.8	IMUNOISTOQUÍMICA PARA OS MARCADORES DE NEURÔNIOS NOVOS E CÉLULAS EM PROLIFERAÇÃO	45
2.9	MICROSCOPIA	46
2.10	CONTAGEM DE CÉLULAS	47
2.11	CRITÉRIOS PARA INCLUSÃO NA ANÁLISE	48
2.12	ANÁLISE ESTATÍSTICA	49
3	RESULTADOS.....	51
3.1	EFEITO DO TRATAMENTO AGUDO COM IMI ICV SOBRE O COMPORTAMENTO DOS CAMUNDONGOS SUÍÇOS ADULTOS NO CAMPO ABERTO: INFLUÊNCIA DA DOSE E DA CONDIÇÃO DE ALOJAMENTO	51
3.2	EFEITOS DAS DIFERENTES DOSES DE IMPRAMINA SOBRE O NÚMERO DE CÉLULAS EM PROLIFERAÇÃO KI-	

	67+ E DOS NEURÔNIOS NOVOS (DCX+) NO GD DO HIPOCAMPO	52
3.3	CORRELAÇÃO ENTRE OS COMPORTAMENTOS OBSERVADOS NO CAMPO ABERTO E O NÚMERO DE CÉLULAS Ki-67+ E DCX+ NO GD DOS CAMUNDONGOS SUÍÇOS ADULTOS: INFLUÊNCIA DA DOSE DE IMIPRAMINA	57
3.4	EFEITOS DO TIPO DE AMBIENTE SOBRE O NÚMERO DE CÉLULAS EM PROLIFERAÇÃO Ki-67+ E DOS NEURÔNIOS NOVOS (DCX+) NO GD DO HIPOCAMPO	58
3.5	INFLUÊNCIA DO INTERVALO ENTRE O TRATAMENTO E O SACRIFÍCIO SOBRE O NÚMERO DE CÉLULAS EM PROLIFERAÇÃO KI-67+ E DOS NEURÔNIOS NOVOS (DCX+) NO GD DO HIPOCAMPO	63
4	CONCLUSÃO	67
	REFERÊNCIAS	69
	ANEXO 1 – PROCEDIMENTO OPERACIONAL PADRÃO	81
	ANEXO 2 – PROTOCOLO DE DIAFANIZAÇÃO	85
	ANEXO 3 – CONTROLE DOS EXPERIMENTOS IMUNOISTOQUÍMICOS	87
	ANEXO 4 – DADOS ESTATÍSTICOS	89

1 INTRODUÇÃO

1.1 AS MONOAMINAS E OS EFEITOS DO TRATAMENTO COM FÁRMACOS ANTIDEPRESSIVOS SOBRE O COMPORTAMENTO DE ROEDORES ADULTOS

Os fármacos chamados antidepressivos englobam uma variedade de substâncias diferentes que têm em comum a propriedade de aliviar sintomas de transtornos depressivos em seres humanos (*Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders- DSM-IVTR*).

Existem várias categorias de fármacos antidepressivos classificados de acordo com seus mecanismos de ação, determinados em estudos “*in vitro*” (PALIJ e STAMFORD, 1996; SPECTOR et al., 1960; CARLSSON, 1970; ROSS e RENYI, 1975; MAÏTRE et al., 1980, ver Tabela 1). Estes estudos revelam que muitos destes fármacos são inibidores da recaptção de monoaminas (serotonina, noradrenalina, dopamina) ou inibidores da atividade das monoamina-oxidases (MAO), enzimas responsáveis pela degradação destas monoaminas (LEVITT et al., 1997; KOE et al., 1990; LEMBERGER, 1986). A inibição do sistema de recaptção das monoaminas ou a inibição da MAO aumenta os níveis destes neurotransmissores no meio extracelular (ROSS e RENYI, 1975; SPECTOR et al., 1960; LI et al., 1996). Dados deste tipo ajudaram a criar as teorias que descrevem os distúrbios depressivos como resultado da deficiência da neurotransmissão mediada por um, ou mais destes neurotransmissores no sistema nervoso central (SNC) (DELGADO et al., 1990; GOLD et al., 1988).

De acordo com essas teorias, o aumento dos níveis extracelulares de monoaminas no SNC seria o mecanismo responsável pelo efeito antidepressivo destes fármacos em humanos e pelos efeitos comportamentais observados em outras espécies animais (TRILLAT et al., 1998; BROCCO et al., 2002; SANTARELLI et al., 2003; XU et al., 2010). Contudo, a regulação dos níveis extracelulares das monoaminas no SNC parece não ser o único mecanismo relevante para o efeito dos antidepressivos. Na maioria das espécies estudadas, esses níveis já aumentam no início do tratamento com os fármacos antidepressivos (RAWLINGS et al., 2010). Em roedores, os efeitos comportamentais destes fármacos variam com o tempo de utilização e com a espécie estudada (VOGEL et al., 1985; TRILLAT et al., 1998; GRIEBEL et al., 1995; MALHOTRA e SANTOSH, 1996).

Tabela 1. Exemplos de fármacos antidepressivos e seus mecanismos de ação

Nome do fármaco	Mecanismo de ação	Abreviatura	Referência
Imipramina	Inibidor não-seletivo da recaptação de NA e 5-HT	INSRNS	CARLSONN, 1970; ROSS e RENYI, 1975; GLOWINSKI e AXELROD, 1964
Desipramina, nisoxetina	Inibidor seletivo da recaptação de NA.	ISRN	PALIJ e STAMFORD, 1996; ROSS e RENYI, 1975
Fluoxetina, citalopram	Inibidor seletivo da recaptação de 5-HT	ISRS	LEMBERGER, 1986; MAÎTRE e cols., 1980
Iproniazida, fenilakildrazina (JB835)	Inibidor da Monoamina-oxidase	iMAO	SPECTOR e cols., 1960
Piperazina, GBR 12935	Inibidor seletivo da recaptação de DA	ISRD	LI e cols., 1996

NA = noradrenalina, 5-HT = serotonina, MAO = monoamina-oxidase, DA = dopamina

Na clínica os fármacos antidepressivos são utilizados para tratar diferentes sintomas de distúrbios psiquiátricos, como humor deprimido, perda de prazer por quase todas as atividades, alterações no apetite, peso ou sono; diminuição da energia; sentimentos de culpa; entre outros (*Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders- DSM-IVTR*; ADAMSON, 1947), e seus efeitos são observados após 3-4 semanas de tratamento. No entanto, alguns estudos têm mostrado que uma única dose de antidepressivo afeta o processamento emocional, num período de 30 min até 3 h depois da administração, em humanos (HARMER et al., 2009; HARMER et al., 2010). Por exemplo, a administração aguda de antidepressivos facilita o reconhecimento de rostos felizes em voluntários saudáveis ou deprimidos (HARMER et al., 2009; RAWLINGS et al., 2010). Para facilitar os estudos e compreender os mecanismos envolvidos na ação dos fármacos antidepressivos foram desenvolvidos vários modelos animais, especialmente em roedores.

Dois modelos muito utilizados para detecção de fármacos com potencial antidepressivo e para o estudo da neurobiologia de distúrbios comportamentais sensíveis aos compostos antidepressivos são o “desamparo aprendido” (do inglês, *learned helplessness*) e o “desespero comportamental” (do inglês, *behavioral despair*) (para revisão ver NESTLER e HYMAN, 2010). Tanto o “desamparo aprendido” (HO e WANG, 2010), como o “desespero comportamental” são caracterizados por inibição comportamental desencadeada por estresse de caráter incontrolável. No primeiro paradigma são realizadas várias sessões (pré-teste) nas quais o animal é submetido a uma série de choques, nas patas ou no rabo, e não há nada que ele possa fazer (esquivar, fugir ou lutar) que impeça a continuidade dos mesmos. Quando submetido novamente a esta condição (teste), porém com a possibilidade de se esquivar ou fugir dos choques, os animais não o fazem (HO e WANG, 2010; SONG et al., 2006). A inibição dos comportamentos de defesa, da esquila ou da fuga, no dia do teste é denominada “desamparo aprendido”. O tratamento crônico sistêmico (SONG et al., 2006; MARTIN et al., 1990) ou intra-hipocampal (JOCA et al., 2003) com fármacos antidepressivos previne o “desamparo aprendido”, ou seja, facilita o aparecimento da esquila ou da fuga no dia do teste.

O “desespero comportamental” é observado em ratos e em camundongos expostos ao teste de nado forçado (TNF). O TNF é realizado colocando-se o animal em um recipiente com água em quantidade suficiente para que o animal não possa apoiar-se no fundo e uma borda alta suficiente para que não possa pular (PORSOLT, 1979). No protocolo para ratos normalmente é feita uma exposição de 15 min denominada pré-teste e 24 h após é realizado o teste que consiste em 5 min de exposição à situação do nado (PORSOLT et al., 1978; PORSOLT, 1979). No protocolo mais comumente utilizado em camundongos é realizado apenas um teste de 6 min (sem pré-teste) (PORSOLT et al., 1978; PORSOLT et al., 1977a). Estas duas espécies quando submetidas ao nado forçado reagem com um período de atividade intensa, seguido por um período de imobilidade (PORSOLT et al., 1977b; GERSNER et al., 2009; KULKARNI e DHIR, 2007). No teste do nado forçado a redução da imobilidade, acompanhada do aumento dos comportamentos de nadar ou de escalar, é um indicativo do potencial antidepressivo de uma determinada substância (PORSOLT et al., 1977a; DEKTE et al., 1995; DEKTE et al., 1997). O tratamento com fármacos antidepressivos diminui os períodos de imobilidade e aumenta os comportamentos ativos em diferentes linhagens de ratos e

camundongos (PAGE et al., 1999; SAKAKIBARA et al., 2005; TIAN et al., 2011; ZHAO et al., 2008; VIEIRA et al., 2008; XU et al., 2010; ver Tabela 2).

Tabela 2. Comportamento de diferentes espécies animais no TNF.

Referência	Espécie Animal	Linhagem	Tempo de tratamento	Antidepressivo utilizado	Resposta Comportamental
CHEN e cols., 2010	Ratos	FSL*	25 dias	Imipramina	Reduziu a imobilidade quando comparado ao grupo FSL salina
DETKE e cols., 1997	Ratos	Sprague Dawley	15 dias	Fluoxetina e Desipramina	Reduziu a imobilidade e aumentou os comportamentos ativos
MIYAMOTO e cols., 2010	Ratos	Sprague Dawley	Agudo e 28 dias	Fluoxetina e Desipramina	Reduziu a imobilidade em ambos os tratamentos
PAGE e cols., 1999	Ratos	Sprague Dawley	Agudo	Fluoxetina e Desipramina	Reduziu a imobilidade e aumentou os comportamentos ativos
SAKAKIBARA e cols., 2005	Ratos	CD	14 dias	Imipramina	Reduziu a imobilidade
TIAN e cols., 2011	Ratos	Sprague Dawley	Agudo	Imipramina	Reduziu a imobilidade
VIEIRA e cols., 2008	Ratos	Wistar	Agudo	Clomipramina	Reduziu a imobilidade e aumentou os comportamentos ativos
XU e cols., 2010	Camundongo	ICR	Agudo	Imipramina e fluoxetina	Reduziu a imobilidade

Continuação Tabela 2. Comportamento de diferentes espécies animais no TNF

Referência	Espécie Animal	Linhagem	Tempo de tratamento	Antidepressivo utilizado	Resposta Comportamental
DETKE e LUCKI, 1996	Ratos	Sprague Dawley	Agudo	Fluoxetina e Desipramina	Reduziu a imobilidade e aumentou os comportamentos ativos
WESOŁOWSKA e cols., 2007	Camundongo	Suíço	Agudo	Imipramina, citalopram, moclobenida e desipramina	Reduziu a imobilidade
KULKARNI e DHIR, 2007	Camundongo	Laca	Agudo	Imipramina, fluoxetina, venlafaxina	Reduziu a imobilidade
DULAWA e cols., 2004	Camundongo	C57BL/6, 129SvEv, DBA/2 e Balb/c	24 dias	Fluoxetina	Reduziu a imobilidade no TNF na linhagem Balb/c

* animais que expressam grande quantidade de comportamentos “depressive-like”

Diferente de ratos submetidos ao TNF, que são sensíveis tanto ao tratamento crônico quanto ao agudo, o efeito tratamento crônico sobre o comportamento dos camundongos no TNF parecem ser dependentes da linhagem estudada. DULAWA e cols. (2004) demonstraram (ver Tabela 2) que apenas a linhagem de camundongo BALB/c exhibe sensibilidade ao tratamento crônico com fluoxetina no TNF quando comparada às linhagens C57BL/6, 129SvEv e DBA/2 (DULAWA et al., 2004). De forma interessante, a exploração de um campo aberto pelos camundongos da linhagem BALB/c não se mostrou igualmente sensível ao tratamento crônico com fluoxetina.

Assim, diferentemente do “desamparo aprendido” e do “desespero comportamental”, a exploração de um campo aberto parece não modelar nenhum aspecto conhecido dos distúrbios de humor. Apesar disto os comportamentos exibidos no campo aberto têm se mostrado sensíveis ao tratamento agudo com antidepressivos e seus efeitos parecem depender do fármaco avaliado (BROCCO et al., 2002; WESOLOWSKA et al., 2007; XU et al., 2010, ver Tabela 3).

Tabela 3. Comportamentos de ratos e camundongos no teste de campo aberto.

Referência	Espécie Animal	Linagem	Tratamento	Fármaco utilizado	Resposta Comportamental
BROCCO e cols., 2002	Rato	Wistar	Agudo s.c. dose máxima 80mg/kg	ISRS*1	Não alteraram a AL.
				IRSN *2	Não alteraram a AL.
				ISRN*3	Reboxetina reduziu a AL
				Tricíclico*4	Não alteraram a AL
				SSRI/ Antagonista 5HT _{2c} *5	Trazodona reduziu a AL e o YM1 não modificou a AL
				Antagonista 5HT _{2c} / α2-AR *6	Mirtazapina e miaserina diminuíram a AL
BROCCO e cols., 2002	Camundongo	NMRI	Agudo s.c., dose máxima 40mg/kg	ISRS *7.	Aumentaram a AL.
				IRSN *8	Aumentaram a AL de forma dose dependente

Continuação Tabela 3. Comportamentos de ratos e camundongos no teste de campo aberto

BROCCO e cols., 2002	Camundongo	NMRI	Agudo s.c., dose máxima 40mg/kg	ISRN *9	Os ISRN não alteraram a AL, reboxetina reduziu a AL
				Tricíclico *4	Imipramina, amitriptilina não alteraram a AL. Clomipramina aumentou a AL.
				ISRS/ Antagonista 5HT _{2c} *5	Trazodona, YM1 diminuíram e Nefazodona não alterou AL
				Antagonista 5HT _{2c} / α 2-AR *6	Mirtazapina e miaserina diminuíram a AL
WESOLO WSKA e cols., 2007	Camundongo	Suíço	Agudo i.p	Imipramina e desipramina	Não alteraram a AL
XU e cols, 2010	Camundongo	Laca	Agudo i.p 10mg/kg	Imipramina e fluoxetina	Não alteraram a AL

* fluoxetina, fluvoxamina, paroxetina, citalopram, litoxetina; ** Venlafaxina, S33005; ***reboxetina, desipramina, nortriptilina, maprotilina. *4 - Amitriptilina, clomipramina, imipramina; *5 trazodona, 5HT_{2c}: receptor serotoninérgico 2c; *6 mianserina, mirtazapina, YM1, α 2-AR: receptor alfa-adrenérgico 2 ; *7 fluoxetina, fluvoxamina, paroxetina, zimelidina, citalopram, litoxetina. *8 Venlafaxina, duloxetina, S33005; *9 – reboxetina, desipramina, nortriptilina, maprotilina, nisoxetina. *10 - Amitriptilina, clomipramina, imipramina, *11- Citalopram (1,25 mg/kg), Imipramina (10 mg/kg), desipramina (5 mg/kg) e moclobemida (10 mg/kg). AL = atividade locomotora; IRSN = inibidor de recaptação de serotonina e noradrenalina.

Em resumo, o tratamento agudo com fármacos antidepressivos produz diferentes efeitos comportamentais em ratos e camundongos, variando de acordo com o teste utilizado para avaliar tais comportamentos. Em camundongos o “desespero comportamental”, assim como a exploração de um campo aberto, são paradigmas comportamentais sensíveis ao tratamento agudo com antidepressivos. E, possivelmente, a facilitação da neurotransmissão monoaminérgica pode ser um importante mecanismo subjacente a estes efeitos. Contudo, fenômenos de plasticidade do SNC, como por exemplo, a neurogênese, podem também estar envolvidos. A este respeito, a neurogênese no hipocampo de roedores adultos tem sido apontada como um poderoso mecanismo de ação para os fármacos antidepressivos (SANTARELLI et al., 2003)

1.2 NEUROGÊNESE NO HIPOCAMPO DE ROEDORES ADULTOS E SUA IMPORTÂNCIA PARA O EFEITO COMPORTAMENTAL DOS FÁRMACOS ANTIDEPRESSIVOS

A neurogênese no cérebro adulto ocorre constitutivamente e, os mecanismos regulatórios subjacentes à neurogênese ainda não estão bem definidos (ERIKSSON et al., 1998). A neurogênese é a formação de novos neurônios e pode ser dividida em diversos processos independentes. Estes processos incluem a proliferação de progenitores, a diferenciação destes progenitores em neurônios, a maturação dos neurônios recém nascidos e a integração desses neurônios à circuitaria pré-existente (CHRISTIE e CAMERON, 2006; KEMPERMANN, 1997). Em todas estas etapas pode ocorrer morte celular (PETREANU e ALVAREZ-BUYLLA, 2002). A proliferação e a morte celular são dois processos regulados de forma independente, porém o balanço entre estes dois eventos determinam a taxa de geração dos novos neurônios e da renovação da circuitaria neural (CHRISTIE e CAMERON, 2006). Em mamíferos, as únicas regiões do cérebro adulto onde acontece a neurogênese constitutiva é a zona subgranular (ZSG) do giro denteado (GD) do hipocampo e a zona subventricular (ZSV) do ventrículo lateral (ALVAREZ-BUYLLA e GARCIA-VERDUGO, 2002; KEMPERMANN et al., 1997a).

O hipocampo é uma estrutura cerebral que é relacionada com a emoção, a memória e o aprendizado espacial. Esta estrutura é

dividida em duas porções: o hipocampo ventral (HV) e o hipocampo dorsal (HD), e esta separação é feita de acordo com sua funcionalidade descrita na literatura (FANSELOW e DONG, 2010). No processamento de informações, o HD seria responsável pela memória espacial, enquanto o HV seria responsável pelas respostas ao estresse e emoções (FANSELOW e DONG, 2010). O hipocampo consiste no corno de *Ammon* (CA, de 1 a 4) e no GD (CAMPBELL e MACQUEEN, 2004). O GD encontra-se ao longo de todo o hipocampo e a neurogênese ocorre em todo GD, portanto qualquer parte do hipocampo pode ser utilizada para avaliação da neurogênese (AIMONE et al., 2010).

A proliferação é a divisão celular de progenitores que pode dar origem a células-filhas idênticas às progenitoras (para revisão ver ALVAREZ-BUYLLA et al., 2002). A diferenciação é o comprometimento da célula-filha com o fenótipo ao qual dará origem, glia ou neurônio. Cada uma dessas células diferencia-se e passa a expressar proteínas específicas, e nesta fase os neurônios expressam a doublecortina (DCX). A DCX é uma proteína associada a microtúbulos, que é expressa em precursores neuronais e neurônios imaturos, tanto no cérebro em desenvolvimento e quanto no adulto (BROWN et al., 2003). Depois das células já estarem comprometidas com o fenótipo neuronal, elas migram para a região alvo onde irão amadurecer e integrar-se à circuitaria já existente (PETREANU e ALVAREZ-BUYLLA, 2002). Assim, as células formadas na ZSV migram para camada granular do bulbo olfatório, enquanto as células formadas na ZSG do GD migram para camada granular do GD do hipocampo. A maturação é o amadurecimento dessas células. Nesta fase, o neurônio recém formado desenvolve a árvore dendrítica e inicia as conexões sinápticas com os neurônios já existentes (ver Figura 1.). Geralmente esta fase se dá dos 20 aos 30 dias após o nascimento desses neurônios (BOHLEN UND HALBACH, 2007). Para que os neurônios possam integrar-se à circuitaria existente, é preciso que este sobreviva a todas as etapas. A este respeito, PETREANU e ALVAREZ-BUYLLA (2002) verificaram que há um declínio na contagem desses neurônios entre 15 e 45 dias após o nascimento e que após 1 ano apenas um terço ainda são encontrados na camada granular.

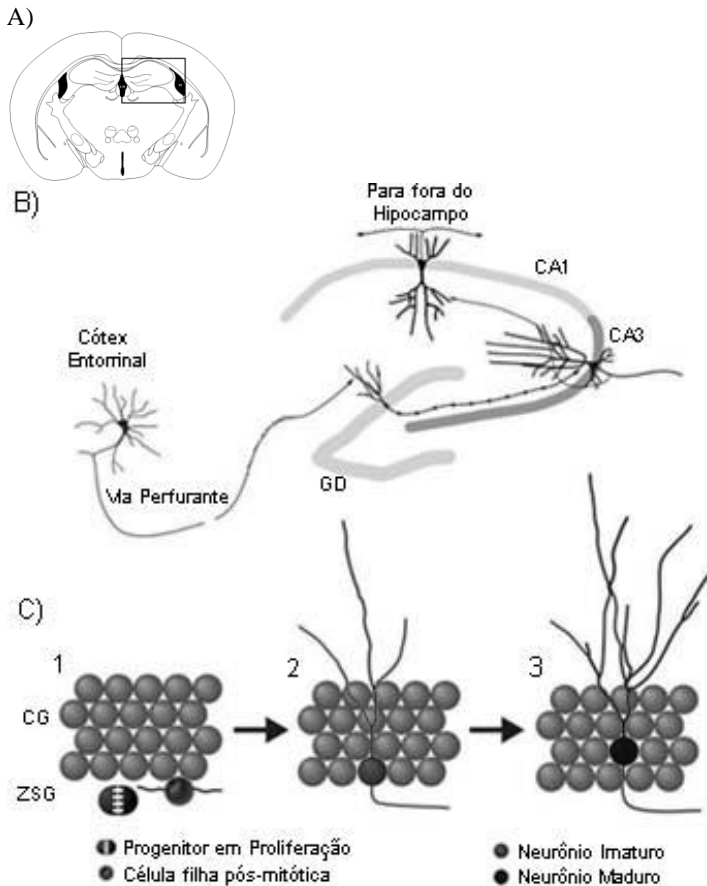


Figura 1: Esquema das células nas diferentes fases da neurogênese. A) Imagem representa uma secção coronal do cérebro de camundongo. Área do retângulo destaca o hipocampo que está representado em maior aumento em B. B) Hipocampo e projeções neuronais e um neurônio da camada granular do GD. GD = Giro denteado, CA1 e CA3 = áreas de neurônios piramidais do hipocampo 1 e 3, respectivamente. C) Aumento do GD com as duas camadas envolvidas na neurogênese, e as etapas do desenvolvimento neuronal, CG = camada granular, ZSG = Zona subgranular, C1 – progenitor em proliferação e uma célula filha pós-mitótica; C2 – Neurônio imaturo na camada subgranular e C3 – neurônio maduro migrando para camada granular. A) Adaptado de PAXINOS e FRANKLIN, 2001. B e C) Adaptado de CHRISTIE e CAMERON, 2006.

Para estudar cada uma das fases da divisão e diferenciação celular foram desenvolvidos vários marcadores celulares para identificação dessas etapas (para revisão ver BOHLEN UND HALBACH, 2007, ver Tabela 4 e Figura 2). Portanto o desenvolvimento dessas técnicas para detecção destes marcadores ou proteínas é possível acompanhar as diferentes etapas da neurogênese.

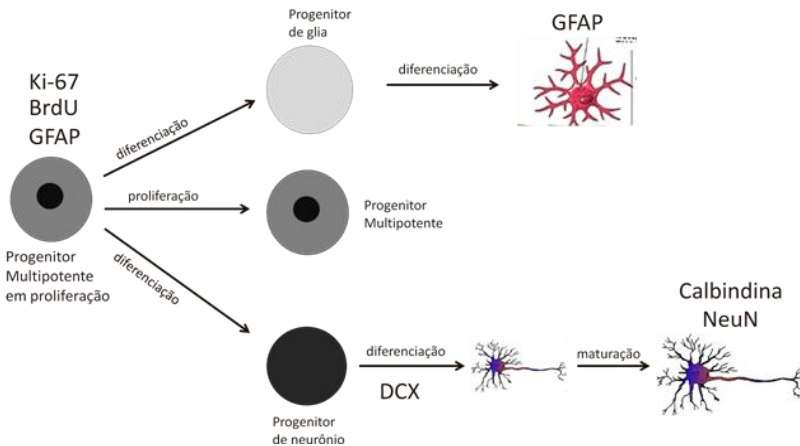


Figura 2. Etapas da proliferação, diferenciação e maturação celular e a expressão dos marcadores celulares.

Tabela 4. Marcadores Celulares

Marcador celular	Marca	Avalia
BrdU	É incorporada na célula durante a fase S (síntese de DNA) da divisão celular. Permanece na célula até que esta morra	Proliferação celular – 24 h após a injeção; Sobrevivência celular – 2 a 3 semanas após a injeção
Pax6	Proteína expressa em progenitores neurais	Proliferação celular
GFAP	Proteína expressa em astrócitos e progenitores neurais	Proliferação celular e astrócitos maduros

Continuação Tabela 4. Marcadores Celulares

DCX	Proteína expressa progenitores neurais por 2 a 3 semanas após o comprometimento com o fenótipo neuronal	Neurônios novos
NeuN	Proteína expressa neurônios maduros	Neurônios maduros
Calbindina	Proteína expressa neurônios maduros	Células granulares adultas (células funcionais)

As diversas etapas da neurogênese no GD do hipocampo de ratos e camundongos adultos são afetadas por eventos externos ao organismo tais como o enriquecimento ou empobrecimento ambiental (KEMPERMANN et al., 1998; MESHİ et al., 2006, LLORENS-MARTÍN et al., 2007) ou tratamento com fármacos (SANTARELLI et al., 2003; NAVAILLES et al., 2008, DAVID et al., 2007, ver Tabela 5). Estes dados (Tabela 5) mostram que o desenvolvimento de neurônios novos no hipocampo é favorecido pelo tratamento crônico com antidepressivos, ou seja, é induzido pelo uso do fármaco (SANTARELLI et al., 2003; SURGET et al., 2008; BRUEL-JUNGERMAN et al., 2005). E isto sugere que a neurogênese hipocampal pode estar relacionada com as respostas comportamentais induzidas por estes tratamentos.

Para entender se existe a necessidade da neurogênese no GD para que os efeitos do tratamento com antidepressivos surjam foram aplicadas técnicas para bloqueio da proliferação celular no hipocampo. A aplicação dos raios X bloqueia a proliferação dos progenitores do hipocampo sem alterar a neurogênese na ZSV, pois é realizada com uma proteção de chumbo nas demais regiões, deixando exposta apenas a região do hipocampo (SANTARELLI et al., 2003; SURGET et al., 2008). O tratamento crônico com fármacos antidepressivos no teste de “ingestão de alimento suprimida pela novidade” (do inglês novelty-suppressed feeding, NSF) reduziu a latência para alimentar-se e, estes efeitos comportamentais desaparecem após a aplicação dos raios X no

hipocampo, indicando que a neurogênese contribui para os efeitos dos antidepressivos em camundongos BALBc (SURGET et al., 2008) e 129/Sv (SANTARELLI et al., 2003).

Tabela 5. Efeitos do tratamento com fármacos antidepressivos sobre a neurogênese.

Referência	Espécie Animal	Tratamento	Marcador celular	Efeitos no GD
SANTARELLI e cols., 2003	Camundongo 129/Sv	Crônico – 28 dias (fluoxetina 10 mg/kg e imipramina 20 mg/kg)	BrdU	Aumentou a proliferação celular e a sobrevivência dos novos neurônios
NAVAILLES e cols., 2008	Camundongo adulto (Balb/cJ e C57Bl/6J)	Crônico – 24 dias (fluoxetina 10 mg/kg)	BrdU e DCX	Aumentou a proliferação celular em ambas linhagens. Nos animais C57Bl/6J, após 2 sem, as células com dupla marcação (DCX + BrdU) estava aumentada.
DAVID e cols., 2007	Camundongo 129/SvEvTac	Crônico – 28 dias (imipramina 20 mg/kg)	BrdU	Aumentou a proliferação em 25%.
SCHIAVON e cols., 2010	Ratos Wistar	Crônico – 14 dias (imipramina 20 mg/kg)	BrdU e DCX	Aumentou a proliferação celular, mas não alterou o número de novos neurônios (DCX+)

A exposição a um ambiente enriquecido (AE), por outro lado, estimula (induz) a neurogênese hipocampal em camundongos adultos (KEMPERMANN et al., 1998; MESHI et al., 2006, LLORENS-MARTÍN et al., 2007) e produz efeitos comportamentais no NSF semelhantes ao dos fármacos antidepressivos (MESHI et al., 2006). Contudo, a inibição da neurogênese hipocampal pela exposição aos raios X não afeta o efeito comportamental desta manipulação sobre a latência para se alimentar no NSF em camundongos 129Sv/Ev (MESHI et al., 2006). Desta maneira, parece que a neurogênese hipocampal é importante para o efeito do tratamento crônico com antidepressivos sobre o comportamento dos camundongos adultos expostos a estímulos aversivos (SANTARELLI et al., 2003; SURGET et al., 2008).

No entanto, não está bem determinado se o tratamento agudo com fármacos antidepressivos afeta a neurogênese que ocorre no GD do hipocampo de camundongos adultos. Ou ainda se, este processo, é importante para os efeitos comportamentais agudos destes fármacos em camundongos. Foi relatado que o tratamento agudo (1 dia) ou subagudo (5 a 7 dias – também denominado subcrônico) com antidepressivos (imipramina e fluoxetina) não altera a proliferação celular no GD do hipocampo, marcada com BrdU em ratos Sprague-Dawley e Wistar (MALBER et al., 2000; YANPALLEWAR et al., 2010), nem na quantidade de células DCX+ ou neuroD+ no GD de ratos Wistar (YANPALLEWAR et al., 2010). Contudo, existem dados de experimentos *in vitro* indicando que o tratamento, de curto prazo com antidepressivos pode inibir a proliferação de células neuronais (MANEV et al., 2001), de células tumorais (GAVRILOVA-RUCH et al., 2002). Dados não publicados de nosso laboratório indicam que a exposição à imipramina, por 24 h *in vitro*, inibe a proliferação de progenitores neuronais originados do hipocampo de ratos adultos.

Assim, no presente trabalho estamos interessados em investigar se o tratamento agudo com fármacos antidepressivos pode afetar a neurogênese do hipocampo de camundongos adultos *in vivo* e se esta neurogênese é importante para o efeito do tratamento agudo com estes fármacos sobre o comportamento. Além disso, queremos investigar se o enriquecimento ambiental, outro estímulo indutor de neurogênese hipocampal, facilitaria os efeitos do tratamento agudo com estes fármacos sobre o comportamento e sobre a própria neurogênese.

1.3 HIPÓTESES

- 1) O tratamento agudo com imipramina altera a proliferação celular e a diferenciação em neurônios no GD.
- 2) O tempo entre o tratamento e o sacrifício do animal é essencial para se observar alterações do tratamento agudo sobre a neurogênese no GD.
- 3) O enriquecimento ambiental aumenta a neurogênese no GD.
- 4) O tratamento agudo com imipramina altera a atividade locomotora em camundongos no TCA.
- 5) O enriquecimento ambiental altera a atividade locomotora em camundongos no TCA.

1.4 OBJETIVO

Avaliar os efeitos agudos de fármacos antidepressivos sobre a neurogênese constitutiva e induzida no hipocampo do cérebro de roedores adultos.

1.4.1 Objetivos Específicos

- 1) Avaliar os efeitos das diferentes doses de imipramina sobre:
 - O número de células em proliferação e dos neurônios novos no giro dentado do hipocampo.
- 2) Avaliar os efeitos do tipo de ambiente sobre:
 - O número de células em proliferação e dos neurônios novos no giro dentado do hipocampo.
- 3) Avaliar a influência do intervalo entre o tratamento e o sacrifício sobre:
 - O número de células em proliferação e dos neurônios novos no giro dentado do hipocampo.
- 4) Correlacionar os comportamentos do TCA com o número de células em proliferação celular e o número de neurônios novos.

1.5 ESTRATÉGIA DE AÇÃO

O antidepressivo selecionado para o estudo foi a imipramina por ter efeitos agudos e crônicos bem documentados sobre o comportamento de camundongos (DAVID et al., 2007; XU et al., 2010; VAUGEUIS et al., 1996; VOGEL et al., 1985; SONG et al., 2006; CARLSSON, 1970; ROSS e RENYI, 1975) e apresentar propriedade inibitória da proliferação de progenitores neuronais *in vitro* (dados não publicados).

Os camundongos que foram utilizados para a avaliação da neurogênese constitutiva (fisiológica) foram alojados em um ambiente padrão. Já os animais que foram utilizados para a avaliação da neurogênese induzida foram alojados em um ambiente enriquecido. Os animais receberam injeção via intracerebroventricular (icv) de imipramina ou salina.

Imediatamente após a injeção foi realizado o teste comportamental de campo aberto (para os animais sacrificados 24 h após a injeção) para verificar o efeito da injeção aguda de imipramina sobre o comportamento defensivo. Os animais foram sacrificados 2 h ou 24 h após a injeção de imipramina ou salina.

Para todos os tratamentos foram realizadas imunistoquímicas para a detecção de neurônios novos e das células em proliferação no giro dentado (GD) do hipocampo. Os neurônios novos foram identificados pela detecção da proteína doublecortina (DCX) enquanto que as células em proliferação foram identificadas pela detecção da proteína Ki-67. A neurogênese foi estimada pela contagem do número de pericários imunorreativos à DCX (DCX+) e a estimativa de proliferação foi dada pelo número de núcleos imunorreativos ao Ki-67 (Ki-67+).

Os resultados do teste comportamental foram correlacionados com a contagem de células DCX+ ou Ki-67+ do GD do hipocampo.

1.6 DESENHO EXPERIMENTAL

Os camundongos chegaram adultos (~60 dias) e permaneceram, no mínimo de 4 dias em ambientação no biotério setorial. Em seguida foram alojados em ambiente padrão ou em ambiente enriquecido por 30 dias. Aos 30 dias de alojamento, os animais foram submetidos à cirurgia para implantação da cânula guia. Sete dias após a cirurgia cada

camundongo recebeu uma injeção icv (imipramina ou salina) e foi sacrificado por perfusão cardíaca (ver Figura 3).

Experimento 1 – Os animais foram sacrificados 24 h após a injeção. Doses de imipramina utilizadas: 0,06 nmol/ μ l ou 0,2 nmol/ μ l*

Experimento 2 – Os animais foram sacrificados 2 h após a injeção. Dose de imipramina utilizada: 0,2 nmol/ μ l*. O tempo de 2 h foi escolhido para avaliar se a imipramina já apresenta efeito sobre a proliferação logo após o estímulo.

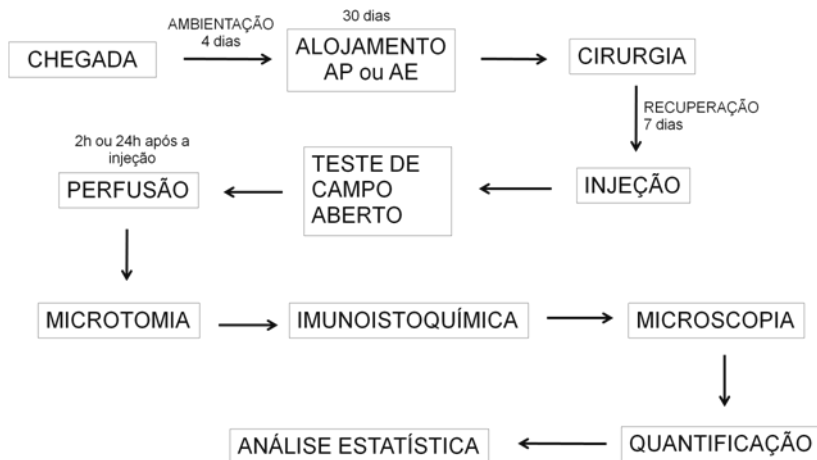


Figura 3. Desenho experimental

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 OBTENÇÃO DOS ANIMAIS E CONDIÇÕES DE ALOJAMENTO

Os animais foram obtidos do Biotério Central da Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC) e alojados no biotério setorial. Sendo camundongos Suíços, machos em idade reprodutiva (~60 dias). Foram colocados 10 camundongos em ambiente padrão ou em ambiente enriquecido. Os animais que sofreram cirurgia estereotáxica foram acomodados em grupos de 5 camundongos por caixa padrão e os animais do ambiente enriquecido continuaram em grupos de 10 animais por caixa (experimentos 1 e 2).

A temperatura do biotério setorial foi mantida em 23 ± 2 °C e a umidade em 55%. O fotoperíodo foi ajustado de modo que os animais permanecessem 12 h no claro (06h00min - 18h00min) e 12 h no escuro. Todos os animais receberam água e ração comercial (Nuvital[®]) à vontade. Os protocolos foram aprovados pelo comitê de ética da UFSC sob o Ofício nº 117/CEUA/PRPe/2008.

O ambiente padrão consiste de uma caixa polipropileno branco com as dimensões: 41 x 34 x 16 (comprimento x largura x altura, ver Figura 4A), forrada com maravalha. O ambiente enriquecido consiste em uma gaiola com três andares (dimensões 30 x 23 x 60; comprimento x largura x altura), com brinquedos variados (trocados uma vez por semana), tubos de PVC, duas rodas de atividade, escadas, uma casinha plástica, tubo de papelão e folha de papel para fazerem ninho e um subsolo com maravalha (ver Figura 4B).

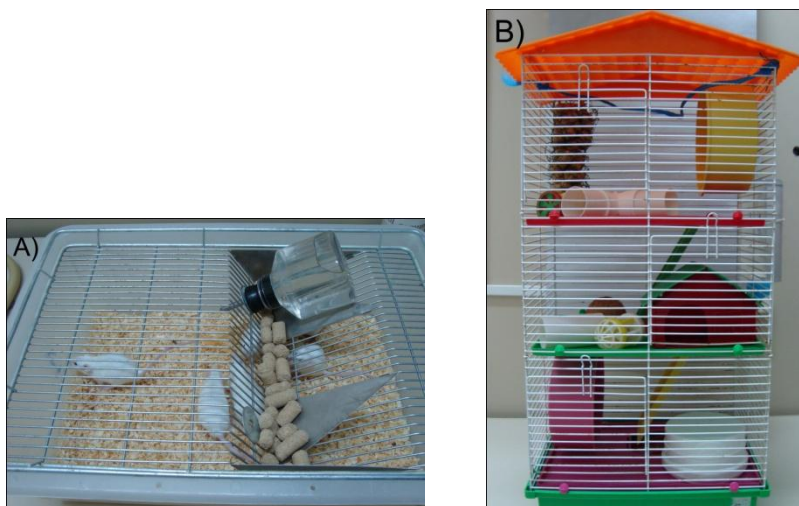


Figura 4. Tipos de alojamento. A) caixa utilizada para o ambiente padrão e B) gaiola utilizada para o ambiente enriquecido.

2.2 CIRURGIA ESTEREOTÁXICA

Os animais foram anestesiados com a mistura (v/v, 1ml/kg, ip.) de quetamina (100 mg/kg, König[®]) e xilazina (75 mg/kg, König[®]), e posicionados no estereotáxico (marca Insight[®], modelo com 2 torres). Foram utilizados 0,1ml de anestésico local (mepivacaína 3%) antes de iniciar a cirurgia; a pele da região sobre o crânio foi cortada e o crânio do animal exposto. Foram feitos três furos para colocação de dois parafusos e inserção de uma cânula guia. O espaço ao redor da cânula foi fechado com gelatina sólida. A região do escalpo exposta para colocação da cânula e dos parafusos foi preenchida com resina de dentista (Vipi flash[®] – líquido e Jet[®] - pó) para fixação do conjunto. Os parafusos dão sustentação a esta prótese. A cânula guia (8,0 mm de comprimento), confeccionada a partir de uma agulha hipodérmica (20x 5,5 24G, Nipro[®] ou BD[®]), foi inserida em direção ao ventrículo lateral e a extremidade interna foi posicionada logo acima (0,3mm) do ventrículo de acordo com as coordenadas (PAXINOS e FRANKLIN, 2001) em relação ao bregma: ântero-posterior -0,2 mm, médio-lateral \pm 1,0mm e dorso-ventral - 2,0mm. Após a fixação da cânula foi inserido um

mandril em seu interior para evitar obstrução. O mandril foi fixado por mais uma camada de resina.

2.3 VIA DE ADMINISTRAÇÃO

A Injeção icv de salina (controle) ou de imipramina foi feita com auxílio de uma agulha gengival (8,5 mm de comprimento, Microdont[®]) acoplada a uma bomba de injeção (Insight[®]). A injeção foi feita durante 1 min (fluxo de 1 μ L/min.), e o animal permaneceu com a agulha na cânula por mais 1 min após a administração para facilitar a difusão do líquido e para evitar refluxo. As doses de imipramina injetadas foram 0,2 nmol/ μ l (experimentos 1 e 2) ou 0,06 nmol/ μ l (experimento 1). As doses foram selecionadas a partir de dados não publicados de nosso laboratório, que indicam que a concentração de imipramina suficiente para inibir 50% da proliferação de progenitores neurais obtidos do hipocampo de ratos adultos in vitro (IC₅₀) é de 0,2 μ M.

2.4 TESTE PARA OBSERVAÇÃO DE COMPORTAMENTOS DE DEFESA

No experimento 1 os animais foram submetidos ao campo aberto (TCA) imediatamente após a injeção icv. O TCA consiste em uma arena retangular de 50 x 30 x 35 cm (comprimento x largura x altura) de cor preta, na qual os animais são mantidos pelo tempo de 5 min. Após a saída de cada animal, a arena foi higienizada com álcool 70% para evitar odores do animal anterior. O TCA foi escolhido para avaliar se a injeção icv de antidepressivo altera a atividade locomotora desses animais.

2.5 ANÁLISE DO COMPORTAMENTO NO TCA

Os comportamentos foram analisados utilizando o software Ethowatcher (EthoWatcher[®], CRISPIM et al., 2010; manuscrito submetido à publicação; software disponível em ethowatcher.ufsc.br). No TCA foram registradas a frequência e a duração das seguintes categorias comportamentais: movimentação horizontal (locomoção), exploração vertical, autolimpeza, a limpeza de cabeça, imobilidade, coçar a cabeça e análise de risco. A categoria movimentação horizontal foi registrada toda vez que os animais deslocavam-se horizontalmente pela arena. Para a exploração vertical foram feitos registros toda vez em

que o animal permanecia de pé sobre as patas traseiras. A autolimpeza foi registrada sempre que o animal realizava movimentos de lambida e mordida pelo corpo e a limpeza de cabeça era registrada cada vez que o animal levava as patas dianteiras à boca depois à cabeça. A categoria imobilidade foi registrada toda vez em que o animal permanecia totalmente imóvel. O coçar a cabeça foi registrado sempre em que o animal coçava a cabeça, com qualquer uma das quatro patas. A análise de risco foi registrada toda vez em que o animal realizava qualquer movimento no próprio eixo, sem deslocamento real sobre o substrato.

2.6 EUTANÁSIA

Vinte e quatro ou duas h após a injeção, os animais foram anestesiados com uretana 35% e sacrificados por perfusão cardíaca com sacarose (9,25%), seguido de paraformaldeído 4% (PFA 4%, para protocolos ver Anexo 1). Após a perfusão foi injetado, nos animais que tinham cânula, o corante azul de Evans (1%) para confirmar a posição da injeção. Em seguida o cérebro foi retirado do crânio.

2.7 MICROTOMIA

Após a retirada, o cérebro dos animais era mantido por vinte e quatro h no PFA 4%. Após esse período os cérebros foram mantidos em sacarose 20% (protocolos ver Anexo 1) durante, no máximo, uma semana. Para microtomia os cérebros foram cortados em dois blocos. O primeiro bloco continha: 1-a região do estriado (controle positivo na imunistoquímica para DCX e Ki-67), 2- o hipocampo (região neurogênica de interesse), 3-a região da cânula (naqueles grupos que receberam injeção ICV para confirmação histológica do posicionamento da cânula). O segundo bloco continha o tronco cerebral. Os blocos foram congelados em gelo seco e seccionados a 50 µm em um criótomo de congelamento (marca Jung Ag Heidelberg®; experimento 1) ou incluídos em gelatina a 10% para serem cortados (50µm) no vibratomo (marca vibratome®, modelo 1500; experimento 2). As secções foram armazenadas em tubos (tipo Eppendorf contendo solução anticongelante, para protocolo ver Anexo 1) organizados em sequência contendo a secções separadas entre si por 250 µm. O primeiro tubo foi utilizado para imunistoquímica para DCX, e o seg tubo para

imunoistoquímica para Ki-67. Os demais tubos foram guardados para imunoistoquímicas futuras.

2.8 IMUNOISTOQUÍMICA PARA OS MARCADORES DE NEURÔNIOS NOVOS E CÉLULAS EM PROLIFERAÇÃO

A imunoistoquímica para detecção da proteína Ki-67 iniciou com recuperação antigênica em tampão citrato (ver anexo 1 para protocolo) por 30 min a 89°C, os demais passos foram os mesmos utilizados para a detecção da proteína DCX.

Para imunoistoquímica de DCX foi utilizado o seguinte procedimento operacional padrão (POP): (ver Anexo 1 para protocolos). As incubações foram realizadas sob temperatura ambiente e as exceções a esta regra são indicadas no protocolo.

1º dia:

- 3 lavagens de 5 min com tampão A
- Incubação no bloqueio da peroxidase endógena por 30 min
- 3 lavagens de 5 min com tampão A
- Incubação no bloqueio inespecífico (Soro Albumina Bovina - BSA1%) por 60 min
- Incubação no anticorpo primário (para diluições e procedência ver Anexo 2) diluído em BSA1% durante a noite (mínimo 18 h), a 4°C.

Anticorpos primários utilizados: anti-DCX: diluição 1:5000; anticorpo desenvolvido em coelho (IgG, policlonal) fabricado por Abcam®, cód. ab18723. E anti-Ki-67: diluição 1:500; anticorpo desenvolvido em coelho (IgG, policlonal), fabricado por Acris®, cód. DRM 004.

2º dia:

- 3 lavagens de 5 min com tampão A
- Incubação no anticorpo secundário por 90 min, diluído em tampão A (Vectastain® Elite ABC kit anti-coelho IgG, fabricado por Vector labs, diluição 1:1000)
- 3 lavagens de 5 min com tampão A
- Incubação no complexo avidina + peroxidase biotilada (ABC) por 120 min, diluído em tampão A (Vectastain® Elite ABC kit anti-coelho IgG, fabricado por Vector labs, diluição avidina 1:500 e biotina 1:500)

- 3 lavagens de 5 min com tampão A
- 1 lavagem de 5 mins com TBS 0,25M
- Incubação em 3´3-Diaminobenzidina (DAB) por 10 min
- Incubação em DAB + peróxido de hidrogênio 30% por 10 min
- 3 lavagens de 5 min com TBS 0,25M
- 1 lavagem de 5 min com água destilada

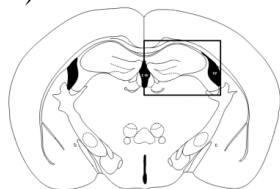
Colocar as secções nas lâminas e deixar secar por 5 dias em temperatura ambiente. Então realizar o processo de diafanização (ver Anexo 3 para protocolo).

As lâminas que continham as secções marcadas para Ki-67 foram coradas com Giemsa por 3 s antes da diafanização (ver Anexo 3 para protocolo)

2.9 MICROSCOPIA

A imunorreatividade presente nas secções foi analisada com o auxílio do microscópio óptico de campo claro (Olympus BH2). Os campos foram fotografados com auxílio de uma câmera digital Pixelink®, operada pelo programa de computador da própria câmera. Cada giro denteado (direito e esquerdo) foi fotografado de forma seqüencial, da extremidade medial à lateral (Figura 5), com a magnificação de 400 vezes.

A)



B)

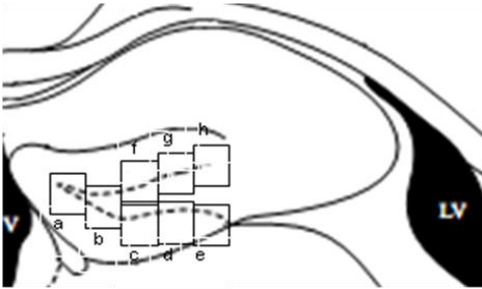


Figura 5. Imagem representando uma secção coronal do cérebro de camundongo em pequeno aumento (A), a imagem do retângulo está representado ampliado abaixo. A imagem ampliada representa o hipocampo mostrando o esquema da sequência das fotos ao longo do giro denteado (B). Os retângulos identificados na sequência a-h indica a ordem em que as fotos foram realizadas. Adaptado de PAXINOS e FRANKLIN, 2001.

2.10 CONTAGEM DE CÉLULAS

A quantificação das células imunorreativas a proteína DCX foi realizada com auxílio do software ImageJ® (www.rsweb.nih.gov/ij/). A quantificação do número de células expressando DCX ou Ki-67 foi feita por GD, ou seja, o número de células DCX+ ou Ki-67+ foi contado ao longo do eixo rostro-caudal dos GDs, direitos e esquerdos, e o total da contagem foi dividido pelo número de GD analisados. A contagem das células não foi distinta entre hipocampo direito e esquerdo. Para reduzir os erros de contagem, por variação das amostras de hipocampo ao longo do eixo rostro-caudal, as secções contendo os hipocampus foram selecionadas entre os limites -1,34 mm e -2,18 mm do bregma, correspondente as figuras 42 a 49 do atlas de PAXINOS e FRANKLIN (2001). O HD foi utilizado para a contagem das células por conter mais dados na literatura e pela facilidade na microtomia.

As características avaliadas para reconhecer uma célula DCX+ foram coloração acinzentada (com intensidade da cor variando de claro a escuro) no corpo celular com ou sem projeções dendríticas e com núcleo claro (ver Figura 6A). A marcação do Ki-67 é nuclear (pontos arredondados e escuros) e de fácil visualização (ver Figura 6B), então a contagem foi realizada diretamente pela observação na tela do computador.

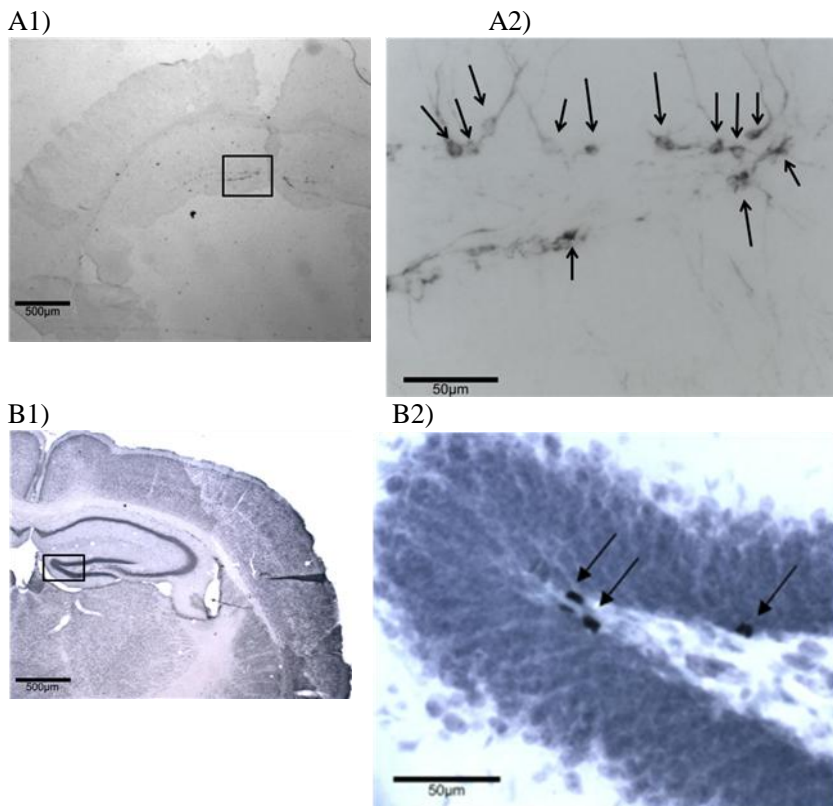


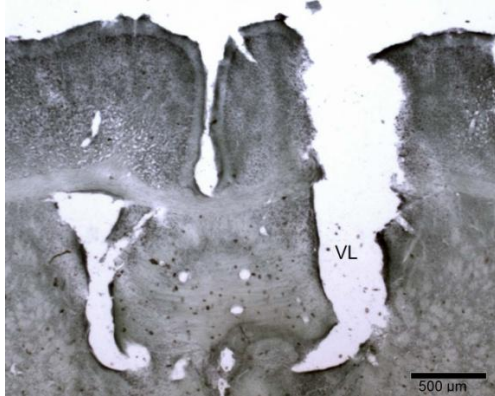
Figura 6. Secção coronal do cérebro de camundongo Suíço adulto (A1 e B1), os retângulos estão representados ampliados em A2 e B2, respectivamente. Setas indicam a marcação imunoistoquímica típica de A2) células DCX+; B2) células Ki-67+.

2.11 CRITÉRIOS PARA INCLUSÃO NA ANÁLISE

Os critérios para inclusão de um dado na análise estatística foram a localização da injeção no ventrículo lateral (Figura 7A) e a boa qualidade da imunoistoquímica para DCX. Várias imunoistoquímicas para DCX foram realizadas durante o experimento, e o controle positivo utilizado, para verificar a qualidade da imunoistoquímica, foi a região subventricular do ventrículo lateral. Quando esta região estava bem

marcada (Figura 7B), os dados eram incluídos na análise (ver Anexo 3 para dados excluídos).

A)



B)

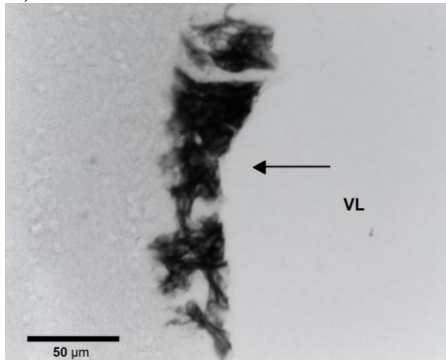


Figura 7. A) Seção representativa de um local de injeção intracerebroventricular. B) Seção submetida à imunistoquímica para DCX. A seta indica marcação da ZSV do ventrículo lateral das imunistoquímicas de DCX+ incluídas na análise. VL = ventrículo lateral.

2.12 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os números de células contadas foram anotados em tabela do programa Excel®. Os dados foram transferidos para o Statistica 8.0. Para avaliar efeito do fator Tratamento (Experimento 1, salina *versus* 2 doses de imipramina em cada condição de alojamento) foi utilizado o

teste ANOVA não paramétrico Kruskal-Wallis seguido do teste pos hoc de Mann-Whitney. Para o experimento 2, a diferença entre o grupo salina e imipramina foi avaliada pelo teste de Mann-Whitney em cada condição de alojamento. A correlação dos comportamentos com o número de células DCX+ e Ki67+ foi feita utilizando o teste não paramétrico de Spearman. Em todos os testes o nível de significância adotado foi de $p < 0,05$.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 EFEITO DO TRATAMENTO AGUDO COM IMI ICV SOBRE O COMPORTAMENTO DOS CAMUNDONGOS SUÍÇOS ADULTOS NO CAMPO ABERTO: INFLUÊNCIA DA DOSE E DA CONDIÇÃO DE ALOJAMENTO

Os tempos dos comportamentos avaliados estão apresentados na Tabela 6. Em relação ao tempo gasto em cada comportamento não houve diferença significativa entre os diferentes tratamentos ou entre os pré-tratamentos.

Tabela 6. Tempo gasto (em seg) em cada um dos comportamentos registrados durante 5 min do teste de campo aberto.

Pré-trat.	Trat.	N	L	EV	LC	AL	I	AR	CC
AP	Salina	7	121 ±21	39 ±10	23 ±9	2 ±1	96 ±18	13 ±4	7 ±2
AP	Imi 0,06	4	127 ±38	41 ±5	11 ±11	8 ±5	102 ±21	13 ±8	1 ±1
AP	Imi 0,2	5	104 ±7	58 ±10	21 ±6	4 ±2	77 ±16	14 ±1	22 ±15
AE	Salina	7	86 ±12	57 ±19	16 ±6	10 ±5	120 ±26	7 ±2	6 ±2
AE	Imi 0,06	4	104 ±8	71 ±12	17 ±6	0,00 ±0	82 ±16	23 ±6	3 ±3
AE	Imi 0,2	6	122 ±18	50 ±19	18 ±7	2 ±1	94 ±31	6 ±4	7 ±4

O teste de campo aberto foi feito imediatamente após a injeção icv. Trat.= tratamento, N= número de animais, AE = ambiente enriquecido, AP = ambiente padrão, Imi = imipramina, L= locomoção, EV= exploração vertical, LC= limpeza de cabeça, AL= autolimpeza, I= imobilidade, AR= análise de risco, CC= coçar a cabeça. Os valores representam a média ± erro padrão da média.

No TCA não foram encontradas diferenças importantes entre os tratamentos para os vários comportamentos avaliados, ou seja, o tratamento central agudo com imipramina não alterou o comportamento no TCA em camundongos Suíços em nenhuma das condições de alojamento, concordando com os estudos de WESOŁOWSKA e cols. (2007). Estes autores não encontraram modificações na atividade

locomotora nesta mesma linhagem de camundongo após o tratamento agudo e sistêmico com imipramina (WESOLOWSKA et al., 2007). Do mesmo modo, o tratamento agudo com imipramina em camundongos ICR (XU et al., 2010) e NMRI (BROCCO et al., 2002) não alterou a atividade locomotora destes animais, embora outros fármacos antidepressivos sejam efetivos em aumentar ou reduzir a atividade locomotora de camundongos NMRI (BROCCO et al., 2002). Assim, os efeitos agudos dos fármacos antidepressivos sobre a locomoção de camundongos parecem depender da linhagem e do tipo de fármaco estudados e não da via de administração utilizada.

3.2 EFEITOS DAS DIFERENTES DOSES DE IMIPRAMINA SOBRE O NÚMERO DE CÉLULAS EM PROLIFERAÇÃO KI-67+ E DOS NEURÔNIOS NOVOS (DCX+) NO GD DO HIPOCAMPO

A Tabela 7 apresenta os valores da média e do erro padrão da média do número de células Ki67+ observadas no GD de cada um dos grupos experimentais. Os animais destes grupos foram sacrificados 24 h depois da injeção icv. No experimento 1 observamos que no grupo AP os animais tratados com imi 0,06 nmol/μl apresentavam o número de células Ki-67+ significativamente menor quando comparado ao grupo salina e Imi 0,2 nmol/μl do mesmo tipo de alojamento (ver Anexo 4 para Dados estatísticos e Figura 8). Por outro lado no grupo AE não houve diferença estatística entre os tratamentos (ver Anexo 4 para Dados estatísticos e Figura 8), apenas uma redução, marginalmente significativa do número de células Ki-67+ no grupo que recebeu Imi 0,2 nmol/μl, quando comparado com o grupo controle do AE. Nos dois tipos de alojamento foram observadas diferenças estatísticas entre as duas doses de imipramina (ver Anexo 4 para Dados estatísticos).

Tabela 7. Número de animais, média e erro padrão da média para células Ki67+, dos animais sacrificados 24 h após a injeção.

Pré-tratamento	Tratamento	N	Média	± EPM
AP	Salina	4	11,59	2,66
AP	Imi 0,06	4	3,81	1,18
AP	Imi 0,2	5	16,67	2,45
AE	Salina	4	7,22	0,79
AE	Imi 0,06	4	14,18	3,72

AE	Imi 0,2	3	3,84	1,17
----	---------	---	------	------

N= número de animais, EPM= erro padrão da média, AE = ambiente enriquecido, AP = ambiente padrão, Imi = imipramina.

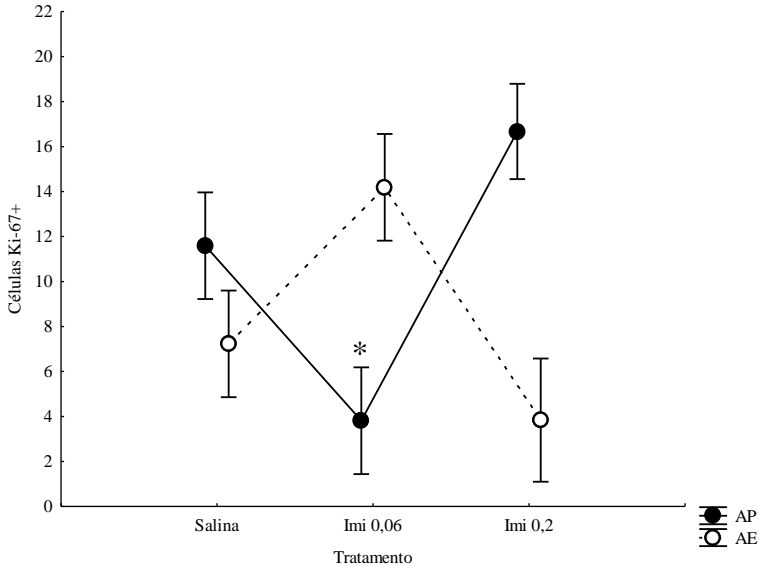


Figura 8. Efeito das injeções icv de imipramina sobre o número de células proliferativas no GD de camundongos Suíço adultos alojados em ambiente padrão (AP) ou enriquecido (AE). Os círculos (grupo AP) e os quadrados (grupo AE) representam o número de células Ki67+ nos animais tratados com salina ou imipramina (Imi 0,06 nmol/μl; Imi 0,2 nmol/μl). Todos os dados são expressos em média ± EPM. Valores (*) p<0,05 quando comparados com os animais do grupo salina na mesma condição de alojamento.

A Tabela 8 apresenta os valores da média e do erro padrão da média do número de células DCX+ observadas no GD de cada um dos grupos experimentais. O grupo AP tratado com imipramina 0,2 nmol/μl apresentou significativamente maior número de neurônios novos (DCX+) quando comparado ao grupo salina do mesmo alojamento (ver Anexo 4 para dados estatísticos e Figura 9). O grupo AE não apresentou diferenças significativas entre os tratamentos (ver Anexo 4 para Dados estatísticos e Figura 9).

Tabela 8. Número de animais, média e erro padrão da média para células DCX+, do grupo sacrificado 24 h após a injeção.

Pré-tratamento	Tratamento	N	Média	EPM
AP	Salina	4	19,66	3,77
AP	Imi 0,06	4	20,45	2,70
AP	Imi 0,2	5	56,93	6,56
AE	Salina	4	24,55	5,45
AE	Imi 0,06	4	25,32	6,21
AE	Imi 0,2	3	23,38	7,12

N= número de animais, EPM= erro padrão da média, AE = ambiente enriquecido, AP = ambiente padrão, Imi = imipramina.

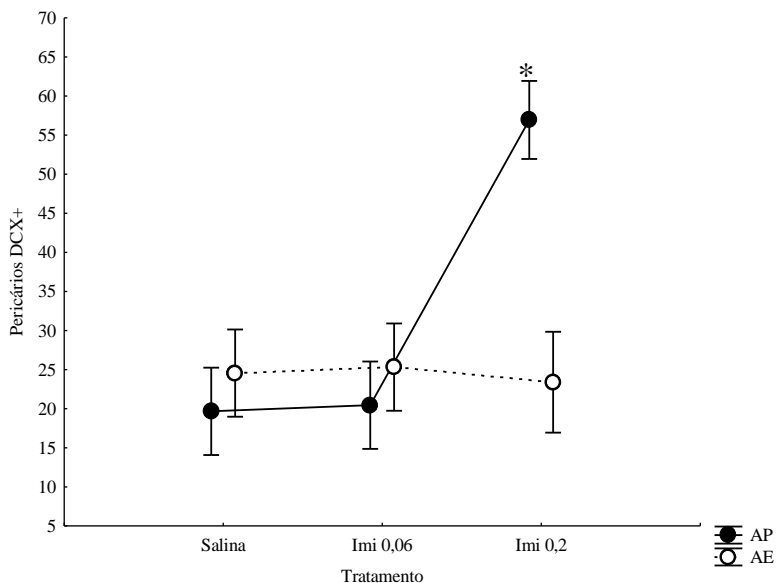


Figura 9. Efeito das injeções ICV imipramina sobre o número de neurônios novos no GD de camundongos Suíços adultos alojados em ambiente padrão (AP) ou enriquecido (AE). Os círculos representam o número de células DCX+ no grupo AP tratado com salina ou imipramina (Imi 0,06 nmol/μl; Imi 0,2 nmol/μl). Os quadrados representam o número de células DCX+ no grupo AE tratado com salina ou imipramina (Imi 0,06 nmol/μl; Imi 0,2 nmol/μl). Todos os dados são expressos em média ± EPM. Valores (*) p<0,05 quando comparados com os animais salina na mesma condição de alojamento.

Os resultados significativos foram encontrados no AP, no qual os animais apresentaram menor número de células em proliferação (Ki-67+) na dose de Imi 0,06 nmol/ μ l, assim como um aumento significativo no número de células DCX+ na dose de Imi 0,2 nmol/ μ l, quando comparados ao grupo salina da mesma condição de alojamento. No AE houve apenas uma redução, marginalmente significativa, no número de células Ki-67+ no grupo imi 0,2 nmol/ μ l, quando comparada ao grupo controle do mesmo alojamento.

A neurogênese engloba diversas etapas: a proliferação de progenitores neuronais, diferenciação destes progenitores em neurônios, maturação e integração destes neurônios novos à circuitaria já existente (CHRISTIE e CAMERON, 2006). Em nosso trabalho verificamos o número de células em proliferação (através da expressão da proteína Ki-67) e o número de neurônios novos (através da expressão da proteína DCX). O número de células em proliferação é função dos processos de proliferação e morte dos progenitores bem como das suas taxas de diferenciação (CHRISTIE e CAMERON, 2006). Por sua vez, o número de neurônios novos é função da taxa de diferenciação dos progenitores de origem, da taxa de sobrevivência e de maturação destes neurônios (DAYER et al., 2003; PETREANU e ALVAREZ-BUYLLA, 2002).

Nossos resultados indicam que a imipramina altera de forma dose-dependente o número de células em proliferação no hipocampo dos camundongos Suíços adultos. A dose de Imi 0,06 nmol/ μ l no AP reduziu significativamente as células Ki-67+ enquanto a dose de Imi 0,2 nmol/ μ l não afetou significativamente esta variável. No entanto, a literatura mostra que o tratamento agudo ou subagudo, aplicado pela via sistêmica, com diferentes fármacos e doses de antidepressivos parece não alterar a proliferação celular em camundongos 129/Sv (SANTARELLI, et al., 2003). MANEV e cols. (2001) observaram em estudos in vitro, uma inibição da proliferação celular mediante a aplicação de diversos antidepressivos; entretanto, não observaram efeitos na proliferação celular (BrdU+) quando realizaram a administração aguda de fluoxetina aos ratos Brown-norway. Essas diferenças, entre nossos dados e a literatura, podem ser justificadas em parte pela dose utilizada e pela via de aplicação. Em nosso trabalho empregamos as doses de 0,2 nmol/ μ l e 0,06 nmol/ μ l e comparações com as doses encontradas na literatura são difíceis por causa da via utilizada. Nos estudos são utilizados doses variando entre 5 e 32 mg/kg

(WEBBER et al., 2009; DAVID et al., 2001; PORSOLT et al. 1978), aplicadas via sistêmica, e não há como transpor diretamente esses valores para injeção icv. Uma diferença entre a via sistêmica e a icv, que poderia contribuir para a diferença entre os dados, é a biodisponibilidade do fármaco (BROSEN et al., 1988). O fármaco aplicado via icv atingiria as regiões próximas aos ventrículos cerebrais (como é o caso do hipocampo) rapidamente e com a concentração semelhante à dose aplicada, enquanto pela via sistêmica parte do fármaco seria metabolizada antes de alcançar o cérebro com uma concentração menor que a aplicada (CIRAULO et al., 1988). Há estudos demonstrando que a administração icv ou sistêmica de antidepressivo geram diferentes efeitos sobre, por exemplo, a percepção da dor e sobre a retenção da memória em ratos e camundongos (ZARRINDAST et al., 2000; ZARRINDAST et al., 2004).

Os dados obtidos neste trabalho indicam que a imipramina pode afetar os processos de proliferação, morte e/ou diferenciação dos progenitores de forma dose dependente. A dose de 0,06 nmol/ μ l reduziu o número de células Ki-67+ que pode ser resultado da inibição do processo de proliferação e/ou a indução da morte e/ou aumento da diferenciação dos progenitores.

Se o tratamento com imipramina de alguma forma afetou o processo de diferenciação dos progenitores esperaríamos encontrar alterações no número de neurônios novos compatíveis com as alterações no número de células em proliferação. No entanto, a redução no número de células Ki-67+ na dose de 0,06 nmol/ μ l do AP, não foi acompanhada por alterações no número de células DCX+ sugerindo que o aumento do número de células Ki-67+ não ocorreu pelo aumento da diferenciação dos progenitores em neurônios. Assim, já que não houve aumento no número de células DCX+, possivelmente houve diminuição na proliferação e/ou indução da morte celular e/ou aumento da diferenciação dos progenitores em glia.

A injeção aguda de imipramina na dose de 0,2 nmol/ μ l aumentou significativamente o número de células DCX+ no GD do hipocampo, ou seja, aumentou o número de neurônios novos. Portanto a imipramina, nesta dose, deve ter diminuído a morte dos neurônios recém-formados e/ou reduzido da maturação neuronal já que a taxa de proliferação não se alterou nesta condição.

A influência do intervalo de tempo entre o tratamento e o sacrifício do animal será discutida no capítulo 3.5

3.3 CORRELAÇÃO ENTRE OS COMPORTAMENTOS OBSERVADOS NO CAMPO ABERTO E O NÚMERO DE CÉLULAS Ki-67+ E DCX+ NO GD DOS CAMUNDONGOS SUÍÇOS ADULTOS: INFLUÊNCIA DA DOSE DE IMIPRAMINA

Apesar de não haver diferenças estatísticas entre os comportamentos registrados no teste de campo aberto nos diferentes grupos experimentais, foi observado que há correlação entre o comportamento de coçar a cabeça e as contagens das células Ki-67+. Houve correlação positiva entre o tempo de coçar a cabeça (seg) com as células Ki-67+ nos animais do grupo Imi 0,2 nmol/ μ l (ver Tabela 9, $p < 0,05$, ver Anexo 4 para Figura da correlação). Nenhuma correlação foi observada entre o tempo dos outros comportamentos e as células Ki-67+ ou DCX+ (ver Tabelas 9 e 10). Estes dados estão de acordo ao observado por Silva e cols. (2011, dados não publicados de nosso laboratório).

Tabela 9. Valores de R das correlações entre os comportamentos avaliados no teste de campo aberto com o número de células Ki-67+ independente do pré-tratamento.

Trat.	L	EV	LC	AL	I	AR	CC
Salina	0,18	-0,50	-0,13	0,13	0,14	0,36	-0,12
Imi 0,06	-0,35	0,49	0,61	-0,24	-0,23	0,71	0,05
Imi 0,2	-0,36	0,21	0,02	0,41	-0,40	0,45	0,86*

O campo aberto foi realizado imediatamente após o tratamento farmacológico (via icv) e o sacrifício dos animais para obtenção dos cérebros submetidos a imunistoquímica para Ki-67 ocorreu 24 após o teste. Trat. = tratamento, L= locomoção, EV= exploração vertical, LC= limpeza de cabeça, AL= autolimpeza, I= imobilidade, AR= análise de risco, CC= coçar a cabeça, Imi= imipramina (nmol/ μ l). * Spearman R ($p < 0,05$).

Tabela 10. Valores de R das correlações entre os comportamentos avaliados no teste de campo aberto com o número de células DCX+ independente do pré-tratamento. (Legenda Tabela 10. na página 58)

Trat.	L	EV	LC	AL	I	AR	CC
Salina	-0,53	-0,17	-0,34	-0,35	0,46	0,52	-0,17

Imi 0,06	-0,17	-0,45	0,61	-0,19	0,48	-0,48	0,65
Imi 0,2	-0,23	0,26	0,23	0,57	-0,14	0,35	0,52

Legenda Tabela 10 (página 57): O campo aberto foi realizado imediatamente após o tratamento farmacológico (via icv) e o sacrifício dos animais para obtenção dos cérebros submetidos a imunohistoquímica para DCX ocorreu 24 após o teste. Trat. = tratamento, L= locomoção, EV= exploração vertical, LC= limpeza de cabeça, AL= autolimpeza, I= imobilidade, AR= análise de risco, CC= coçar a cabeça, Imi= imipramina (nmol/ μ l).

Embora exista a correlação entre o tempo de coçar a cabeça e a contagem de células Ki-67+ no grupo imi 0,2 nmol/ μ l, tal correlação não pode ser confiável, devido às diferenças significativas entre as contagens dessas células nos grupos tratados com imipramina, do AP e AE. A correlação foi feita com o total dos casos de AP e AE, i.e., independentes do pré-tratamento, portanto tais diferenças não foram levadas em consideração. Se a análise fosse feita separadamente por pré-tratamento (AP e AE), talvez a correlação não existisse.

3.4 EFEITOS DO TIPO DE AMBIENTE SOBRE O NÚMERO DE CÉLULAS EM PROLIFERAÇÃO Ki-67+ E DOS NEURÔNIOS NOVOS (DCX+) NO GD DO HIPOCAMPO

Os animais sem cirurgia e sem tratamento farmacológico (SC), alojados nas diferentes condições (AP ou AE) não apresentaram diferenças significativas no número de células proliferativas, nem no número de neurônios novos (ver Tabela 11, Figura 10 e anexo 4 para dados estatísticos).

Tabela 11. Número de animais, média e erro padrão da média para células Ki-67+ e DCX+.

Condição de alojamento	N	Marcador celular	Média	\pm EPM
AP	5	Ki-67	3,62	0,98
		DCX	12,95	2,66
AE	4	Ki-67	4,13	1,10

		DCX	16,70	6,41
--	--	-----	-------	------

N= número de animais, EPM= erro padrão da média, AE = ambiente enriquecido, AP = ambiente padrão.

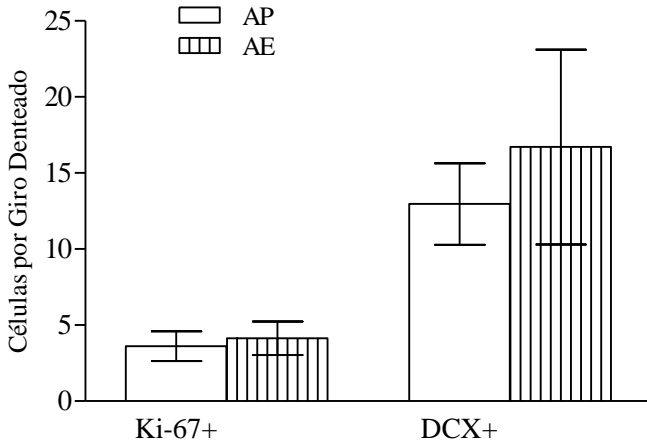


Figura 10. Efeito do alojamento, ambiente padrão (AP) ou ambiente enriquecido (AE) em camundongos Suíço machos sem cirurgia e sem tratamento farmacológico. As barras brancas representam os animais AP e as barras chanfradas representam os animais AE. No eixo Y está representado o número de células positivas por GD para Ki-67+ e DCX+. Todos os dados são expressos em média \pm EPM.

A literatura descreve que o enriquecimento ambiental aumenta a proliferação e a sobrevivência celular e modifica o comportamento de camundongos em diferentes testes (MESH I et al., 2006; VAN PRAAG et al., 1999; KEMPERMANN, et al., 1998). Surpreendentemente, em nossos experimentos não achamos diferenças entre os animais alojados no AP ou no AE em nenhum dos parâmetros avaliados (proliferação celular, formação de neurônios novos e comportamentos no TCA), em nenhum dos grupos, inclusive nos animais sem cirurgia. Estas diferenças entre os resultados podem ser justificadas pelas diferenças entre os tipos e tempos de exposição ao ambiente enriquecido, os métodos utilizados

para determinar a neurogênese bem como a linhagem da espécie animal estudada.

Existem vários tipos de AE descritos para camundongos (MESHI et al., 2006; KEMPERMANN et al., 1998; VAN PRAAG et al., 1999). Rodas de atividade e convívio social parecem ser elementos importantes para que haja efeitos do AE sobre a neurogênese e o comportamento de camundongos (MESHI et al., 2006; VAN PRAAG et al., 1999). VAN PRAAG e cols. (1999), por exemplo, verificaram um aumento da proliferação celular no hipocampo de camundongos C57Bl/6 que realizaram apenas exercício físico voluntário, sem a necessidade de haver outro elemento de enriquecimento ambiental. Embora, o AE empregado no presente trabalho contenha estes elementos essenciais para provocar modificações nos parâmetros avaliados (MESHI et al., 2006), não encontramos alterações nos resultados que possam ser atribuídos ao AE. Assim, concluímos que as discrepâncias entre os nossos resultados e a literatura não se dão pelo tipo de AE utilizado.

Tempos de exposição ao AE tão curtos quanto 11 ou 14 dias são suficientes para aumentar a neurogênese hipocampal e afetar o comportamento de roedores. Por exemplo, BRUEL-JUNGERMAN e cols. (2005) verificaram que a exposição ao AE, por 14 dias, aumentou a sobrevivência celular no hipocampo de ratos Sprague-Dawley. E onze dias de exposição ao AE já modifica o comportamento locomotor, reduzindo a atividade locomotora de ratos Sprague-Dawley (ELLIOT e GRUNBERG, 2005). A exposição mais prolongada (aproximadamente 28 dias) também melhora a aprendizagem espacial no labirinto aquático (do inglês “water maze”), diminui a locomoção dos animais no campo aberto e a exploração de objetos, em ratos e em camundongos 129Sv/Ev e C57Bl/6 (ELLIOT e GRUNBERG, 2005; KEMPERMANN et al., 1997a, MESHI et al., 2006, SCHRIJVER et al., 2002). Além disso, ELLIOT e GRUNBERG (2005) constataram que após 28 dias de enriquecimento ambiental somente os ratos com convívio social mantinha a redução na atividade locomotora. A exposição ao AE por períodos acima de 30 dias continuaram a afetar a neurogênese hipocampal e o comportamento de camundongos adultos (MESHI et al., 2006; LLORENS-MARTIN et al., 2007). LLORENS-MARTIN e cols. (2007) constataram redução na imobilidade no TNF e aumento do número de neurônios novos após expor camundongos C57Bl/6 por 8 semanas ao AE. MESHI e cols. (2006) verificaram um aumento no

número de células proliferativas (BrdU+) no hipocampo de camundongos 129Sv/Ev expostos por 6 semanas ao AE. Assim, o período de exposição ao AE empregado neste trabalho (30 dias) poderia ser suficiente para alterar o comportamento e estimular a proliferação de progenitores neuronais e a sobrevivência dos neurônios novos no hipocampo de roedores. Então o tipo e o tempo do AE não parecem ser a causa das diferenças aqui encontradas. Assim, possivelmente o método de imunistoquímica empregado pode ser responsável pelas variações nos resultados.

A detecção imunistoquímica do BrdU é um método frequentemente empregado nos estudos voltados aos efeitos do AE sobre a proliferação de progenitores ou sobre a sobrevivência de neurônios novos no hipocampo. O BrdU é um análogo da timidina que é incorporado ao DNA durante a fase de síntese (S) do ciclo celular (BOHLEN und HALBACK, 2007). O método de marcação de células em proliferação ou de neurônios novos com BrdU consiste do tratamento do animal com algumas injeções de BrdU 24 h antes do sacrifício (CHRISTIE e CAMERON, 2006). Para a sobrevivência celular o sacrifício dos animais deve ocorrer várias semanas após as injeções de BrdU (KEMPERMANN et al., 1997b). Utilizando esta técnica foi verificado que o AE aumenta a sobrevivência celular no GD do hipocampo de camundongos C57Bl/6 após exposição ao AE por 40 dias (KEMPERMANN, et al., 1997a; KEMPERMANN, et al., 1998). Da mesma maneira, BRUEL-JUNGERMAN e cols. (2005) verificaram que a exposição ao AE por 14 dias aumentou a sobrevivência celular no hipocampo de ratos Sprague-Dawley. Porém em nosso trabalho não foi avaliada a sobrevivência, mas sim, o número de neurônios novos. O número de células expressando a proteína doublecortina (DCX) é um indicador da quantidade de neurônios recém-formados e pode variar de acordo com a taxa de sobrevivência ou de maturação destas células (BOHLEN und HALBACH, 2007). MESHİ e cols. (2006) avaliaram o número de células DCX+ após a exposição ao AE e encontraram um aumento no número dessas células no GD do hipocampo de camundongos 129Sv/Ev. De forma semelhante, LLORENS-MARTIN e cols. (2007) expuseram camundongos C57Bl/6 por 8 semanas ao AE e constataram um aumento no número de células DCX+ no hipocampo destes animais. Assim, esta diferença metodológica parece não explicar

ausência de efeito do AE sobre o número de neurônios novos no hipocampo dos camundongos neste trabalho.

Em nosso trabalho, o método utilizado para avaliar o número de células em proliferação foi a técnica de detecção e quantificação da proteína Ki-67. A proteína Ki-67 é expressa em todas as células em alguma fase da divisão celular (com exceção da interfase). Assim a técnica de detecção e quantificação da proteína Ki-67 indica o número de células em divisão no momento da morte do animal (CHRISTIE e CAMERON, 2006). Em contrapartida, o BrdU marca apenas as células que estavam na fase S da divisão celular no momento em que foi injetado até aproximadamente 2 h após a injeção (KEMPERMANN et al., 1997b; BOHLEN und HALBACH, 2007; CHRISTIE e CAMERON, 2006). Geralmente são aplicadas algumas injeções de BrdU (aproximadamente 4 doses), 24 h antes do sacrifício dos animais, marcando um rol de células em divisão (CHRISTIE e CAMERON, 2006). No caso do trabalho de MESHI e cols. (2006) que constataram um aumento no número de células proliferativas (BrdU+) no hipocampo de camundongos 129Sv/Ev expostos por 6 semanas ao AE. Assim, a ausência de efeito do AE sobre as células em proliferação no hipocampo dos camundongos poderia ser atribuída em parte a esta variação metodológica.

Outro fator que pode ter contribuído para as diferenças nos resultados foi à linhagem do animal. Os animais utilizados em nossos experimentos foram camundongos Suíços. Diversos autores compararam as várias linhagens de camundongos que são utilizadas em estudos e averiguaram diferenças entre elas (KEMPERMANN et al., 1997b; DAVID et al., 2007; DULAWA et al., 2004; NAVAILLES et al., 2008, PORSOLT et al., 1978). DULAWA e cols. (2004) avaliaram a sensibilidade dos animais ao tratamento com antidepressivos e o comportamento de defesa em quatro linhagens de camundongo (BALB/cJ, DBA/2J, C57BL/6J e 129S6/SvEvTac). Foi verificado que apenas os animais BALB/cJ são sensíveis ao tratamento crônico com antidepressivo quando submetidos ao TNF, porém estes não apresentam alterações no TCA, enquanto as outras três linhagens demonstram diferenças na atividade locomotora após o tratamento com fármaco antidepressivo (DULAWA et al., 2004). KEMPERMANN e cols. (1997b) testaram a taxa de proliferação, diferenciação e sobrevivência celular em quatro outras linhagens de camundongos (C57Bl/6, BALB/c,

CD1 e 129Sv/J) e verificaram que os animais 129Sv/J desenvolvem menos neurônios novos, tem tendência a ter mais glia nova e também possui a menor taxa de sobrevivência celular, enquanto os animais C57Bl/6 possuem a maior taxa de proliferação (aproximadamente 1,5 vezes maior que as outras linhagens). SILVA e cols. (2010, dados não publicados) avaliaram o número de células DCX+ em camundongos Suíços expostos ao AE por 8 semanas e não acharam diferença entre esses animais e os que foram mantidos em AP, sugerindo que camundongos Suíços não são sensíveis ao AE. Isto demonstra que cada linhagem de camundongo tem suas particularidades, e são necessários mais testes com camundongos Suíços para avaliar as diferenças entre esses animais e as outras linhagens, já que esta linhagem é muito resistente e é a mais utilizada em laboratórios brasileiros.

Portanto a principal variável que justifica a ausência de efeito do enriquecimento ambiental é a diferença na linhagem animal utilizada. Não há estudos demonstrando qual é a taxa de neurogênese e nem o efeito do AE em camundongos Suíços, mas não se pode excluir a diferença metodológica utilizada para avaliação da proliferação celular para explicar as disparidades com a literatura. Desta maneira, é possível que o tipo e o tempo de enriquecimento ambiental aqui empregado não sejam suficientes para afetar a neurogênese no hipocampo ou o comportamento desta linhagem.

Os efeitos do tratamento com imipramina sobre o número de células em proliferação e neurônios novos desapareceram na condição de alojamento AE. Isto indica que, embora o AE não tenha produzido efeitos *per se*, esta condição de alojamento não foi inócua para os camundongos Suíços. Além disso, ao contrário do esperado, parece que o AE parece reduzir a sensibilidade do hipocampo aos efeitos da imipramina. Isto poderia ser decorrente de alterações na disponibilidade dos sítios de união da imipramina que, entre outros alvos, se une às proteínas de membrana dos neurônios pré-sinápticos responsáveis pela recaptação das monoaminas (5-HT e NA) (SARKER et al., 2010). Não há dados na literatura que reforcem essas conclusões, uma vez que este é o primeiro trabalho mostrando que a injeção aguda de imipramina pode afetar a neurogênese no hipocampo de camundongos de forma dose e ambiente dependente.

3.5 INFLUÊNCIA DO INTERVALO ENTRE O TRATAMENTO E O SACRIFÍCIO SOBRE O NÚMERO DE CÉLULAS EM PROLIFERAÇÃO KI-67+ E DOS NEURÔNIOS NOVOS (DCX+) NO GD DO HIPOCAMPO

A Tabela 12 mostra os valores da média e do erro padrão da média do número de células Ki67+ observadas no GD de cada um dos grupos de animais experimentais sacrificados 2 h depois da injeção icv. Observamos que não houve diferença significativa entre o número de células Ki-67+ do grupo tratado com salina ou com imi 0,2 nmol/μl em ambas as condições de alojamento (ver Tabela 12 e Figura 11).

Tabela 12. Número de animais, média, erro padrão da média e estatística para células Ki67+ do grupo sacrificado 2h após o tratamento.

Pré-tratamento	Tratamento	N	Média	± EPM	Valor de p
AP	Salina	3	5,91	0,79	0,85 (ns)
AP	Imi 0,2	4	5,58	1,45	
AE	Salina	3	6,69	2,74	0,85 (ns)
AE	Imi 0,2	4	4,70	0,73	

N= número de animais, EPM= erro padrão da média, AE = ambiente enriquecido, AP = ambiente padrão, Imi = imipramina, ns= não-significante. Valor de p extraído do Teste de Mann-Whitney comparando o grupo salina ao Imi 0,2 para cada condição de alojamento.

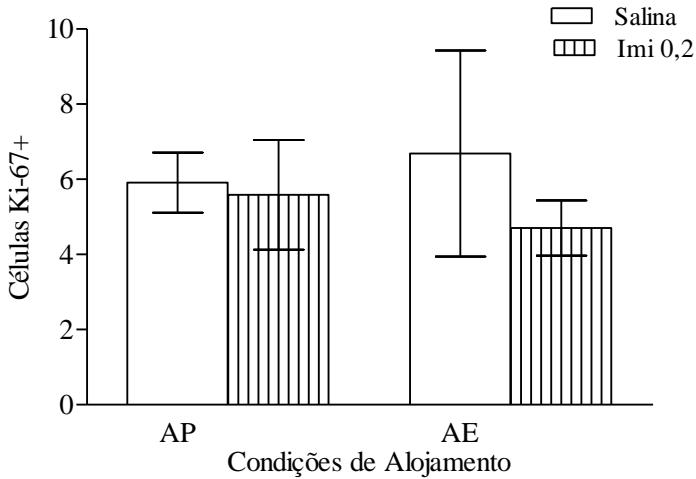


Figura 11. Efeito da injeção icv de imipramina sobre o número de células Ki-67+, em camundongos Suíços machos, alojados em ambiente padrão (AP) ou ambiente enriquecido (AE), que foram sacrificados 2 h após a injeção. As barras brancas representam os animais salina e as barras chanfradas representam os animais Imi 0,2 nmol/ μ l. Todos os dados são expressos em média \pm EPM.

A tabela 13 mostra os valores da média e do erro padrão da média do número de células DCX+ observadas no GD de cada um dos grupos de animais experimentais sacrificados 2 h depois da injeção icv. Nenhum dos grupos apresentou diferenças significativas no número de neurônios novos (ver Tabela 13 e Figura 12).

Tabela 13. Número de animais, média, erro padrão da média e estatística para células DCX+ do grupo sacrificado 2h após o tratamento.

Pré-tratamento	Tratamento	N	Média	\pm EPM	Valor de p
AP	Salina	3	22,20	3,92	0,62 (ns)
AP	Imi 0,2	4	16,12	5,53	
AE	Salina	3	21,44	4,38	0,40 (ns)
AE	Imi 0,2	4	15,11	2,15	

N= número de animais, EPM= erro padrão da média, AE = ambiente enriquecido, AP = ambiente padrão, Imi = imipramina, ns= não-significante.

Valor de p extraído do Teste de Mann-Whitney comparando o grupo salina ao Imi 0,2 nmol/ μ l, para cada condição de alojamento.

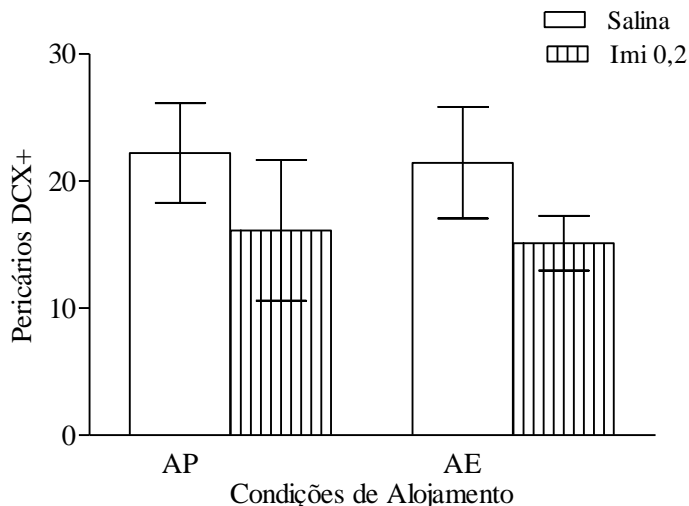


Figura 12. Efeito da injeção icv de imipramina sobre o número de células DCX+, em camundongos Suíços machos, alojados em ambiente padrão (AP) ou ambiente enriquecido (AE), que foram sacrificados 2 h após a injeção. As barras brancas representam os animais salina e as barras chanfradas representam os animais Imi 0,2 nmol/ μ l. Todos os dados são expressos em média \pm EPM.

Não houve diferenças nas contagem de células DCX+ nos animais sacrificados 2 h após o tratamento, se opondo ao resultado encontrado para os animais sacrificados 24 h após a injeção. Portanto, o intervalo de tempo entre o tratamento e o sacrifício do animal pode contar para as discrepâncias com a literatura. Este intervalo parece influenciar os resultados, uma vez que os efeitos do tratamento com imipramina sobre o número neurônios novos foi observado quando os animais foram sacrificados 24 h, e não 2 h, após o tratamento. Isto pode ocorrer por variações no tempo de ciclo celular e da diferenciação celular nas diferentes linhagens (CHRISTIE e CAMERON, 2006; KEMPERMANN et al., 1997b).

4 CONCLUSÃO

Em nossos experimentos esperávamos observar aumento do número de células em proliferação e do número de neurônios novos nos animais alojados no AE, assim como um efeito sinérgico entre o AE e o tratamento agudo com a imipramina, por causa dos resultados apresentados na literatura, porém, isto não ocorreu. Nossos resultados nos levaram a atribuir a falta de efeitos do AE sobre a neurogênese à linhagem animal utilizada. Contudo, a avaliação somente do número de neurônios expressando DCX pode não ter sido adequado como método de avaliação dos efeitos do ambiente sobre a neurogênese. Assim, planejamos avaliar futuramente também a morfologia dos neurônios DCX+ e da árvore dendrítica, a posição em que se encontra na camada granular do GD. Com esta abordagem esperamos ter mais elementos para concluir a respeito da influência do AE na neurogênese dos camundongos suíços.

O AE parece ter revertido os efeitos da imipramina (que ocorreu nos animais do AP) sugerindo que o AE altera de alguma forma os sítios de união da imipramina modificando seus efeitos. Houve também uma diferença significativa entre as duas doses de imipramina, tanto no AP quanto no AE, demonstrando que os efeitos da imipramina são dose dependente, e que as diferenças nas concentrações provocam resultados diferentes sobre a neurogênese.

Esses dados são importantes para a compreensão dos mecanismos iniciais de fármacos antidepressivos, pois, de alguma forma, esses possuem ações desde o início de seu uso e que ainda não estão estabelecidas. Também mostram que existem diferenças entre as diversas linhagens animais existentes. Os nossos resultados indicam a necessidade de novos estudos com o camundongo Suíço, para compreender o ciclo celular dos progenitores neurais do cérebro destes animais adultos e os efeitos de diferentes estímulos ambientais sobre sua neurogênese.

REFERÊNCIAS

- ADAMSON, G.L. Clinical Depression. **The Can Med Assoc Jour**, v. 57, n. 1, p. 1-4, jul, 1947.
- AIMONE, J. B.; DENG, W.; GAGE, F. H. Adult neurogenesis: integrating theories and separating functions. **Trends Cogn. Sci**, v. 14, n. 7, p. 325-337, 2010.
- ALVAREZ-BUYLLA, A.; GARCÍA-VERDUGO, J.M. Neurogenesis in adult subventricular zone. **The J of Neurosci.**, v. 22, n. 3, p.629–634, fev, 2002.
- ALVAREZ-BUYLLA, A.; SERI, B.; DOETSCH, F. Identification of neural stem cells in the adult vertebrate brain. **Brain Res Bulletin**, v. 57, n. 6, p. 751–758, 2002.
- BOHLEN und HALBACH, O. Immunohistological markers for staging neurogenesis in adult hippocampus. **Cell Tissue Res**, v. 329, p. 409–420, 2007
- BROCCO, M.; DEKEYNE, A.; VEIGA, S.; GIRARDON, S.; MILLAN, M.J. induction of hyperlocomotion in mice exposed to a novel environment by inhibition of serotonin reuptake: a pharmacological characterization of diverse classes of antidepressant agents. **Pharmacol, Biochem and Behav**, v. 71, p. 667-680, 2002.
- BROSEN, K.; GRAM, L.F. First-pass metabolism of imipramine and desipramine: Impact of the sparteine oxidation phenotype. **Clin Pharmacol Ther**, v. 43, n 4, p. 400-406, abr, 1988.
- BROWN, J. P.; COUILLARD-DESPRÉS, S.; COOPER-KUHN, C. M.; WINKLER, J.; AIGNER, L.; KUHN, H. G. **Transient expression of doublecortin during adult neurogenesis**. *The J of Comp Neurol*, v. **467**, n **1**, p **1–10**, dez, 2003
- BRUEL-JUNGERMAN, E.; LAROCHE,S.; RAMPON, C. New neurons in the dentate gyrus are involved in the expression of enhanced

long-term memory following environmental enrichment. **Eur J of Neurosci.**, v. 21, p. 513–521, 2005.

CAMPBELL, S.; MACQUEEN, G. The role of the hippocampus in the pathophysiology of major depression. **J Psychiatry Neurosci**, v. 29, n. 6, p. 417-426, 2004.

CARLSSON, A. Structural specificity for inhibition of [¹⁴C]-5-hydroxytryptamine uptake by cerebral slices. **The J of Pharmacy and Pharmacol**, v. 22, p. 729-732, jun, 1970.

CHEN, F.; MADSEN, T.M.; WEGENER, G.; NYENGAARD, J.R. Imipramine treatment increases the number of hippocampal synapses and neurons in a genetic animal model of depression. **Hippocampus**, v. 20, n. 12, p. 1376-1384, 2010.

CHRISTIE, B.R.; CAMERON, H.A. Neurogenesis in the adult hippocampus. **Hippocampus**, v. 16, p. 199–207, 2006.

CIRAULO, D.C.; Barnhill, J.G.; Jaffe, J.H. Clinical pharmacokinetics of imipramine and desipramine in alcoholics and normal volunteers. **Clin Pharmacol Ther**, v. 43, n. 5, p. 509-518, maio, 1988.

DAVID, D.J.P.; DHONNCHADHA, B.A.N.; JOLLIET, P.; HASCOËT, M.; BOURIN, M. Are there gender differences in the temperature profile of mice after acute antidepressant administration and exposure to two animal models of depression? **Behav Brain Res**, v. 119, p. 203-211, 2001.

DAVID, D.J.; KLEMENHAGEN, K.C.; HOLICK, K.A.; SAXE, M.D.; MENDEZ, I.; SANTARELLI, L.; CRAIG, D.A.; ZHONG, H.; SWANSON, C.J.; HEGDE, L.G.; PING, X.I.; DONG, D.; MARZABADI, M.R.; GERALD, C.P.; HEN, R. Efficacy of the mchr1 antagonist n-[3-(1-[[4-(3,4-difluorophenoxy)phenyl]methyl](4-piperidyl))-4-methylphenyl]-2-methylpropanamide (snap 94847) in mouse models of anxiety and depression following acute and chronic administration is independent of hippocampal neurogenesis. **The J of Pharmac and Experim Therap**, v. 321, n. 1, p. 237-248, 2007.

- DAYER, A.G.; FORD, A.A.; CLEAVER, K.M.; YASSAEE, M.; CAMERON, H.A. Short-Term and Long-Term Survival of New Neurons in the Rat Dentate Gyrus. **The J of Comp Neurol**, v. 460, p. 563–572, 2003.
- DELGADO, P.L.; CHARNEY, D.S.; PRICE, L.H.; AGHAJANIAN, G.K.; LANDIS, H.; HENINGER, G.R. Serotonin function and the mechanism of antidepressant action. **Arch of Gen Psychiatry**, v. 47, p. 411-417, maio, 1990.
- DEKTE, M.J.; RICKELS, M.; LUCKI, I. Active behaviors in the rat forced swimming test differentially produced by serotonergic and noradrenergic antidepressants. **Psychopharmacol**, v. 121, p. 66-72, 1995.
- DEKTE, M.J.; LUCKI, I. Detection of serotonergic and noradrenergic antidepressants in the rat forced swimming test: the effects of water depth. **Behav Brain Res**, v. 73, p. 43-46, 1996.
- DEKTE, M.J.; JOHNSON, J.; LUCKI, I. Acute and chronic antidepressant drug treatment in the rat forced swimming test model of depression. **Exp and Clin Psychopharmacol**, v. 5, n. 2, p. 107-112, 1997.
- Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders- DSM-IVTR. American Psychiatric Association Press, 4^a edição. Washington DC, 2000.
- DULAWA, S.C.; HOLICK, K.A.; GUNDERSEN, B.; HEN, R. Effects of chronic fluoxetine in animal models of anxiety and depression. **Neuropsychopharmac**, v. 29, p. 1321-1330, 2004.
- ELLIOT, B.M.; GRUNBERG, N.E. Effects of social and physical enrichment on open field activity differ in male and female Sprague–Dawley rats. **Behav Brain Res**, v. 165, p. 187-196, 2005.
- ERIKSSON, P.S.; PERFILIEVA, E.; BJÖRK-ERIKSSON, T.; ALBORN, A.M.; NORDBORG, C.; PETERSON, D.A.; GAGE, F.H.

Neurogenesis in the adult human hippocampus. **Nature Med**, v. 4, n. 11, p. 1313-1317, nov, 1998.

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

GAVRILOVA-RUCH, O.; SCHÖNHERR, K.; GESSNER, G.; SCHÖNHERR, R.; KLAPPERSTÜCK, T.; WOHLRAB, W.; HEINEMANN, S.H. Effects of imipramine on ion channels and proliferation of IGR1 melanoma cells. **J Membr Biol**, v.188, n. 2, p. 137-149, jul, 2002.

GERSNER, R.; GORDON-KIWKOWITZ, M.; ZANGEN, A. Automated behavioral analysis of limbs' activity in the forced swim test. **J of Neurosci. Meth**, v. 180, p. 82–86, 2009

GLOWINSKI, J.; AXELROD, J. Inhibition of uptake of tritiated-noradrenaline in the intact rat brain by imipramine and structurally related compounds. **Nature**, v. 204, p. 1318-1319, dez, 1964.

GOLD, P.W.; GOODWIN, F.K.; CHROUSOS, G.P. Clinical and biochemical manifestations of depression: relation to the neurobiology of stress (first of two parts). **The New Eng J of Med**, v. 319, n. 6, p. 348-353, ago, 1988.

GRIEBEL G, BLANCHARD DC, AGNES RS, BLANCHARD RJ. Differential modulation of antipredator defensive behavior in Swiss-Webster mice following acute or chronic administration of imipramine and fluoxetine. **Psychopharmacol**, v. 120, p. 57-66, 1995.

HARMER, C.J.; O'SULLIVAN, U.; FAVARON, E.; MASSEY-CHASE, R.; AYRES, R.; REINECKE, A.; GOODWIN, G.M.; COWEN, P.J. Effect of Acute Antidepressant Administration on Negative Affective Bias in Depressed Patients. **Am J Psychiatry**, v. 166, p. 1178–1184, 2009.

HARMER, C.J.; BODINAT, C.; DAWSON, G.R.; DOURISH, C.T.; WALDENMAIER, L.; ADAMS, S.; COWEN, P.J.; GOODWIN, G.M. Agomelatine facilitates positive versus negative affective processing in healthy volunteer models. **J Psychopharmacol**, publicado online, 21 de julho, 2010. DOI: 10.1177/0269881110376689

HO, Y.C.; WANG, S. Adult neurogenesis is reduced in the dorsal hippocampus of rats displaying learned helplessness behavior. **Neurosci.**, v. 171, p. 153-161, 2010.

JOCA, S.R.L.; PADOVAN, C.M.; GUIMARÃES, F.S. Estresse, depressão e hipocampo. **Rev Bras Psiquiatria**, v. 25, n. 2, p. 46-51, 2003.

KAROLEWICZ, B.; e PAUL, I.A. Group housing of mice increases immobility and antidepressant sensitivity in the forced swim and tail suspension tests. **Eur Jof Pharmacol**, v. 415, p. 197–201, 2001.

KEMPERMANN, G.; KUHN, H.G.; GAGE, F.H. More hippocampal neurons in adult mice living in an enriched environment. **Nature**, v.386, p. 493-495, 1997a.

KEMPERMANN, G.; KUHN, H.G.; GAGE, F.H. Genetic influence on neurogenesis in the dentate gyrus of adult mice. **Neurobiology**, v. 94, p. 10409-10414, set, 1997b.

KEMPERMANN, G.; KUHN, H.G.; GAGE, F.H. Experience-Induced Neurogenesis in the Senescent Dentate Gyrus. **The J of Neurosci.**, v. 18, n. 9, p. 3206–3212, maio, 1998.

KOE, B.K.; LEBEL, L.A.; WELCH, W.M. [3H] Sertraline binding to rat brain membranes. **Psychopharmacol**, v. 100, p. 470-476, 1990.

KULKARNI, S.K.; DHIR, A. Effect of various classes of antidepressants in behavioral paradigms of despair. **Prog in Neuro-Psychopharmacol & Biol Psychiatry**, v. 31, p. 1248–1254, 2007.

LEMBERGER, L. Of mice and men: the extension of animal models to the clinical evaluation of new drugs. **Clin Pharmacol Therap**, v. 40, n. 6, p. 599-603, dez, 1986.

LEVITT, P.; HARVEY, J.A.; FRIEDMAN, E.; SIMANSKY, K.; MURPHY, E.H. New evidence for neurotransmitter influences on brain development. **TINS**, v. 20, n. 6, p. 269-274, 1997.

LI, M.Y.; YAN, Q.S.; COFFEY, L.L.; REITH, M.E.A. Extracellular dopamine, norepinephrine and serotonin in the nucleus accumbens of freely moving rats during intracerebral dialysis with cocaine and other monoamine uptake blockers. **J of Neurochem**, v. 66, n. 2, p. 559-568, 1996.

LLORENS-MARTÍN, M.V.; RUEDA, N.; MARTÍNEZ-CUÉ, C.; TORRES-ALEMÁN, I.; FLÓREZ, J.; TREJO, J. L. Both increases in immature dentate neuron number and decreases of immobility time in the forced swim test occurred in parallel after environmental enrichment of mice. **Neurosci.**, v. 147, p. 631-638, 2007.

MAÎTRE, L.; MOSER, P.; BAUMANN, P.A.; WALDMEIER, P.C. Amine uptake inhibitors: criteria of selectivity. **Acta Psychiatrica Scandinavica**, v. 61, n. 280, p. 97-110, 1980.

MALHOTRA, S.; SANTOSH, P.J. Loading dose imipramine--new approach to pharmacotherapy of melancholic depression. **J Psychiat Res**, v. 30, n. 1, p.51-58, 1996.

MALBERG, J.E.; EISCH, A.J.; NESTLER, E.J.; DUMAN, R.S. Chronic Antidepressant Treatment Increases Neurogenesis in Adult Rat Hippocampus. **The J of Neurosci.**, v. 20, n. 24, p. 9104-9110, dez, 2000.

MANEV, H.; UZ, T.; SMALHEISER, N.R.; MANEV, R. Antidepressants alter cell proliferation in the adult brain in vivo and in neural cultures in vitro. **Eur J of Pharmacol**, v. 411, p. 67-70, 2001.

MARTIN, P.; SOUBRIÉ, P.; PUECH, A.J. Reversal of helpless behavior by serotonin uptake blockers in rats. **Psychopharmacol**, v.101, p. 403-407, 1990.

MESHI, D.; DREW, M.R.; SAXE, M.; ANSORGE, M.S.; DAVID, D.; SANTARELLI, L.; MALAPANI, C.; MOORE, H.; HEN, R. Hippocampal neurogenesis is not required for behavioral effects of environmental enrichment. **Nature Neurosci.**, v. 9, n. 6, p. 729-731, jun, 2006.

MIYAMOTO, D.; IJIMA, M.; YAMAMOTO, H.; NOMURA, H.; MATSUKI, N. Behavioural effects of antidepressants are dependent and independent on the integrity of the dentate gyrus. **Intern J of Neuropsychopharmacol**, v. 3, p. 1-10, nov, 2010.

NAVAILLES, S.; HOF, P.R.; SCHMAUSS, C. Antidepressant drug-induced stimulation of mouse hippocampal neurogenesis is age-dependent and altered by early life stress. **The J of Comp Neurol**, v. 509, p. 372-381, 2008.

NESTLER, E.J.; HYMAN, S.E. Animal models of neuropsychiatric disorders. **Nature Neurosci.**, v. 13, n. 10, p. 1161-1169, out, 2010.

NIBUYA, M.; MORINOBU, S.; DUMAN, R.S. Regulation of BDNF and trkB mRNA in Rat Brain by Chronic Electroconvulsive Seizure and Antidepressant Drug Treatments. **The J of Neurosci.**, v. 75, n.11, p. 7539-7547, nov, 1995.

PAGE, M.E.; DETKE, M.J.; DALVI, A.; KIRBY, L.G.; LUCKI, I. Serotonergic mediation of the effects of fluoxetine, but not desipramine, in the rat forced swimming test. **Psychopharmacol**, v. 147, p. 162-167, 1999.

PALIJ, P.; STAMFORD, J.A. Rauwolscine potentiates the effect of desipramine on limbic noradrenaline efflux. **Neuropharmacol and Neurotoxicol**, v. 7, n. 6, p. 1121-1124, abr, 1996.

PAXINOS, G.; FRANKLIN, K.B.J. **The mouse brain in stereotaxic coordinates**. Elsevier - Academic press, 2^a edição, USA, 2001.

PETREANU, I.; ALVAREZ-BUYLLA, A. Maturation and death of adult-born olfactory bulb granule neurons: role of olfaction. **The J of Neurosci.**, v. 22, n. 14, p. 6160-6113, jul, 2002.

PORSOLT, R.D. Animal model of depression. **Biomed**, v. 30, p. 139-140, 1979.

PORSOLT, R.D.; BERTIN, A.; JALFRE, M. Behavioral despair in mice: a primary screening test for antidepressants. **Arch int Pharmacodyn**, v. 229, p. 327-336, 1977a.

PORSOLT, R.D.; BERTIN, A.; JALFRE, M. "Behavioural despair" in rats and mice: strain differences and the effects of imipramine. **Eur J of Pharmacol**, v. 51, p. 291-29, 1978.

PORSOLT, R.D.; LE PICHON, M.; JALFRE, M. Depression: a new animal model sensitive to antidepressant treatments. **Nature**, V. 266, P. 730-732, 1977b.

RAWLINGS, N.B.; NORBURY, R. COWEN, P.J.; HARMER, C.J. A single dose of mirtazapine modulates neural responses to emotional faces in healthy people. **Psychopharmacol**, v. 212, n. 4, p. 625-634, dez, 2010.

ROSS, S.B.; RENYI, A.L. Tricyclic antidepressant agents, comparison of the inhibition of the uptake of ³H-noradrenaline and ¹⁴C-5-hydroxytryptamine in slices and crude synaptosome preparations of the midbrain-hypothalamus region of the rat brain. **Acta Pharmacol et toxicol**, v. 36, p. 382-394, 1975.

SAKAKIBARA, H.; ISHIDA, K.; IZAWA, Y.; MINAMI, Y.; SAITO, S.; KAWAI, Y.; BUTTERWECK, V.; TAMAKI, T.; NAKAYA, Y.; TERAOKA, J. Effects of forced swimming stress on rat brain function. **The JI of Med Investig**, v. 52, p. 300-301, 2005.

SANTARELLI, L.; SAXE, M.; GROSS, C.; SURGET, A.; BATTAGLIA, F.; DULAWA, S.; WEISSTAUB, N.; LEE, J.; DUMAN, R.; ARANCIO, O.; BELZUNG, C.; HEN, R. Requirement of hippocampal neurogenesis for the behavioral effects of antidepressants. **Science**, v. 301, p. 805-809, 2003.

SARKER, S.; WEISSENSTEINER, R.; STEINER, I.; SITTE, H.H.; ECKER, G.F.; FREISSMUTH, M.; SUCIC, S. The High-Affinity Binding Site for Tricyclic Antidepressants Resides in the Outer Vestibule of the Serotonin Transporter. **Mol Pharmacol**, v. 78, n. 6, p. 1026-1035, 2010.

SCHIAVON, A.P.; MILANI, H.; ROMANINI, C.V.; FORESTI, M.L.; CASTRO, O.W.; GARCIA-CAIRASCO, N.; OLIVEIRA, R.M.W. Imipramine enhances cell proliferation and decreases neurodegeneration in the hippocampus after transient global cerebral ischemia in rats. **Neurosci. Letters**, v. 470, p. 43-48, 2010.

SCHRIJVER, N.C.A.; BAHR, N.I.; WEIS, I.C.; WÜRBEL, H. Dissociable effects of isolation rearing and environmental enrichment on exploration, spatial learning and HPA activity in adult rats. **Pharmacol, Biochem and Behav**, v. 73, p. 209-224, 2002.

SPECTOR, S.; SHORE, P.A.; BRODIE, B.B. Biochemical and pharmacological effects of the monoamine oxidase inhibitors, iproniazid, 1-phenyl-2-hydrazinopropane (JB516) and 1-phenyl-3-hydrazinobutane (JB 835). **The J of Pharmacol and experim therap**, v. 128, p. 15-21, 1960.

SONG, L.; CHE, W.; MIN-WEI, W.; MURAKAMI, Y.; MATSUMOTO, K. Impairment of the spatial learning and memory induced by learned helplessness and chronic mild stress. **Pharmacol, biochem and behavi**, v. 86, p. 186-193, 2006.

SURGET, A.; SAXE, M.; LEMAN, S.; IBARGUEN-VARGAS, Y.; CHALON, S.; GRIEBEL, G.; HEN, R.; BELZUNG, C. Drug-dependent

requirement of hippocampal neurogenesis in a model of depression and of antidepressant reversal. **Biol Psychiatry**, v. 64, p. 293-301, 2008.

TIAN, M.; MAO, R.R.; WANG, L.P.; ZHOU, Q.X; CAO, J.; XU, L. Interaction between behavioral despair and addictive behaviors in rats. **Physiol & Behav**, v. 102, p. 7-12, 2011.

TRILLAT, A.C.; MALAGIÉ, I.; MATHE-ALLAINMAT, M.; ANMELLA, M.C.; JACQUOT, C.; LANGLOIS, M.; GARDIER, A.M. Synergistic neurochemical and behavioral effects of fluoxetine and 5-HT_{1A} receptor antagonist. **Eur J of Pharmacol**, v.357, p. 179-184, 1998.

VAN PRAAG, H.; KEMPERMANN, G.; GAGE, F.H. Running increases cell proliferation and neurogenesis in the adult mouse dentate gyrus. **Nature Neurosci.**, v. 2, n. 3, p. 266-270, março, 1999.

VAUGEOIS, J.M.; ODIÈVRE, C.; LOISEL, L.; COSTENTIN, J. A genetic mouse model of helplessness sensitive to imipramine. **Eur J of Pharmacol**, v. 316, p. R1-R2, 1996.

VIEIRA, C.; De LIMA, T.C.M.; CAROBREZ, A.P.; LINO-DE-OLIVEIRA, C. Frequency of climbing behavior as a predictor of altered motor activity in rat forced swimming test. **Neurosci. Letters**, v. 445, p. 170-173, 2008.

VOGEL GW, MINTER K, WOOLWINE B. Effects of chronically administered antidepressants drugs on animal behavior. **Physiol & Behav**, v. 36, p. 659-666, 1985.

YANPALLEWAR, S.U.; FERNANDES, K.; MARATHE, S.V.; VADODARIA, K.C.; JHAVERI, D.; ROMMELFANGER, K.; LADIWALA, U.; JHA, S.; MUTHIG, V.; HEIN, L.; BARTLETT, P.; WEINSHENKER, D.; VAIDYA, V.A. α 2-adrenoceptor blockade accelerates the neurogenic, neurotrophic, and behavioral effects of chronic antidepressant treatment. **The J of Neurosci.**, v. 30, n. 3, p. 1096-1109, jan, 2010.

- XU, Y.; WANG, Z.; YOU, W.; ZHANG, X.; LI, S.; BARISH P.A.; VERNON, M.M.; DU, X.; LI, G.; PAN, J.; OGLE, W.O.
Antidepressant-like effect of trans-resveratrol: Involvement of serotonin and noradrenaline system. **Eur Neuropsychopharmacol**, v. 20, p. 405–413, 2010.
- WEBBER, M.; TALMON, S.; SCHULZE, I.; BOEDDINGHAUS, C.; GROSS, G.; SCHOEMAKER, H.; WICKE, K.M. Running wheel activity is sensitive to acute treatment with selective inhibitors for either serotonin or norepinephrine reuptake. **Psychopharmacol**, v. 203, p. 753–762, 2009.
- WESOLOWSKA, A.; TATARCZYŃSKA, E.; NIKIFORUK, A.; CHOJNACKA-WÓJCIK, E. Enhancement of the anti-immobility action of antidepressants by a selective 5-HT₇ receptor antagonist in the forced swimming test in mice. **Eur J of Pharmacol**, v. 555, p. 43–47, 2007.
- ZARRINDAST, M.R.; VALIZADEH, S.; SAHEBGHARANI, M. GABA_B receptor mechanism and imipramine-induced antinociception in ligated and non-ligated mice. **Eur J of Pharmacol**, v. 407, p. 65–72, 2000.
- ZARRINDAST, M.R.; BAGHDADI, B.; SAHEBGHARANI, M. Potentiation of imipramine-induced antinociception by nicotine in the formalin test. **Eur Neuropsychopharmacol**, v. 14, p. 71– 76, 2004.
- ZHAO, Z.; BAROS, A.M.; ZHANG, H.T.; LAPIZ, M.D.S.; BONDI, C.O.; MORILAK, D.A.; O'DONNELL, J.M. Norepinephrine transporter regulation mediates the long-term behavioral effects of the antidepressant desipramine. **Neuropsychopharmacol**, v. 33, n. 13, p. 3190-3200, dez, 2008.

ANEXO 1 – PROCEDIMENTO OPERACIONAL PADRÃO (POP)

1) Sacarose 9,25%, para 100 ml da solução:

Água destilada (H ₂ O _d)	100 ml
Sacarose	9,25 g

Aquecer a água a 45°C e adicionar a sacarose. Filtrar depois de diluída.

2) Preparo do PB 0,2 M, para 100 ml da solução:

H ₂ O _d	100 ml
NaH ₂ PO ₄ (monobásico)	0,552 g
Na ₂ HPO ₄ (bibásico)	2,272 g

Utilizar 80 ml da água destilada para dissolver os sais. Após a diluição ajustar o pH em 7,4, filtrar e completar o volume para 100 ml.

3) Preparo do PFA 8%, para 100 ml da solução:

H ₂ O _d	100 ml
Paraformaldeído	8 g

Aquecer 80 ml da água a 60°C e adicionar o PFA. Adicionar 1 gota de NaOH 1N a cada 100 ml para auxiliar na diluição. Quando a solução estiver translúcida, deixar esfriar e ajustar o pH em 7,4, filtrar e completar volume para 100 ml. Realizar todo o procedimento na capela. Atenção: deve ser preparado no máximo dois dias antes da perfusão

4) Paraformaldeído (PFA) 4%, para 100 ml da solução:

PB 0,2 M	50 ml
PFA 8%	50 ml

Atenção: Misturar as soluções no dia da perfusão.

5) Preparo do PBS 0,1M, para 100 ml da solução:

H ₂ O _d	100 ml
NaH ₂ PO ₄ (monobásico)	4,465 g
Na ₂ HPO ₄ (bibásico)	58 g
NaCl	18 g

Utilizar 80 ml da água para diluir os sais. Após a diluição ajustar o pH em 7,4, filtrar e completar o volume para 100 ml.

6) Preparo da Sacarose 20%, para 100 ml da solução:

PBS 0,1M	100 ml
Sacarose	20 g

Aquecer o PBS a 45°C e adicionar a sacarose. Filtrar após a diluição.

7) Preparo Tampão A, para 500 ml da solução:

PBS 0,1M	500 ml
Triton-X	750 µl

Retirar 750 µl de PBS e adicionar o triton-x. Agitar lentamente para não formar espuma.

8) Preparo Tampão Citrato, para 1000 ml da solução:

Ácido Cítrico (C ₆ H ₈ O ₇ , H ₂ O)	0,378 g
Citrato de Sódio (C ₆ H ₅ Na ₃ O ₇ , 2 H ₂ O)	2,41 g
H ₂ O _d	1000 ml

Diluir os sais em 800 ml de água destilada e ajustar o pH para 6,0. Completar o volume para 1000 ml.

9) Preparo Soro Albumina Bovina (BSA) 1%, para 10 ml da solução:

Tampão A	10 ml
BSA	0,1 g

Diluir o BSA em tampão A.

10) Preparo TBS 1M, para 100 ml da solução:

Trizma Base	12 g
NaCl	3,6 g
H ₂ O _d	100 ml

Diluir os sais em 80 ml da água destilada, ajustar pH para 7,4 e completar o volume.

11) TBS 0,1 M, para 100 ml da solução:

Diluir 10 ml de TBS 1M em 90 ml de H₂O_d

12) TBS 0,25 M, para 100 ml da solução:

Diluir 25 ml de TBS 1M em 75 ml de H₂O_d

13) Preparo do PB 0,02 M, para 100 ml da solução:

Diluir 10 ml de PB 0,2 M em 90 ml de água destilada.

14) Solução Anticongelante, para 225 ml da solução:

PB 0,02M	54,68 ml
H ₂ O _d	65,625 ml
Propilenoglicol	104,70 ml
Sacarose	75 g

Misturar a sacarose com o PB e com a água até diluir bem, então adicionar o propilenoglicol.

ANEXO 2 – PROTOCOLO DA DIAFANIZAÇÃO

Imergir as lâminas em:

Água destilada por 2 min, deixar escorrer bem.

Álcool 70% por 1 min.

Álcool 90% por 1 min.

Álcool 100% (1) por 1 min e 30 seg

Álcool 100% (2) por 1 min e 30 seg, escorrer bem.

Xilol 1 por 5 min

Xilol 2 por 10 min

Xilol 3 por 10 min.

Escorrer o xilol das lâminas e colar a lamínula, sobre as secções, com dpx (SIGMA-ALDRICH®)

Protocolo para diafanização para lâminas coradas com Giemsa

Imergir as lâminas em:

Água destilada por 2 min.

Água destilada por 2 min, deixar escorrer bem

Álcool 70% por 45 seg.

Álcool 90% por 45 seg

Álcool 100% (1) por 45 seg

Álcool 100% (2) por 45 seg, escorrer bem.

Xilol 1 por 5 min

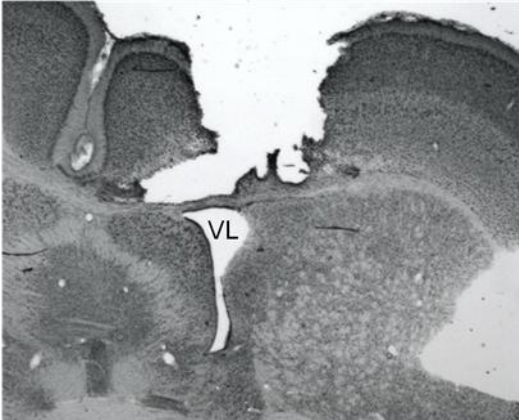
Xilol 2 por 10 min

Escorrer o xilol das lâminas e colar a lamínula, sobre as secções, com dpx (SIGMA-ALDRICH®)

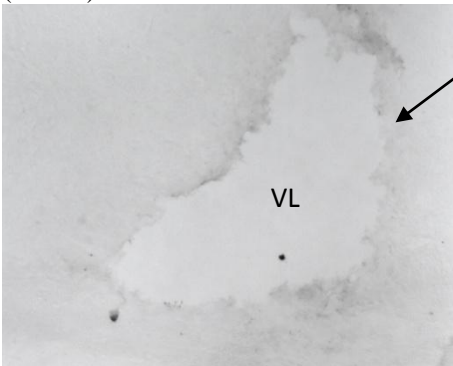
ANEXO 3 – CONTROLE DOS EXPERIMENTOS IMUNOISTOQUÍMICOS

Figura 13. Animais excluídos da análise:

A) Por conter a cânula fora do Ventrículo Lateral



B) Por não apresentar imunorreatividade típica da proteína marcada (DCX+)



A seta indica o ventrículo lateral direito sem marcação para DCX.

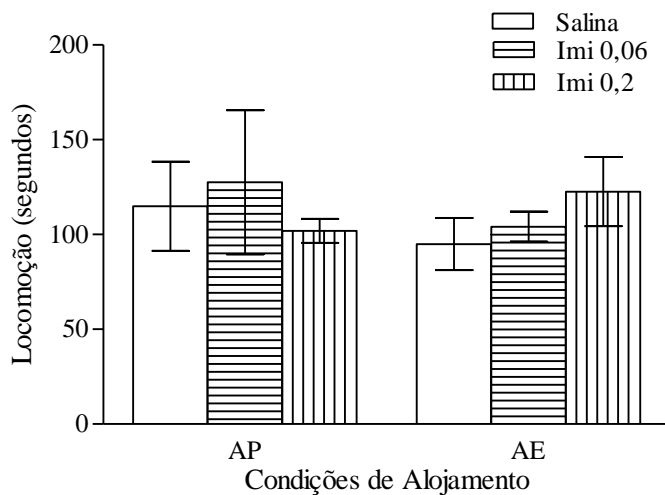
ANEXO 4 – DADOS ESTATÍSTICOS

Figura 14. Apresentação do tempo de locomoção (em seg) no teste de campo aberto em camundongos Suíço após injeção icv de imipramina ou salina. Barras brancas representam animais do grupo salina (n=7, AP e AE), barras com linhas horizontais representam animais do grupo Imi 0,06 nmol/ μ l (n=4, AP e AE), e as barras com linhas verticais representam animais do grupo Imi 0,2 nmol/ μ l (AP, n=5; e AE, n=6). Dados apresentados em média e \pm erro padrão da média.

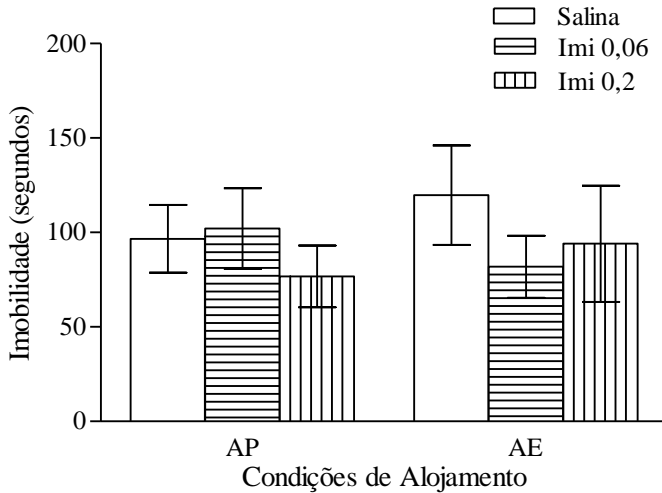


Figura 15. Apresentação do tempo de imobilidade (em seg) no teste de campo aberto em camundongos Suíço após injeção icv de imipramina ou salina. Barras brancas representam animais do grupo salina (n=7, AP e AE), barras com linhas horizontais representam animais do grupo Imi 0,06nmol/ μ l (n=4, AP e AE), e as barras com linhas verticais representam animais do grupo Imi 0,2nmol/ μ l (AP, n=5; AE, n=6), Dados apresentados em média e \pm erro padrão da média.

Tabela 14. Dados estatísticos para as medidas de células Ki-67+, dos animais sacrificados 24 h após a injeção.

Pré-tratamento	Comparações	Valores de p
AP - H (2, 13) = 8,47 p = 0,01*	Salina x Imi 0,06	0,02**
	Salina x Imi 0,2	0,28
	Imi 0,06 x Imi 0,2	0,01**
AE - H (2, 11) = 7,40 p = 0,02*	Salina x Imi 0,06	0,11
	Salina x Imi 0,2	0,06
	Imi 0,06 x Imi 0,2	0,06

*Kruskal-Wallis, **Teste de Mann-Whitney, ns= não-significante

Tabela 15. Dados estatísticos para as medidas das células DCX+, dos animais sacrificados 24 h após a injeção.

Pré-tratamento	Comparações	Valores de p
AP – H (2, 13) = 8,57 p = 0,01	Salina x Imi 0,06	1,00
	Salina x Imi 0,2	0,01**
	Imi 0,06 x Imi 0,2	0,01**
AE – H (2, 11) = 0,05 p = 0,97	Salina x Imi 0,06	1,00
	Salina x Imi 0,2	1,00
	Imi 0,06 x Imi 0,2	0,85

*Kruskal-Wallis, **Teste de Mann-Whitney, ns= não-significante

Tabela 16. Dados estatísticos para as medidas das células DCX+ e Ki-67+ dos animais sem cirurgia e sem tratamento farmacológico.

Marcador celular	Comparações	Valores de p*
DCX+	AP x AE	0,90 (ns)
Ki-67+	AP x AE	0,73 (ns)

*Teste de Mann-Whitney, ns= não-significante