**UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO
DEPARTAMENTO DE FARMACOLOGIA**

Vinicius A. H. Sato

**Substratos neurais envolvidos com o desenvolvimento do
comportamento de desamparo em ratos:
possível envolvimento do NO**

**Ribeirão Preto - SP
2015**

VINICIUS A. H. SATO

**Substratos neurais envolvidos com o desenvolvimento do
comportamento de desamparo em ratos:
possível envolvimento do NO**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Farmacologia da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo, para a obtenção do título de Doutor em Ciências.

Área de Concentração: Farmacologia

Orientador: Profa. Dra. Sâmia Regiane Lourenço Joca

Ribeirão Preto - SP

2015

AUTORIZO A DIVULGAÇÃO TOTAL OU PARCIAL DESTE TRABALHO, POR QUALQUER MEIO CONVENCIONAL OU ELETRÔNICO, PARA FINS DE ESTUDO E PESQUISA, DESDE QUE CITADA A FONTE.

FICHA CATALOGRÁFICA

Sato, Vinicius Antonio Hiroaki

Substratos neurais envolvidos com o desenvolvimento do comportamento de desamparo em ratos: possível envolvimento do NO. Ribeirão Preto, 2015.

185 p. : il. ; 30 cm

Tese de Doutorado, apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto/USP. Área de concentração: Farmacologia.

Orientadora: Joca, Sâmia Regiane Lourenço.

1. Depressão.
2. Óxido nítrico.
3. c-Fos.
4. Desamparo aprendido.
5. imunohistoquímica.

FOLHA DE APROVAÇÃO

Vinicius Antonio Hiroaki Sato

Substratos neurais envolvidos com o desenvolvimento do comportamento de desamparo em ratos: possível envolvimento do NO.

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Farmacologia da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo, como requisito parcial para a obtenção do título de Doutor em Ciências.

Área de Concentração: Farmacologia

Aprovado em: ____ / ____ / ____ .

Banca Examinadora:

Profa. Dra. Sâmia Regiane Lourenço Joca

Instituição: FCFRP-USP.

Assinatura: _____

Prof. Dr. Hélio Zangrossi Júnior

Instituição: FMRP-USP.

Assinatura: _____

Prof. Dr. Norberto Garcia Cairasco

Instituição: FMRP-USP.

Assinatura: _____

Profa. Dra. Silvana Chivegatto

Instituição: ICB-USP.

Assinatura: _____

Prof. Dr. Ricardo Luiz Nunes de Souza

Instituição: FCF-UNESP.

Assinatura: _____

**“I stress that the universe is made mostly of nothing,
that something is the exception.”**

Carl Sagan.

Para Akira e Sadako Tokushima, Hatsue e Hiroji Sato, pelo desejo da vossa presença.

Para Bia, pela parceria, pela amizade, pelo amor.

Para Anne, por todo o potencial que há em ti e por todo o amor que incita em mim.

A vocês, como todo meu sistema nervoso central,

Dedico este trabalho.

AGRADECIMENTOS

À Professora Dra. Sâmia Regiane Lourenço Joca, por ter me aceitado em seu laboratório por todos esses anos, e não ter medido esforços para ajudar na minha formação como pesquisador.

À minha amiga Sâmia, por ter sempre um sorriso sincero, uma palavra amiga e um ombro confortador.

A toda minha família, meus pais, tios e tias, irmãs, cunhado, primos e primas, por terem sempre sido presentes de alguma forma, me apoiando incondicionalmente.

À Helen Bianca Barbarini por ter resgatado em mim algo que acreditava perdido.

A todos os meus amigos, independente da distância ou do tempo, essenciais à juventude de minha alma e sanidade de minha mente.

Às alunas Rafaela Páscoli Camargo e Camila Fiori Pereira, por tudo que aprendi durante nosso convívio, sempre me lembrando das razões de eu querer se professor.

Aos amigos do Laboratório de Psicofarmacologia da FCFRP: Abidemi James Akindele, Aline Lulho Roncalho, Amanda Juliana Sales, Angélica Caroline Romano Suavinha, Ariandra Guerini Sartim, Bianca Mazzaro, Caroline Biojone, Cassiano Ricardo Faria Diniz, Deidiane Elisa Ribeiro, Izaque Maciel, Karina Montezuma, Kennia Moura, Laura Alves Stanquini, Laura Andrea Leon Anhuamán, Maria Augusta Pinto e Silva, Michelle Silva, Michelly Silva Nagai, Murilo Rodrigues, Nina Karpova, Plínio Cabrera Casarotto, Rebeca Cantelmo, Thais de Lucca e Vitor Silva Pereira. É indescritível o quanto o convívio com vocês ajudou na minha formação, como pesquisador e como ser humano.

Aos Professores da banca examinadora por terem aceitado prontamente o nosso convite e pelas contribuições feitas visando a melhoria deste trabalho;

Ao corpo técnico sem o qual este trabalho se tornaria inviável: Flávia Fiacadori Salata Carotta, José Carlos de Aguiar e Eleni Luiza Tamburus Gomes.

Aos secretários José Waldik Ramon, Marlene Rodrigues da Silva, Sônia Maria Stefanelli e Fátima Helena Petean, pelo seu trabalho impecável, mas principalmente, pela acolhida.

Aos funcionários do setor de Farmacologia da FCFRP: Miriam Cristina C. de Melo, Juliana Aparecida Vercesi, Mayara Santos Gomes, Marcella Grando, Aparecida Rosa da Silva.

Às agências de fomento: CAPES, CNPq e FAPESP.

A todos vocês, meu muito obrigado.

RESUMO

Vinicius Antonio Hiroaki Sato. **Substratos neurais envolvidos com o desenvolvimento do comportamento de desamparo em ratos: possível envolvimento do NO.** 2015. Tese (Doutorado) – Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2015.

Recentemente, o óxido nítrico (NO) tem sido relacionado com a depressão. A administração de inibidores da NO sintase (NOS) induz efeitos do tipo antidepressivo em modelos animais e há um aumento da expressão da NOS em estruturas do sistema límbico em indivíduos depressivos e em animais expostos a estresse. Além disso, sabe-se que o estresse causa um aumento da ativação de neurônios localizados em estruturas do sistema límbico e que o tratamento com antidepressivos bem como com inibidor da NOS, diminui essa marcação. Contudo, ainda não se sabe como o sistema nitrérgico dessas estruturas está relacionado com os comportamentos relacionados à depressão. Assim nosso objetivo é testar a hipótese de que o desenvolvimento do desamparo (comportamento relacionado à depressão) em ratos seria causado por um aumento de atividade de neurônios que contém nNOS em estruturas envolvidas com a resposta emocional ao estresse, e que os diferentes tratamentos induzem efeitos do tipo antidepressivo no modelo apresentando através de um efeito final comum de diminuir essa ativação e, portanto, diminuir os níveis de NO. Para isso, ratos foram submetidos ao modelo do desamparo aprendido e tratados com drogas antidepressivas. Após o teste, foi feita a imunohistoquímica com marcação para Fos (Fos-IR; marcador de atividade neuronal) e nNOS (nNOS-IR). O tratamento repetido com desipramina (DES, na dose de 25, mas não na de 12,5 mg/Kg), fluoxetina (FXT, na dose de 15, mas não na de 30 mg/Kg) e imipramina (IMI, 15mg/Kg) induziu efeito do tipo-antidepressivo no teste do desamparo aprendido (LH). O tratamento agudo apenas com imipramina, mas não com FXT ou IMI, induziu o mesmo tipo de efeito. O tratamento com DES, FXT ou IMI também aumentou o número de cruzamentos entre choques no LH, porém não induziu aumento de atividade locomotora no teste do campo aberto. O tratamento repetido com DES diminuiu a Fos-IR na amígdala basolateral (BIAm), amígdala lateral (LAm), córtex pré-frontal medial (mPFC), região CA1 e CA3 do hipocampo dorsal (dHPC) e região CA3 do hipocampo ventral (vHPC). O tratamento agudo com DES induziu um aumento de Fos-IR na amígdala central (CeAm), amígdala medial (MeAm) e CA1 e CA3 do dHPC. O tratamento repetido com FXT diminuiu Fos-IR na BIAm e LAm, enquanto o tratamento agudo aumentou Fos-IR na

CeAm. O tratamento repetido com IMI aumentou nNOS-IR na MeAm e a dupla marcação no núcleo leito da estria terminal (BST); e diminuiu o Fos-IR na região CA1 do dHPC e na região parvocelular do núcleo paraventricular do hipotálamo (pPVN). Por fim, foram encontradas relações positivas entre o número de células Fos-IR e o número de falhas em fugir ou escapar dos choques no LH na BIAm, LAm, CA1 e CA3 do dHPC e CA3 do vHPC; i.e., quanto mais células ativadas nessas estruturas, maior o número de choques que os animais receberam sem conseguir fugir. Os resultados aqui apresentados são, em parte, corroborados pela literatura, mostrando a participação das estruturas analisadas no comportamento do desamparo aprendido e no efeito das drogas antidepressivas. Nesse contexto, acredita-se que o BST funcionaria como um núcleo de processamento da informação vinda do mPFC, HPC e amígdala, enviando projeções para o PVN e regulando o funcionamento do eixo HPA. O trabalho abre caminho para a identificação de subpopulações específicas de neurônios que expressam a nNOS, buscando compreender o papel destas na modulação das respostas comportamentais numa situação de estresse, na busca pela formulação de um cenário cada vez mais completo da participação do sistema nitrérgico dentro do complexo neurocircuito que regula as emoções.

Palavras-chave: Estresse, c-Fos, nNOS, óxido nítrico, imunohistoquímica, desamparo aprendido.

ABSTRACT

Vinicius Antonio Hiroaki Sato. **Neural substrates involved with the helplessness behavior development in rats: possible involvement of nitric oxide.** 2015. Thesis (PhD degree). Ribeirão Preto Medicine School – University of São Paulo, Ribeirão Preto, 2015.

Recently, nitric oxide (NO) has been related with the neurobiology of depression. The NO synthase (NOS) inhibition induces antidepressant-like effects in animal models and there is an increase in the NOS expression in limbic structures of depressed patients or in stress exposed animals. Besides, it is well known that stressful events causes an increase in limbic structures neuronal activation and that antidepressant treatment as well as NOS inhibition attenuates this effect. However, it is still unknown how the limbic nitroergic system is related with depression-related behaviors. Then, the aim of this work is to test the hypothesis that the helplessness behavior development (a depression-related behavior) in rats would be induced by an increased activity of nNOS-containing neurons in structures related with the neurobiology of stress responses. Furthermore, the antidepressant-like effect induced by antidepressants treatment in this model would share a final effect, decreasing the activation of such neurons, and decreasing the levels of NO in these structures. For this aim, male rats were submitted to the learned helplessness model and treated with antidepressants. After the test, immunohistochemistry assay were performed, with double labeling for c-Fos (Fos-IR; neuronal activity marker) and nNOS (nNOS-IR). The repeated treatment with desipramine (DES, 25 mg/kg but not 12,5mg/kg), fluoxetine (FXT, 15 mg/Kg, but not 30 mg/Kg) and imipramina (IMI, 15 mg/KG) induced antidepressant-like effects in the learned helplessness test (LH). The acute treatment with IMI, but not with DES or FXT, induced the same effect. The repeated treatment with DES, FXT or IMI also increased the number of intertrial crossings in the LH, but not the locomotor activity score on the open field score. The repeated treatment with DES decreased the number of Fos-IR into the basolateral amygdala (BLAm), lateral amygdala (Lam), medial prefrontal cortex (mPFC), CA1 and CA3 regions of the dorsal hippocampus (dHPC), and CA3 region of the ventral hippocampus (vHPC). The acute treatment with DES increased the Fos-IR into the central amygdala (CeAm), medial amygdala (MeAm), and CA1 and CA3 regions of the dHPC. The repeated treatment with FXT decreases the number of Fos-IR into the BLAm and Lam, while the acute treatment increases the Fos-IR into the CeAm. The repeated treatment with IMI increased the nNOS-IR into the MeAm and the double-

labeled cells into the bed nucleus of stria terminalis (BST); and decreased the Fos-IR into the CA1 region of the dHPC and into the parvocellular region of the paraventricular nucleus of the hypothalamus. Finally, positive correlations between the number of Fos-IR and the number of failures in escaping or avoiding the foot shocks on the LH were found into the BIAm, Lam, CA1 and CA3 of the dHPC, and CA3 of the vHPC, i.e., with more activated cells into these structures mentioned, more foot shocks the rats received. These results are (partially) corroborated with previous scientific papers, showing the analyzed structures participation in the learned helplessness behavior as well as in the antidepressant effect of antidepressant administration. Within this context, the BST would work as a relay center, processing the information coming from the mPFC, HPC and amygdaloid nuclei, and sending the output to the PVN, modulating the HPA axis. This work open some questions about the identification of specific nNOS-containing neuronal subpopulations, aiming to clarify their role in the stress response, and searching for the formulation of a more complete scenario of the nitroergic system participation in this complex emotion-regulating neurocircuit.

Key words: stress, c-Fos, nNOS, nitric oxide, immunohistochemistry, learned helplessness.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** Diagrama mostrando as regiões analisadas bem como as referências de localização das mesmas. BIAm – Amígdala basolateral; BST – Núcleo leito da estria terminal; CA1 – região *cornus ammonis* do hipocampo; CA3 – região *cornus ammonis* do hipocampo; CeAm – Amígdala central; DG – giro denteado do hipocampo; IL – porção infra-límbica do córtex pré-frontal medial; LAm – amígdala lateral; MeAm – Amígdala medial; mPVN – porção magnocelular do núcleo paraventricular do hipotálamo; PL – porção pré-límbica do córtex pré-frontal medial; pPVN – porção parvocelular do núcleo paraventricular do hipotálamo. (Adaptado de Paxinos e Watson, 1997).51
- Figura 2.** Efeitos do tratamento repetido com desipramina sobre o comportamento de ratos submetidos ao LH. Efeito do tratamento repetido (esquerda) ou agudo (direita) com desipramina sobre o número de falhas em escapar ou se esquivar dos choques nas patas (linha superior) ou sobre latência para a fuga ou esquivas (linha inferior). Dados apresentados como média $\pm$ EPM. ** = $p < 0.01$ e *** = $p < 0.001$53
- Figura 3.** Efeitos do tratamento repetido com fluoxetina sobre o comportamento de ratos submetidos ao LH. Efeito do tratamento repetido (esquerda) ou agudo (direita) com desipramina sobre o número de falhas em escapar ou se esquivar dos choques nas patas (linha superior) ou sobre latência para a fuga ou esquivas (linha inferior). Dados apresentados como média $\pm$ EPM. * = $p < 0.05$, ** = $p < 0.01$ e *** = $p < 0.001$54
- Figura 4.** Efeitos do tratamento repetido com desipramina (esquerda) ou com fluoxetina (direita) sobre o comportamento de ratos submetidos ao teste do campo aberto. Dados apresentados como média $\pm$ EPM. * = $p < 0.05$. DES=grupo tratado com desipramina; NS=grupo que não recebeu choque; FLX=grupo tratado com fluoxetina; PT=grupo que passou pelo pré-teste (choques); Veíc=grupo tratado com veículo.55
- Figura 5.** Efeito do tratamento com desipramina (primeira linha), fluoxetina (segunda linha) ou imipramina (terceira linha) sobre a Fos-IR, nNOS-IR ou dupla-IR na região CA1 do hipocampo dorsal. Dados expressos em média $\pm$ SEM da porcentagem em relação à média apresentada pelo grupo Naïve. * = $p < 0,05$61
- Figura 6.** Relação entre o número de células Fos-IR, nNOS-IR ou dupla-IR na região CA1 do hipocampo dorsal e o número de falhas em escapar ou fugir dos choques dos animais no teste do LH. A linha representa regressão linear dos dados apresentados.61
- Figura 7.** Fotomicrografias representativas de secções coronais (40 μ m) da região dHPC-CA1 de um animal Naïve, de um animal tratado com PTZ, e de animais tratados com DES, FXT ou IMI e submetidos ao LH. Os cortes foram processados para imunohistoquímica para a detecção da proteína Fos e nNOS. Células Fos-IR em preto e nNOS-IR em marrom.62

Figura 8. Efeito do tratamento com desipramina (primeira linha), fluoxetina (segunda linha) ou imipramina (terceira linha) sobre a Fos-IR, nNOS-IR ou dupla-IR na região CA1 do hipocampo ventral. Dados expressos em média $\pm$ SEM da porcentagem em relação à média apresentada pelo grupo Naïve. * = $p < 0,01$64

Figura 9. Relação entre o número de células Fos-IR, nNOS-IR ou dupla-IR na região CA1 do hipocampo ventral e o número de falhas em escapar ou fugir dos choques dos animais no teste do LH. A linha representa regressão linear dos dados apresentados.64

Figura 10. Fotomicrografias representativas de secções coronais (40 μ m) da região vHPC-CA1 de um animal Naïve, de um animal tratado com PTZ, e de animais tratados com DES, FXT ou IMI e submetidos ao LH. Os cortes foram processados para imunohistoquímica para a detecção da proteína Fos e nNOS. Células Fos-IR em preto e nNOS-IR em marrom.65

Figura 11. Efeito do tratamento com desipramina (primeira linha), fluoxetina (segunda linha) ou imipramina (terceira linha) sobre a Fos-IR, nNOS-IR ou dupla-IR na região CA3 do hipocampo dorsal. Dados expressos em média $\pm$ SEM da porcentagem em relação à média apresentada pelo grupo Naïve. * = $p < 0,05$; ** = $p < 0,01$67

Figura 12. Relação entre o número de células Fos-IR, nNOS-IR ou dupla-IR na região CA3 do hipocampo dorsal e o número de falhas em escapar ou fugir dos choques dos animais no teste do LH. A linha representa regressão linear dos dados apresentados.67

Figura 13. Fotomicrografias representativas de secções coronais (40 μ m) da região dHPC-CA3 de um animal Naïve, de um animal tratado com PTZ, e de animais tratados com DES, FXT ou IMI e submetidos ao LH. Os cortes foram processados para imunohistoquímica para a detecção da proteína Fos e nNOS. Células Fos-IR em preto e nNOS-IR em marrom.68

Figura 14. Efeito do tratamento com desipramina (primeira linha), fluoxetina (segunda linha) ou imipramina (terceira linha) sobre a Fos-IR, nNOS-IR ou dupla-IR na região CA3 do hipocampo ventral. Dados expressos em média $\pm$ SEM da porcentagem em relação à média apresentada pelo grupo Naïve. * = $p < 0,05$70

Figura 15. Relação entre o número de células Fos-IR, nNOS-IR ou dupla-IR na região CA3 do hipocampo ventral e o número de falhas em escapar ou fugir dos choques dos animais no teste do LH. A linha representa regressão linear dos dados apresentados.70

Figura 16. Fotomicrografias representativas de secções coronais (40 μ m) da região vHPC-CA3 de um animal Naïve, de um animal tratado com PTZ, e de animais tratados com DES, FXT ou IMI e submetidos ao LH. Os cortes foram processados para imunohistoquímica para a detecção da proteína Fos e nNOS. Células Fos-IR em preto e nNOS-IR em marrom.71

Figura 17. Efeito do tratamento com desipramina (primeira linha), fluoxetina (segunda linha) ou imipramina (terceira linha) sobre a Fos-IR, nNOS-IR ou dupla-IR na região DG do hipocampo dorsal. Dados expressos em média $\pm$ SEM da porcentagem em relação à média apresentada pelo grupo Naïve.73

Figura 18. Relação entre o número de células Fos-IR, nNOS-IR ou dupla-IR na região DG do hipocampo dorsal e o número de falhas em escapar ou fugir dos choques dos animais no teste do LH. A linha representa regressão linear dos dados apresentados.	73
Figura 19. Fotomicrografias representativas de secções coronais (40µm) da região dHPC-DG de um animal Naïve, de um animal tratado com PTZ, e de animais tratados com DES, FXT ou IMI e submetidos ao LH. Os cortes foram processados para imunohistoquímica para a detecção da proteína Fos e nNOS. Células Fos-IR em preto e nNOS-IR em marrom.	74
Figura 20. Efeito do tratamento com desipramina (primeira linha), fluoxetina (segunda linha) ou imipramina (terceira linha) sobre a Fos-IR, nNOS-IR ou dupla-IR na região DG do hipocampo ventral. Dados expressos em média ± SEM da porcentagem em relação à média apresentada pelo grupo Naïve.	76
Figura 21. Relação entre o número de células Fos-IR, nNOS-IR ou dupla-IR na região DG do hipocampo ventral e o número de falhas em escapar ou fugir dos choques dos animais no teste do LH. A linha representa regressão linear dos dados apresentados.	76
Figura 22. Fotomicrografias representativas de secções coronais (40µm) da região vHPC-DG de um animal Naïve, de um animal tratado com PTZ, e de animais tratados com DES, FXT ou IMI e submetidos ao LH. Os cortes foram processados para imunohistoquímica para a detecção da proteína Fos e nNOS. Células Fos-IR em preto e nNOS-IR em marrom.	77
Figura 23. Efeito do tratamento com desipramina (primeira linha), fluoxetina (segunda linha) ou imipramina (terceira linha) sobre a Fos-IR ou nNOS-IR na região basolateral da amígdala. Dados expressos em média ± SEM da porcentagem em relação à média apresentada pelo grupo Naïve. * = p<0,05.	87
Figura 24. Relação entre o número de células Fos-IR, nNOS-IR ou dupla-IR na região basolateral da amígdala e o número de falhas em escapar ou fugir dos choques dos animais no teste do LH. A linha representa regressão linear dos dados apresentados.	88
Figura 25. Fotomicrografias representativas de secções coronais (40µm) da região BIAm de um animal Naïve, de um animal tratado com PTZ, e de animais tratados com DES, FXT ou IMI e submetidos ao LH. Os cortes foram processados para imunohistoquímica para a detecção da proteína Fos e nNOS. Células Fos-IR em preto e nNOS-IR em marrom.	89
Figura 26. Efeito do tratamento com desipramina (primeira linha), fluoxetina (segunda linha) ou imipramina (terceira linha) sobre a Fos-IR ou nNOS-IR na região central da amígdala. Dados expressos em média ± SEM da porcentagem em relação à média apresentada pelo grupo Naïve. *** = p<0,001.	91
Figura 27. Relação entre o número de células Fos-IR, nNOS-IR ou dupla-IR na região central da amígdala e o número de falhas em escapar ou fugir dos choques dos animais no teste do LH. A linha representa regressão linear dos dados apresentados.	92

Figura 28. Fotomicrografias representativas de secções coronais (40µm) da região CeAm de um animal Naïve, de um animal tratado com PTZ, e de animais tratados com DES, FXT ou IMI e submetidos ao LH. Os cortes foram processados para imunohistoquímica para a detecção da proteína Fos e nNOS. Células Fos-IR em preto e nNOS-IR em marrom.	93
Figura 29. Efeito do tratamento com desipramina (primeira linha), fluoxetina (segunda linha) ou imipramina (terceira linha) sobre a Fos-IR ou nNOS-IR na região lateral da amígdala. Dados expressos em média ± SEM da porcentagem em relação à média apresentada pelo grupo Naïve.	95
Figura 30. Relação entre o número de células Fos-IR, nNOS-IR ou dupla-IR na região lateral da amígdala e o número de falhas em escapar ou fugir dos choques dos animais no teste do LH. A linha representa regressão linear dos dados apresentados.	96
Figura 31. Fotomicrografias representativas de secções coronais (40µm) da região LAm de um animal Naïve, de um animal tratado com PTZ, e de animais tratados com DES, FXT ou IMI e submetidos ao LH. Os cortes foram processados para imunohistoquímica para a detecção da proteína Fos e nNOS. Células Fos-IR em preto e nNOS-IR em marrom.	97
Figura 32. Efeito do tratamento com desipramina (primeira linha), fluoxetina (segunda linha) ou imipramina (terceira linha) sobre a Fos-IR ou nNOS-IR na região medial da amígdala. Dados expressos em média ± SEM da porcentagem em relação à média apresentada pelo grupo Naïve. * = p<0,05.	99
Figura 33. Relação entre o número de células Fos-IR, nNOS-IR ou dupla-IR na região medial da amígdala e o número de falhas em escapar ou fugir dos choques dos animais no teste do LH. A linha representa regressão linear dos dados apresentados.	100
Figura 34. Fotomicrografias representativas de secções coronais (40µm) da região MeAm de um animal Naïve, de um animal tratado com PTZ, e de animais tratados com DES, FXT ou IMI e submetidos ao LH. Os cortes foram processados para imunohistoquímica para a detecção da proteína Fos e nNOS. Células Fos-IR em preto e nNOS-IR em marrom.	101
Figura 35. Efeito do tratamento com desipramina (primeira linha), fluoxetina (segunda linha) ou imipramina (terceira linha) sobre a Fos-IR ou nNOS-IR no córtex pré-frontal medial infra-límbico. Dados expressos em média ± SEM da porcentagem em relação à média apresentada pelo grupo Naïve.	109
Figura 36. Relação entre o número de células Fos-IR, nNOS-IR ou dupla-IR na região infra-límbica do córtex pré-frontal medial e o número de falhas em escapar ou fugir dos choques dos animais no teste do LH. A linha representa regressão linear dos dados apresentados.	110
Figura 37. Fotomicrografias representativas de secções coronais (40µm) da região IL do mPFC de um animal Naïve, de um animal tratado com PTZ, e de animais tratados com DES, FXT ou IMI e submetidos ao LH. Os cortes foram processados para imunohistoquímica para a detecção da proteína Fos e nNOS. Células Fos-IR em preto e nNOS-IR em marrom.	111

Figura 38. Efeito do tratamento com desipramina (primeira linha), fluoxetina (segunda linha) ou imipramina (terceira linha) sobre a Fos-IR ou nNOS-IR no córtex pré-frontal medial pré-límbico. Dados expressos em média $\pm$ SEM da porcentagem em relação à média apresentada pelo grupo Naïve.	113
Figura 39. Relação entre o número de células Fos-IR, nNOS-IR ou dupla-IR na região pré-límbica do córtex pré-frontal medial e o número de falhas em escapar ou fugir dos choques dos animais no teste do LH. A linha representa regressão linear dos dados apresentados.	114
Figura 40. Fotomicrografias representativas de secções coronais (40 μ m) da região PL do mPFC de um animal Naïve, de um animal tratado com PTZ, e de animais tratados com DES, FXT ou IMI e submetidos ao LH. Os cortes foram processados para imunohistoquímica para a detecção da proteína Fos e nNOS. Células Fos-IR em preto e nNOS-IR em marrom.	115
Figura 41. Efeito do tratamento com desipramina (primeira linha), fluoxetina (segunda linha) ou imipramina (terceira linha) sobre a Fos-IR, nNOS-IR ou dupla-IR no núcleo leito da estria terminal. Dados expressos em média $\pm$ SEM da porcentagem em relação à média apresentada pelo grupo Naïve. ** = $p < 0,01$	124
Figura 42. Relação entre o número de células Fos-IR, nNOS-IR ou dupla-IR no núcleo leito da estria terminal e o número de falhas em escapar ou fugir dos choques dos animais no teste do LH. A linha representa regressão linear dos dados apresentados.	125
Figura 43. Fotomicrografias representativas de secções coronais (40 μ m) da região BST de um animal Naïve, de um animal tratado com PTZ, e de animais tratados com DES, FXT ou IMI e submetidos ao LH. Os cortes foram processados para imunohistoquímica para a detecção da proteína Fos e nNOS. Células Fos-IR em preto e nNOS-IR em marrom.	126
Figura 44. Efeito do tratamento com desipramina (primeira linha), fluoxetina (segunda linha) ou imipramina (terceira linha) sobre a Fos-IR, nNOS-IR ou dupla-IR no núcleo paraventricular do hipotálamo, porção magnocelular. Dados expressos em média $\pm$ SEM da porcentagem em relação à média apresentada pelo grupo Naïve.	131
Figura 45. Relação entre o número de células Fos-IR, nNOS-IR ou dupla-IR na região magnocelular do PVN e o número de falhas em escapar ou fugir dos choques dos animais no teste do LH. A linha representa regressão linear dos dados apresentados.	132
Figura 46. Fotomicrografias representativas de secções coronais (40 μ m) da região mPVN de um animal Naïve, de um animal tratado com PTZ, e de animais tratados com DES, FXT ou IMI e submetidos ao LH. Os cortes foram processados para imunohistoquímica para a detecção da proteína Fos e nNOS. Células Fos-IR em preto e nNOS-IR em marrom.	133
Figura 47. Efeito do tratamento com desipramina (primeira linha), fluoxetina (segunda linha) ou imipramina (terceira linha) sobre a Fos-IR, nNOS-IR ou dupla-IR no núcleo paraventricular do hipotálamo, porção parvocelular. Dados expressos em média $\pm$ SEM da porcentagem em relação à média apresentada pelo grupo Naïve. * = $p < 0,05$	135

Figura 48. Relação entre o número de células Fos-IR, nNOS-IR ou dupla-IR na região parvocelular do PVN e o número de falhas em escapar ou fugir dos choques dos animais no teste do LH. A linha representa regressão linear dos dados apresentados. 135

Figura 49. Fotomicrografias representativas de secções coronais (40µm) da região pPVN de um animal Naïve, de um animal tratado com PTZ, e de animais tratados com DES, FXT ou IMI e submetidos ao LH. Os cortes foram processados para imunohistoquímica para a detecção da proteína Fos e nNOS. Células Fos-IR em preto e nNOS-IR em marrom. 136

LISTA DE ABREVIATURAS

5-HT:	Serotonina.
ABC:	Complexo avidina biotina.
Am:	Amígdala
ANOVA:	Análise de variância.
BLAm:	Núcleo basolateral da amígdala.
BSA:	Albumina de soro bovino.
BST:	Núcleo leito da estria terminal.
CA1:	Cornus Ammonis 1, região do hipocampo
CA3:	Cornus Ammonis 3, região do hipocampo
CeAm:	núcleo central da amígdala.
CEUA:	Comitê de Ética no Uso de Animais.
CID-10:	Classificação estatística internacional de doenças e problemas relacionados à saúde da Organização Mundial da Saúde, décima versão.
DAB: 3'3'3:	diaminobenzidina.
DES:	Desipramina
DG:	Giro denteado do hipocampo.
dHPC:	Hipocampo dorsal.
Dupla-IR:	Dupla marcação de imunoreatividade para as proteínas c-Fos e nNOS.
eNOS:	Isoforma endotelial da enzima óxido nítrico sintase.
EPM:	Erro padrão da média.
FCFRP-USP:	Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo
FLX:	Fluoxetina
FMRP-USP:	Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo.
Fos-IR:	Imunorreatividade para proteína c-Fos.
FST:	Teste do nado forçado (<i>Forced Swimming Test</i>).

HPA:	Hipotálamo – pituitária – adrenal.
HPC:	Hipocampo.
IEG:	Genes de expressão imediata precoce (<i>Immediate-early Genes</i>)
i.p.:	Intra peritoneal.
ILmPF:	Porção infralímbica do córtex pré-frontal medial.
IMI:	Imipramina
iNOS:	Isoforma induzível da enzima óxido nítrico sintase.
LAm:	Núcleo lateral da amígdala.
LH:	Desamparo aprendido (<i>Learned Helplessness</i>).
MeAm:	Núcleo medial da amígdala.
mPFC:	Córtex pré-frontal medial.
mPVN:	Porção magnocelular do núcleo paraventricular do hipotálamo.
nNOS:	Isoforma neuronal da enzima óxido nítrico sintase.
nNOS-IR:	Imunoreatividade para proteína nNOS.
NO:	Óxido nítrico.
OFT:	Teste do campo aberto (<i>Open Field Test</i>).
OMS:	Organização Mundial da Saúde.
PBS:	Tampão fosfato salina (<i>Phosphate Buffer Saline</i>).
PFA:	Paraformaldeído.
PFC:	Córtex pré-frontal.
PLmPFC:	Porção prélímbica do córtex pré-frontal medial.
pPVN:	Porção parvocelular do núcleo paraventricular do hipotálamo.
PTZ:	pentilenotetrazol
PVN:	Núcleo paraventricular do hipotálamo.
SNC:	Sistema Nervoso Central.
USP:	Universidade de São Paulo.
vHPC:	Hipocampo ventral.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	21
1.1 Depressão e estresse	21
1.2 Modelos animais utilizados para o estudo da depressão e o fenômeno do desamparo aprendido.....	27
1.3 Teorias sobre a etiologia da depressão	32
1.4 O Papel do óxido nítrico na neurobiologia da depressão	34
1.5 O c-fos como marcador de ativação neuronal	39
 2 OBJETIVOS	 42
2.1 Objetivo geral	42
2.2 Objetivos específicos	42
 3 MATERIAL E MÉTODOS	 43
3.1 Animais	43
3.2 Drogas.....	43
3.3 Procedimentos experimentais	44
3.3.1 Teste do desamparo aprendido.....	44
3.3.2 Teste do campo aberto	44
3.3.3 Imunohistoquímica para marcação para Fos e para a dupla marcação Fos/nNOS	45
3.4 Desenho experimental	47
3.5 Análise dos resultados	49
 4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	 51
4.1 Resultados dos testes comportamentais.....	52
4.1.1 Teste do desamparo aprendido.....	52
4.1.2 Teste do campo aberto	55
4.2 Discussão dos testes comportamentais.....	56
4.3 Resultados e discussão dos ensaios de imunohistoquímica.....	59
4.3.1 Hipocampo	60
4.3.1.1 Resultados.....	60
4.3.1.2 Discussão	78
4.3.2 Amígdala	86
4.3.2.1 Resultados.....	86

4.3.2.2 Discussão	102
4.3.3 Córtex pré-frontal	108
4.3.3.1 Resultados.....	108
4.3.3.2 Discussão	116
4.3.4 Núcleo leito da estria terminal.....	123
4.3.4.1 Resultados.....	123
4.3.4.2 Discussão	127
4.3.5 Núcleo paraventricular do hipotálamo	130
4.3.5.1 Resultados.....	130
4.3.5.2 Discussão	137
 5 DISCUSSÃO GERAL	 142
 6 CONCLUSÕES	 144
 7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	 145
 ANEXOS	 174

1 INTRODUÇÃO

1.1 Depressão e estresse

Os transtornos afetivos são classificados de acordo com a classificação estatística internacional de doenças e problemas relacionados à saúde (CID, hoje na sua décima versão – CID-10) como aqueles onde a perturbação fundamental é uma alteração do humor ou do afeto, seja para mais (elação) ou para menos (depressão), independente de haver ou não uma ansiedade associada. Esses transtornos passam a interferir significativamente no desempenho das atividades cotidianas do indivíduo e a maioria dos outros sintomas é secundária ao - ou podem ser entendidos no - contexto da alteração do humor e na atividade alterada. Dentre esses transtornos, se incluem os episódios maníacos, o transtorno afetivo bipolar e os transtornos depressivos, onde temos a depressão maior, entre outros como a ciclotimia e a distímia (OMS, 2015).

Nos episódios típicos de depressão, o indivíduo sofre de humor deprimido, redução de energia e diminuição das atividades normais. A capacidade de se divertir, interesse e concentração encontra-se reduzida, e cansaço acentuado após mínimos esforços é comum. Sono e apetite também estão desregulados para mais ou para menos. Autoestima e autoconfiança são quase sempre reduzidas e, mesmo na forma mais leve, pensamentos de culpa e inutilidade são frequentemente presentes. O humor deprimido varia pouco ao longo dos dias, não respondendo às circunstâncias normais de flutuação do humor. Além disso, o humor deprimido pode ser acompanhado por sintomas como falta de interesse e falta de sentimentos prazerosos, despertar muito mais cedo do que o usual, com depressão mais acentuada pela manhã, retardo

psicomotor, agitação, e perda de libido (OMS, 2015). Devido a esses sinais e sintomas, é certo que esses indivíduos que sofrem com a depressão podem ter um prejuízo significativo nas suas atividades diárias normais e possuem um risco aumentado de mortalidade direta (suicídio) e indireta (comorbidades).

Na atualização de 2004 do estudo da Organização Mundial da Saúde (OMS) chamado de *Global Burden of Disease* (algo como o peso global das doenças ao redor do mundo), um estudo estatístico e epidemiológico das principais causas de mortalidade e morbidade no mundo, os transtornos psiquiátricos aparecem como a décima causa de mortalidade do mundo (OMS, 2004). Além disso, neste estudo é usado um índice chamado de DALYs (do inglês *Disability-adjusted Life Years*, ou anos de vida ajustados à debilidade), que reflete uma medida geral da perda de saúde por determinada doença ou condição clínica. Nesse índice é considerado o tempo em anos perdidos por morte prematura causada pela doença bem como o tempo de vida saudável perdida devido à condição clínica da pessoa, isto é, o tempo que a pessoa, por estar doente ou em condição clínica debilitante, não pode ser considerada produtiva socialmente (OMS, 2004). Na lista desse indicador, a depressão encontra-se em terceiro lugar como a doença mais debilitante no mundo, ficando atrás apenas de doenças diarreicas e infecções do trato respiratório inferior, e afetando principalmente países subdesenvolvidos. A estimativa da OMS é que, por volta de 2030, a depressão alcance os maiores níveis de DALYs, tornando-se a primeira causa mundial de debilidade (OMS, 2004). Esses dados expressam a triste realidade daqueles que sofrem com a depressão e outros transtornos psiquiátricos: conviver com a doença por tempo prolongado, vivendo vários anos em debilidade decorrente do transtorno e de condições clínicas associadas.

Apesar do caráter contemporâneo frequentemente associado à depressão, trata-se de um quadro clínico há muito tempo reconhecido nos relatos médicos de diversos povos antigos. No entanto, foi apenas na metade do século XX com a descoberta do mecanismo de ação dos primeiros antidepressivos utilizados na clínica é que surgiram as primeiras teorias biológicas sobre a etiologia da depressão (ver seção 1.4). Mesmo hoje, após mais de cinquenta anos, não houve grandes progressos clínicos na descoberta de novas drogas com melhor eficácia em relação à depressão maior (Blier, 2010, Artigas, 2013). Cerca de 60% dos pacientes não respondem de maneira satisfatória ao tratamento com antidepressivos e cerca de 30% não responde de maneira alguma (Crisafulli et al., 2011). A falta de informações a respeito da neurobiologia da depressão pode ser colocada como uma das causas do não sucesso no desenvolvimento de fármacos mais eficazes para o tratamento da depressão, o que faz com que os estudos a respeito da sua neurobiologia sejam essenciais, na busca de um entendimento melhor sobre as substâncias e estruturas ou circuitos neurais envolvidos (e de que forma estariam envolvidos) no desenvolvimento deste famigerado transtorno.

Sabe-se que a depressão possui um componente genético e um componente ambiental (Sullivan et al., 2000). Quanto ao seu componente genético, a complexidade dos transtornos mentais de uma forma geral torna bastante difícil a relação de determinado transtorno com um gene específico (Nestler et al., 2002, Holmans et al., 2007). Apesar de algum ceticismo por parte da comunidade científica quanto à contribuição genética na depressão (Rose, 1998, Fava and Kendler, 2000), estudos mostram ao longo dos últimos anos, uma possível relação entre a ocorrência da depressão e indivíduos portadores de determinados genótipos (Lee et al., 2013, Ripke et al., 2013). Há evidências, por exemplo, de que um polimorfismo no

gene que codifica o transportador da serotonina (5-HTT) seria capaz de aumentar a sensibilidade de indivíduos a eventos aversivos e, assim, predispor indivíduos ao desenvolvimento de transtornos afetivos (Caspi et al., 2003). Contudo, esse polimorfismo não seria suficiente para causar a depressão, tendo apenas um caráter modulador sobre o fator ambiental. Efeitos semelhantes já foram descritos para outros traços genéticos como a quantidade de DNA mitocondrial e comprimento de telômeros (Cai et al., 2015), modificações em canais de cálcio (Consortium, 2013), e genes relacionados à neurotransmissão monoaminérgica. No entanto, nenhum gene foi até agora reconhecido como um fator determinante para a ocorrência da doença (Nestler et al., 2002; Holmans et al., 2007).

De consenso geral é a importância do fator ambiental para a etiologia da depressão, colocando o estresse como o principal fator capaz de predispor ao desenvolvimento de transtornos depressivos (Post, 1992, Kessler, 1997, Kendler et al., 2001, Nestler et al., 2002). Em cerca de 60% dos casos, os episódios depressivos são precedidos pela ocorrência de fatores estressantes (Post, 1992). Por isso, a depressão é frequentemente relacionada como um transtorno relacionado ao estresse.

A palavra estresse tem sua origem etimológica bastante controversa. Alguns autores remetem ao latim *stringere* (que pode ser traduzido como “apertar”)(Cox, 1978). Até meados de 1940, praticamente não havia registros da palavra estresse fora do meio da física e engenharias, onde a palavra se refere à resistência interna de uma força aplicada a determinada área de um material (American Heritage Dictionary of the English Language, 2011).

Em 1936, Hans Selye, um pesquisador austríaco, publicou um artigo que seria considerado nos anos seguintes como um divisor de águas na área. No

referido artigo, Selye relatava aquilo que chamou de síndrome de adaptação geral, um conjunto de respostas que observou após a administração dos mais diversos desafios, químicos, biológicos ou físicos, ao organismo de ratos. Essa resposta era constituída principalmente pela hipertrofia das glândulas adrenais, atrofia de órgãos linfoides e aparecimento de ulcerações gástricas (Selye, 1936, Mason, 1975). Apesar do termo “estresse” não ser citado no artigo (segundo o próprio Selye, devido às divergências encontradas na época quanto ao uso do termo, Selye, 1956), e de Selye não ter sido o primeiro a usar o termo em contexto biológico (Selye, 1956, Mason, 1975); esse artigo foi o responsável pela expressiva popularização do verbete nesse contexto.

Ao longo dos anos, a conceituação do termo estresse tem sido alvo de extensas discussões na literatura e a maioria dos autores prefere não definir estritamente o termo (Selye, 1973, Hinkle, 1974, Martin, 1984, Hinkle, 1987). Segundo a visão de Selye, estresse pode ser definido como uma resposta inespecífica do organismo a qualquer estímulo exercido sobre o mesmo (Selye, 1973, Szabo, 1998), ele nomeia os agentes causadores de estresse como estressores, sendo que estes podem ser tanto positivos quanto negativos (Selye, 1973, Szabo, 1998).

Essa resposta inespecífica de origem neuroendócrina consiste na ativação do eixo hipotálamo-pituitária-adrenal (eixo HPA), onde primariamente, acontece a liberação do fator liberador de corticotrofina (CRF) que por sua vez age sobre a hipófise liberando o hormônio adrenocorticotrófico (ACTH). Esse hormônio age sobre o córtex das glândulas adrenais, causando a liberação de glicocorticoides. Essa resposta afeta, virtualmente, todos os sistemas do organismo. A ativação do eixo HPA inicia toda uma preparação do organismo para desafios fisiológicos e

ambientais, e possui um papel adaptativo importante, assim como Selye propôs em seu artigo inicial de 1936. Além disso, os glicocorticoides também agem em determinados sistemas cerebrais, facilitando a consolidação de memórias emocionais. Esse sistema, portanto, age preparando o organismo para um desempenho ótimo frente ao estressor e também a eventos subsequentes.

O eixo HPA pode ser ativado tanto por fatores internos (por exemplo, por alterações na homeostase) quanto por fatores externos (estressores) e possui mecanismos de regulação bastante complexos e ainda não totalmente compreendidos. Primeiramente, o principal *mecanismo de retroalimentação negativa* é realizado pelos corticosteroides que agem em receptores específicos em vários níveis dentro do eixo, por exemplo, inibindo diretamente a secreção de ACTH ou CRF. Além desse, há também mecanismos de regulação que seriam um pouco mais complexos em diversas estruturas cerebrais sensíveis à concentração de glicocorticoides sistêmica.

Dentre as estruturas responsáveis pelo controle do eixo HPA, podemos destacar o hipocampo, o córtex pré-frontal medial e a amígdala como algumas das mais estudadas. Isso talvez se explique devido à conhecida participação dessas estruturas límbicas na mediação de comportamentos defensivos e também na neurobiologia de transtornos psiquiátricos onde o eixo HPA encontra-se alterado, como na depressão. Essas três estruturas possuem receptores para corticosteroides e parecem de alguma forma ser responsáveis pela regulação límbica do eixo HPA, seja de forma a ativar ou inibir o eixo.

Considerando tanto a importância isolada dessas estruturas para a neurobiologia de transtornos relacionados ao estresse, como seu papel na regulação do eixo HPA, a investigação de todo o neurocircuito torna-se bastante interessante.

1.2 Modelos animais utilizados para o estudo da depressão e o fenômeno do desamparo aprendido

Segundo van der Staay (van der Staay, 2006), “um modelo animal com relevância clínica e/ou biológica em neurociência comportamental é um organismo vivo usado para estudar as relações cérebro-comportamento em condições controladas, com o objetivo de conseguir informações sobre e permitir predições a respeito dessas relações em humanos e/ou outras espécies que não a estudada ou na mesma espécie, mas sobre condições diferentes das quais o estudo foi realizado”.

O uso de animais não humanos para investigar as relações entre o cérebro e o comportamento é baseado primariamente na teoria da evolução. Charles Darwin lançou aquilo que seria o fundamento inicial desta proposta no seu livro “A expressão das emoções nos homens e animais” (Darwin, 1872), onde propõe que os aspectos fundamentais do comportamento humano são compartilhados com outros animais.

Os modelos animais em psiquiatria biológica são bastante utilizados nos dias de hoje, devido à necessidade de se estudar aspectos etiológicos dos transtornos psiquiátricos de uma forma geral bem como pela dificuldade de se estudar determinados fenômenos ou características fisiopatológicas clinicamente, principalmente dificuldades éticas.

Os primeiros modelos animais utilizados para estudo de comportamentos e fenômenos relacionados aos transtornos depressivos surgiram contemporaneamente aos primeiros antidepressivos. Primeiramente é necessário salientar que é muito difícil observar objetivamente estados emocionais como felicidade ou tristeza, o que leva a

comparável dificuldade de se obter um modelo animal de depressão a termo. Segundo McKinney e Bunney (1969), há cinco características obrigatórias para que um modelo seja considerado como modelo animal de depressão: analogia dos sintomas induzidos no modelo com aqueles encontrados na depressão humana, conter mudanças comportamentais observáveis que possam ser avaliadas objetivamente, observadores independentes devem concordar com os critérios objetivos para que se retire as conclusões a respeito do estado subjetivo do animal, os tratamentos efetivos para depressão clínica também devem reverter o estado depressivo do animal, e, o sistema deve ser reprodutível por outros investigadores. Basicamente essas premissas não se alteraram de forma significativa ao longo do tempo (Willner, 1984, 1990, Willner and Mitchell, 2002, Urani et al., 2005, McArthur and Borsini, 2006, Cryan and Slattery, 2007, Duman, 2010, Yan et al., 2010).

Devido à supracitada relação entre estresse e a depressão (Seção 1.1.), muito modelos animais utilizados para estudo da depressão utilizam algum tipo (ou mais de um tipo) de estresse para induzir estados relacionados com a depressão. Sendo a discussão sobre o estresse um dos pontos focados neste trabalho, dar-se-á atenção apenas aos modelos que o utilizam como fator principal desencadeador de um comportamento ou estado tipo-depressivo.

Diversos são os tipos de agentes estressantes ou os eventos aversivos utilizados na literatura como indutores de comportamentos relacionados à depressão (p. ex. a imobilidade no teste do nado forçado e no teste da suspensão pela cauda) ou estados mais complexos relacionados à depressão (como os induzidos pelos choques inescapáveis nos testes do desamparo aprendido ou pela exposição repetida a diversos tipos de estressores diferentes no modelo do estresse crônico variado).

O modelo animal escolhido para o presente trabalho foi o desamparo aprendido.

O fenômeno do desamparo aprendido foi descoberto serendipitadamente na década de 1960 no laboratório do Prof. Richard Solomon, durante estudos sobre comportamento de esquiva. Nesse laboratório os estudos focavam a 'teoria dos dois fatores', que sugere que o comportamento de esquiva seria decorrente de dois processos de aprendizagem separados e potencialmente independentes: Respondente e operante. Bruce Overmier e Russel Leaf, observaram um comportamento de não-aprendizado de esquiva em animais que já haviam sido submetidos a uma sessão de choques inescapáveis (Overmier and Leaf, 1965). Posteriormente, foi mostrado que animais que não haviam sido submetidos à sessão de choques inescapáveis, conseguiam aprender o comportamento de esquiva normalmente (Overmier and Seligman, 1967). Em seguida, foi verificado que esse comportamento, nomeado na época de efeito de interferência, acontecia apenas se os cães eram submetidos a choques inescapáveis na primeira sessão (Seligman and Maier, 1967). O fenômeno de efeito de interferência, logo passou a ser chamado de *learned helplessness*, ou desamparo aprendido, nome pelo qual ficou conhecido.

Martin Seligman e Stephen Maier continuaram levando o estudo do fenômeno do desamparo aprendido adiante, com grandes contribuições para o entendimento dos efeitos do estresse sobre um indivíduo. Esse modelo desenvolvido inicialmente em cães por Overmier e Seligman (1967), logo foi padronizado e validado em diversas outras espécies como ratos, camundongos, gatos e até mesmo em humanos (Miller and Seligman, 1975).

O desamparo aprendido seria um efeito comportamental caracterizado por dificuldade de aprendizagem por parte dos indivíduos que tiveram histórico com

eventos aversivos incontroláveis (Maier e Seligman, 1976). O sujeito exposto a estímulos aversivos incontroláveis aprenderia que suas respostas a estes estímulos não os modificam, ou seja, que o seu comportamento não controla o ambiente. Como consequência, o mesmo sujeito passa a apresentar dificuldade para aprender respostas de fuga ou de esquiva quando estas lhe são possíveis (Maier e Seligman, 1976; Hunziker, 2003; Maier e Watkins, 2005). O termo desamparo aprendido se aplica não simplesmente às consequências de um estresse incontrolável. Mas às consequências de um estresse incontrolável que dependem da incontrolabilidade do estresse. A incontrolabilidade dos choques torna os indivíduos mais sensíveis a vários aspectos da contingência, incluindo o controle por estímulos antecedentes e a contiguidade entre as respostas e suas consequências. Assim, variáveis do ambiente que podem ser irrelevantes (que normalmente não controlariam os comportamentos dos sujeitos) passam a interferir no comportamento, competindo com o controle a ser exercido pelos aspectos críticos da contingência, dificultando a aprendizagem (Hunziker e Gehm).

Além da dificuldade de aprendizado que influencia negativamente no desempenho em testes de esquiva, o desamparo aprendido compreende uma série de alterações comportamentais que ocorrem após a exposição a estressores que não são controláveis por meio de respostas comportamentais, e que não ocorrem se o estressor é controlável (Maier and Watkins, 2005). Assim, podemos citar: o aumento de ansiedade e outros déficits de atenção e memória (Miller et al., 1975), exacerbação do medo condicionado ao contexto (Maier et al., 1995), aumento de neofobia (Minor et al., 1994), redução na interação social (Short and Maier, 1993), diminuição da atividade locomotora (Wagner et al., 1977, Desan et al., 1988), desempenho prejudicado em tarefas motivadas por recompensa (Anderson et al.,

1968, Rosellini, 1978, 1981, Zacharko et al., 1982), diminuição do comportamento agressivo (Maier et al., 1972), perda de peso e apetite (Weiss, 1968, Dess et al., 1988), diminuição do apetite sexual (Dess et al., 1988), alterações no sono REM (Adrien et al., 1991), e aumento das concentrações de CRF e corticosterona (Greenberg et al., 1989). Apesar de a sintomatologia do modelo como um todo dificilmente remeter a um subtipo específico de depressão, o desamparo possui diversos sintomas que também são observados nesse transtorno mental, portanto este modelo é dotado de uma validade de face, embora discutida quanto a sua magnitude, consistente (Weiss et al., 1982, Willner, 1984, 1986, 1990, Vollmayr and Henn, 2003, Yan et al., 2010).

Ademais, essas alterações são geralmente sensíveis ao tratamento com drogas antidepressivas, o que confere validade farmacológica ao modelo (Sherman et al., 1982). Por exemplo, Sherman e colaboradores (Sherman et al., 1982) mostram que diferentes tratamentos antidepressivos são capazes de diminuir o número de falhas em escapar de ratos submetidos ao desamparo, incluindo a administração repetida de antidepressivos tricíclicos (imipramina, desipramina, amitriptilina, nortriptilina ou dozepina), antidepressivos atípicos (mianserina ou iprindol), inibidores da MAO (iproniazida ou pargilina) ou eletroconvulsoterapia. Além disso, foram testadas sistemicamente drogas ansiolíticas (diazepam, lorazepam ou clordiazepóxido), neurolépticos (clorpromazina ou haloperidol), estimulantes (anfetamina ou cafeína) ou depressores do sistema nervoso central (fenobarbital ou etanol), mostrando que mesmo com o tratamento crônico, nenhuma dessas drogas foi capaz de reverter o comportamento de desamparo. Outros trabalhos também já utilizaram imipramina (Leshner et al., 1979, Petty and Sherman, 1979), desipramina (Telner and Singhal, 1981) e pargilina (inibidor da MAO, Maier et al., 1983). Dados

do nosso grupo de pesquisa também mostraram que a administração de imipramina (na dose de 15mg/Kg) por sete dias, induz efeito do tipo antidepressivo por diminuir o número de falhas nos animais. Esse mesmo efeito não ocorre quando a imipramina é administrada de forma aguda (Petty and Sherman, 1980, Joca et al., 2008). Outro fato interessante a respeito do modelo é que mesmo com o tratamento com drogas antidepressivas (por ex., a imipramina), cerca de 30% dos animais tratados ainda apresentam o comportamento de desamparo (Joca et al., 2006), como se estes fossem não apenas sensíveis ao estresse, mas resistentes ao tratamento farmacológico aplicado. Um efeito bastante similar ocorre na clínica, onde cerca de 40% dos pacientes são resistentes ao tratamento farmacológico clássico (Keks et al., 2007).

Assim, o desamparo aprendido proporciona uma ferramenta bastante útil quando se trata de estudar a neurobiologia da depressão, mimetizando em um modelo animal pacientes resilientes e pacientes sensíveis ao estresse ou ao tratamento farmacológico. Não obstante, diversos estudos bem sendo realizados quanto às estruturas cerebrais e vias neurais envolvidas no desamparo aprendido.

1.3 Teorias sobre a etiologia da depressão

Como dito anteriormente, as primeiras hipóteses a respeito da etiologia da depressão surgiram na década de 1950, quando começou a ser descoberto o mecanismo de ação dos primeiros fármacos conhecidos como antidepressivos. A principal teoria sobre a neurobiologia da depressão é conhecida como a “Teoria monoaminérgica clássica da depressão”. Essa teoria foi baseada principalmente nas propostas de J. Schildkraut (1965) e de Lapin e Oxenkrug (1969) e, de acordo com

esta, deficiências na neurotransmissão noradrenérgica e/ou serotoninérgica em determinados sítios funcionalmente importantes no encéfalo seriam a causa de distúrbios como a depressão (Schildkraut, 1965, Lapin and Oxenkrug, 1969, Castren, 2005). Porém, alguns achados levam a questões que não podem ser resolvidas por essa correlação tão simples. Por exemplo, a depleção aguda de triptofano, o precursor da serotonina, causa diminuição dos níveis de serotonina no encéfalo, porém os efeitos encontrados decorrentes desse tratamento, não condizem com o esperado, se a depressão fosse causada por simples diminuição de serotonina (Booij et al., 2003, Delgado, 2006, Moreno et al., 2010). A hipótese também não explica por que são necessárias várias semanas de tratamento continuado com drogas antidepressivas para que seus resultados clínicos apareçam, uma vez que seus efeitos sobre a neurotransmissão monoaminérgica são vistos logo após a administração dessas drogas (Nestler, 1998). Além disso, cerca de 45% dos pacientes são resistentes ao tratamento farmacológico clássico (Keks et al., 2007).

Avanços nas pesquisas têm dado origem a novas abordagens para a neurobiologia da depressão e uma das principais é a “Hipótese Neurotrófica” (Castren, 2005). As neurotrofinas regulam o crescimento neural e a diferenciação ao longo do desenvolvimento cerebral; regulam a plasticidade dos neurônios e das células gliais; e são importantes nas respostas aos danos neuronais, na manutenção das conexões funcionais entre as células e na neurogênese (Nestler, 2002). Assim, de acordo com essa hipótese, a depressão seria causada não simplesmente por uma depleção de monoaminas, mas por alterações plásticas envolvendo um prejuízo nas funções mediadas por neurotrofinas como o fator neurotrófico derivado do cérebro (o BDNF – *Brain Derived Neurotrophic Factor*), o que levaria a disfunções nas redes neurais causando um prejuízo funcional que

levaria também a um desequilíbrio na neurotransmissão monoaminérgica das estruturas límbicas, em conjunto, possivelmente, com outras alterações nos sistemas monoaminérgicos (Castrén, 2005).

Tal hipótese está fundamentada em estudos que indicam que o estresse é capaz de diminuir e o tratamento com drogas antidepressivas aumentar significativamente a expressão de BDNF nas regiões límbicas, em especial no hipocampo (Duman *et al.*, 2006). Além disso, o estresse promove diminuição da produção e da sobrevivência de novos neurônios no hipocampo (Gould *et al.*, 1997; Gould e Tanapat, 1999; Tanapat *et al.*, 2001; Malber e Duman, 2003), bem como reduções no comprimento de espinhos dendríticos e também na arborização de neurônios piramidais hipocampais (McKittrick *et al.*, 2000), efeitos que são atenuados em animais tratados cronicamente com drogas antidepressivas (Duman *et al.*, 2006). Recentemente, foi demonstrado que o efeito comportamental de drogas antidepressivas depende dos níveis de BDNF no giro denteado do hipocampo (Adachi *et al.*, 2010), bem como da neurogênese (Santarelli *et al.*, 2003), uma vez que o bloqueio local dessa neurotransmissão, ou da neurogênese, impede o aparecimento do efeito tipo-antidepressivo em modelos animais.

Porém, mesmo com o surgimento dessas novas hipóteses, o entendimento a respeito dos mecanismos moleculares e neurotransmissores envolvidos na neurobiologia da depressão ainda não estão completamente elucidados.

1.4 O Papel do óxido nítrico na neurobiologia da depressão

Desde a descoberta do óxido nítrico (NO) como neurotransmissor no SNC (Garthwaite *et al.*, 1988), seu envolvimento em vários processos neurais fisiológicos

e relacionados a transtornos psiquiátricos tem sido amplamente investigado (Calabrese et al., 2007), incluindo evidências do seu envolvimento na neurobiologia da depressão (McLeod et al., 2001, Guimaraes et al., 2005).

O estímulo primário para a síntese de NO no SNC é o influxo de cálcio que ocorre principalmente em resposta à ativação de receptores para glutamato do tipo N-metil-D-aspartato (NMDA - (Garthwaite et al., 1988). O cálcio leva à ativação da isoforma neuronal da sintase de NO (nNOS) que catalisa a formação de L-citrulina e NO, a partir de L-arginina (Knowles et al., 1989). O NO difunde-se rapidamente pelas células nervosas e pode agir de diversas maneiras, sendo a mais comum delas a ativação da guanilato ciclase solúvel (sGC, seu principal alvo), ou devido à interação com resíduos de cisteína ou tirosina em outras moléculas proteicas (Prast and Philippu, 2001). Como resultado, o NO pode modular a excitabilidade neuronal e também diversos sistemas neurotransmissores (Prast and Philippu, 2001).

Tem sido demonstrado por grupos independentes que a administração de antagonistas dos receptores NMDA induz efeitos do tipo antidepressivo em animais submetidos ao modelo do nado forçado. Esse efeito foi observado pioneiramente com a administração de MK801 (Trullas e Skolnick, 1990, Maj *et al.*, 1992a) e ACPC (Ácido 1-aminociclopropanocarboxílico - um antagonista funcional dos receptores do tipo NMDA; Trullas e Skolnick 1990), tendo sido observado também com a administração de AP7 (ácido 2-amino-7-fosfonoheptanóico - antagonista competitivo dos receptores NMDA; Trullas e Skolnick, 1990), eliprodil (um antagonista NMDA que age no sítio poliamínico do receptor; Layer *et al.*, 1995), CGP37849 (antagonista competitivo dos receptores NMDA; Maj *et al.*, 1992b) e, mais recentemente, com ketamina (antagonista NMDA não competitivo, Li *et al.*, 2010 e 2011). Além disso, Przegalinski e cols. (1997) administraram CGP 37849 e ACPC diretamente no hipocampo de ratos e

observaram efeitos do tipo antidepressivo similares aos encontrados com a administração sistêmica de imipramina, um antidepressivo tricíclico, local e sistemicamente, indicando um provável sítio de ação no SNC para essas drogas.

Efeitos do tipo antidepressivo induzidos por antagonistas NMDA também foram descritos em trabalhos que empregaram outros testes e modelos animais utilizados para o estudo de comportamentos relacionados à depressão, como o teste de suspensão pela cauda (TST- *Tail Suspension Test*, Panconi *et al.*, 1993), o modelo de desamparo aprendido (Meloni *et al.*, 1993) e o modelo do estresse crônico variado imprevisível (CUMS – Chronic Unpredictable Mild Stress; Papp and Moryl, 1993, Papp and Moryl, 1994).

Em adição a esses dados, há relatos de que o tratamento repetido com antagonistas NMDA induz *down-regulation* dos receptores β -adrenérgicos corticais em roedores (Paul *et al.*, 1992; Klimek e Papp, 1994), um efeito característico observado após o tratamento crônico com drogas antidepressivas (Nimgaonkar *et al.*, 1985; Paul *et al.*, 1992). Além disso, o tratamento crônico com drogas antidepressivas reduz a expressão de receptores NMDA em várias estruturas encefálicas, em particular no córtex pré-frontal e no hipocampo (Sanacora *et al.*, 2008). Assim, em conjunto, esses dados indicam que a redução da neurotransmissão mediada por receptores NMDA para glutamato em estruturas límbicas estaria envolvida com o aparecimento de efeitos do tipo antidepressivo. Em outras palavras, o aumento da neurotransmissão mediada por glutamato parece favorecer o desenvolvimento de consequências comportamentais do estresse em animais e, possivelmente, a depressão em humanos (Sanacora *et al.*, 2008).

Considerando que a principal via de formação do NO no SNC ocorre via ativação de receptores NMDA, os trabalhos supracitados levaram à formulação da

hipótese de que o NO poderia estar envolvido no desenvolvimento das consequências comportamentais induzidas pelo estresse. Essa hipótese ganhou sustentação ao se demonstrar que a inibição da síntese de NO através da administração sistêmica de inibidores não seletivos da NOS também induz efeito tipo antidepressivo em roedores submetidos ao modelo do nado forçado (Jefferys and Funder, 1996, Yildiz et al., 2000, Heiberg et al., 2002, Harvey et al., 2010). Mais recentemente, outros modelos animais foram empregados, como o desamparo aprendido (Stanquini *et al.*, 2008), o estresse crônico variado imprevisível (Zhang *et al.*, 2008) e outros tipos de estresse (Khovryakov *et al.*, 2010), onde o tratamento com inibidores da NOS induziu efeitos do tipo antidepressivo, reforçando a ideia da participação do NO na neurobiologia da depressão.

Corroborando esses dados, foi relatado aumento da expressão da nNOS no hipocampo de humanos deprimidos (Oliveira et al., 2008), além de níveis séricos de nitratos elevados (Suzuki et al., 2001), o que pode ser um indicativo de aumento de produção de NO nesses pacientes. Além disso, a inibição da via NOS/sGC com azul de metileno promoveu significativa melhora do humor em pacientes deprimidos (Naylor et al., 1987).

Em experimentos utilizando murinos foi demonstrado que os efeitos comportamentais do tipo antidepressivo induzido pelos inibidores da NOS são dependentes de serotonina endógena, uma vez que a inibição da síntese de serotonina bloqueou os efeitos do tipo antidepressivo induzido pelo tratamento sistêmico com essas drogas (Harkin et al., 2003). Em outro trabalho do mesmo grupo (Harkin et al., 2004), foi demonstrado que a administração de doses subefetivas de inibidores da NOS potencializou o efeito antidepressivo de inibidores seletivos de recaptação de serotonina, mas não o efeito de drogas inibidoras

seletivas de recaptação de noradrenalina. Mais recentemente, Gigliucci e cols. (2010) demonstraram que a administração concomitante de um antagonista serotoninérgico não seletivo atenuou o efeito do tipo antidepressivo induzido pela administração sistêmica de um inibidor da NOS em animais submetidos ao nado forçado. Além disso, Wegener e seu grupo de pesquisa demonstraram que a administração de antidepressivos diretamente no hipocampo de ratos diminui a atividade da enzima NOS (Wegener et al., 2003). Esses dados indicam a possibilidade do envolvimento da via do óxido nítrico nos efeitos de drogas antidepressivas.

Além dos experimentos sistêmicos, sabe-se que a administração de antagonista de receptores NMDA no hipocampo (Padovan e Guimarães, 2004) ou no córtex pré-frontal medial (Pereira, 2014) ou a administração de inibidores da NOS no hipocampo (Joca e Guimaraes, 2006; Hiroaki-Sato, 2014) ou no córtex pré-frontal medial (Pereira, 2014) também é capaz de induzir efeitos do tipo antidepressivo em ratos submetidos ao teste do nado forçado. Além disso, o efeito da administração intra-hipocampal parece depender de receptores serotoninérgicos do tipo 5HT_{1A} (Hiroaki-Sato, 2014).

A elucidação dos mecanismos pelos quais o NO participa ou não da neurobiologia da depressão e de outros transtornos mentais pode ajudar a aumentar o conhecimento a respeito, auxiliando no desenvolvimento de teorias mais precisas e, quiçá, de drogas abordagens terapêuticas mais efetivas para o tratamento de tais enfermidades.

1.5 O c-fos como marcador de ativação neuronal

Pode-se dizer que a era dos oncogenes teve início com G. Steven Martin, da Universidade da Califórnia, em 1969, com experimentos utilizando vírus de sarcoma Rous (Bishop, 1985). Ele submeteu esse vírus a substâncias químicas mutagênicas, obtendo mutantes condicionais no gene viral (Martin, 1970). Foi a análise de vírus tumorais que trouxeram à tona os oncogenes (Bishop, 1985). Foram então observados que os elementos transformantes (os oncogenes) dos vírus de transformação aguda eram derivados de genes celulares (chamados posteriormente de proto-oncogenes) e esses genes celulares eram também alvos de mutação em tumores humanos ocorridos naturalmente. Posteriormente observou-se que ao menos parte dos proto-oncogenes eram genes responsáveis pela transcrição de fatores de crescimento ou seus receptores, o que levou à primeira ligação lógica entre a regulação do crescimento celular e o câncer (Reddy, 1988).

Dentre esses proto-oncogenes, estão os chamados genes de expressão imediata precoce (IEGs – Immediate Expression Genes). Os IEGs são genes responsáveis pela transcrição de diversas proteínas com diferentes funções celulares. Entre os IEGs mais estudados estão o c-fos, o c-jun, FosB, zif268 e Egr2. Destes, o c-fos é o mais utilizado como ferramenta nas neurociências até hoje.

A proteína c-Fos foi a primeira proteína da família Fos a ser caracterizada. O gene c-fos foi clonado de estudos com o oncogene v-fos, oriundo de dois retrovírus oncogênicos murinos. O produto oriundo do gene possui 55 kDa e, após sofrer alterações pós-translacionais, resulta em um produto de 62 kDa. A proteína resultante contém um zíper de leucina que leva à dimerização com outros produtos de proto-oncogenes, geralmente membros da família Jun. A ligação dos dímeros

ocorre em um local específico do DNA, o domínio de ligação AP-1. Além da c-Fos, há outras proteínas com similaridades químicas bastante próximas, as chamadas FRAs (do inglês *Fos-related antigens*). As FRAs também podem se dimerizar com as proteínas da família Jun devido à presença do zíper de leucina. Dessa forma, anticorpos que almejam epítomos internos da proteína c-Fos, geralmente acabam se ligando inespecificamente à FRAs, enquanto anticorpos que se ligam no N-terminal da proteína são mais específicos, uma vez que essa parte da proteína tem menos homologia com as FRAs (Reddy, 1988).

A indução de expressão da proteína Fos é rápida e transitória e seus níveis em condições basais são baixos (Morgan et al., 1987, Morgan and Curran, 1989, Hughes et al., 1992, Hughes and Dragunow, 1995). O pico de expressão de c-Fos é por volta de 60 a 90 minutos após o estímulo, persistindo por até 5 horas (Curran and Morgan, 1987, Sharp et al., 1991).

Os estímulos capazes de induzir a expressão da proteína Fos são bastante diversos. Podem ser estímulos relativamente simples como o primeiro episódio de manuseio em ratos (Campeau et al., 1991) e também removendo o animal de sua caixa e expondo-o a um estímulo sonoro (Smith et al., 1992); expondo o animal a estímulos considerados cada vez mais estressantes como a injeção de soluções hipertônicas (Sharp et al., 1991), privação de água (Sagar et al., 1988), exposição a ambientes novos, exposição a predadores (Dielenberg et al., 2001, Beijamini and Guimaraes, 2006b), labirinto em cruz elevado (Beijamini and Guimaraes, 2006a), estresse de imobilização (Ueyama et al., 1997, Umemoto et al., 1997), nado forçado (Silva et al., 2012) estresse social (Majkutewicz et al., 2012), choque nas patas (Trentani et al., 2003), etc.

Essas características fazem da proteína Fos um excelente marcador de atividade neuronal induzida pelo estresse, sendo que o padrão de expressão da proteína varia de acordo com a espécie e linhagem animal utilizada, o tipo de estressor e o tempo tomado do momento do estresse ao momento da eutanásia (Baisley et al., 2011). Além disso, a detecção da proteína Fos permite boa resolução celular, não alcançada por meio de técnicas de imagem como a tomografia por emissão de pósitrons ou registros eletrofisiológicos. Por isso, a expressão de Fos tem sido amplamente utilizada no estudo anatômico funcional das estruturas responsáveis pelas alterações neuroendócrinas, autonômicas e comportamentais induzidas pelo estresse (Chen and Herbert, 1995, Lino-de-Oliveira et al., 2001, Huang et al., 2004).

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

O objetivo deste trabalho foi avaliar o efeito de tratamentos antidepressivos sobre a ativação de neurônios produtores de NO em estruturas encefálicas (hipocampo, amígdala, CPFM, NPV e NLET) de animais submetidos ao modelo do desamparo aprendido.

2.2 Objetivos específicos

- i. Avaliar as diferenças entre animais submetidos ou não ao desamparo aprendido no número de neurônios marcados para proteína Fos (Fos-IR), para proteína nNOS (nNOS-IR) e com dupla marcação para Fos e nNOS (dupla-IR) nas seguintes estruturas: Hipocampo, amígdala, mPFC, PVN e BST.
- ii. Avaliar se o tratamento com antidepressivos alteraria a Fos-IR, nNOS-IR ou a dupla-IR nas estruturas estudadas de animais submetidos ao teste do desamparo aprendido.
- iii. Avaliar possíveis relações entre as marcações avaliadas neste projeto com o número de falhas no teste do desamparo, buscando possíveis causalidades e indícios de vulnerabilidade ou resistência ao estresse.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Animais

Foram utilizados ratos Wistar pesando entre 240 e 280 g provenientes do Biotério Central do Campus da USP de Ribeirão Preto e mantidos no biotério da disciplina de Farmacologia da FCFRP-USP. Os animais foram mantidos em ciclo claro/escuro (12h/12h) com luzes acesas às seis horas da manhã, temperatura controlada em $24\pm1^{\circ}\text{C}$ e com água e alimento *ad libitum*. Os protocolos experimentais descritos neste projeto foram aprovados pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal do Campus de Ribeirão Preto da USP (CEUA), cujo certificado está em anexo (ANEXO I).

3.2 Drogas

Foram utilizados: Imipramina (antidepressivo tricíclico; Sigma; 15mg/Kg) (Joca et al., 2008), Fluoxetina (inibidor seletivo da recaptação de serotonina; Sigma; 15 ou 30mg/Kg) (Wang et al., 2011), Desipramina (inibidor seletivo da recaptação de noradrenalina; Sigma; 12,5 ou 25mg/Kg) (Connor et al., 1998). As drogas foram diluídas em solução salina estéril com tween 80 a 2% e administradas por via intraperitoneal (i.p.) no volume de 1mL/Kg.

Hidrato de Cloral a 5% em água destilada (1mL/Kg, i.p.) foi utilizado para a sobredose anestésica.

3.3 Procedimentos experimentais

3.3.1 Teste do desamparo aprendido

Foi utilizado o teste do desamparo aprendido modificado de acordo com Joca (Joca et al., 2003a). A sessão de pré-teste consiste na aplicação de 40 choques randomizados (0,4 mA, 10s de duração, 30–90 s de intervalo) inescapáveis nas patas dos ratos. A sessão teste consiste na aplicação de 30 choques randomizados (0,4 mA, 10 s duração, 30–90 s de intervalo) precedidos (5 segundos antes do início do choque) por um tom de aviso (60 dB, 670 Hz, durante toda a aplicação do choque). Na sessão teste o choque é escapável, uma vez que pode ser interrompido e/ou evitado pelo próprio animal quando este cruzar de um compartimento para o outro lado durante a apresentação do tom ou durante a aplicação do choque.

Durante o teste, foram registrados o número de fugas, esquivas e falhas, bem como o tempo de latência para fuga ou esquiva e o número de animais desamparados em cada grupo. Animais que recebem mais do que 10 choques (cerca de 30% do total) são considerados desamparados (Musty *et al.*, 1990, Joca *et al.*, 2003).

Adicionalmente, foi registrado o número de cruzamentos entre os eventos (*inter-trial crossing*, ITC) como uma medida indireta da atividade locomotora dos animais.

3.3.2 Teste do campo aberto

Foi utilizado o teste do campo aberto como em (Kandratavicius et al., 2015), com algumas modificações. Os animais foram colocados no campo aberto, um aparato cúbico de madeira com a base medindo 72 cm² e 40 cm de altura. A base é

dividida em 16 quadrados de 18 cm. O teste teve duração de 30 minutos, assim como o teste do LH. Durante esse período a atividade locomotora foi avaliada como o número de cruzamentos realizados pelos animais. Os dados foram plotados como média do número de cruzamentos realizados em cada bloco de 5 minutos, totalizando 6 blocos. Alternativamente, também foram plotados o total de cruzamentos em 30 minutos.

3.3.3 Imunohistoquímica para marcação para Fos e para a dupla marcação Fos/nNOS

Duas horas após o teste, os animais foram anestesiados com dose letal de hidrato de cloral e submetidos à perfusão transcardíaca com solução de salina e, em seguida, solução de paraformaldeído (4%, tamponado com PBS 0,1 M, pH 7,4). Após a perfusão, os encéfalos foram removidos e permaneceram na mesma solução de paraformaldeído por 2 horas. Depois, os encéfalos foram deixados por 30 horas em solução de sacarose para crioproteção (30% de sacarose em tampão fosfato salina a 0,01M), e então foram congelados e armazenados a -80°C até o momento da realização dos cortes histológicos. Os cortes foram feitos em criostato com 40µm cada, sendo mantidas em solução anticongelamento (sacarose a 15%, etileno glicol a 30% em tampão fosfato 0,05M, pH=7,4) a -20°C até o momento da realização dos ensaios de imunohistoquímica.

As secções foram, então, submetidas aos ensaios para dupla marcação de acordo com a técnica empregada por Beijamini e Guimarães (2006b): 1. Imunohistoquímica para a detecção da proteína Fos e em seguida, nos mesmos cortes histológicos, 2. Imunohistoquímica para detecção de nNOS.

As secções foram pré-tratadas com água oxigenada (H_2O_2) 1% em TBS 0,05M por 10 minutos, para a redução da atividade da peroxidase endógena e posteriormente realizaram-se quatro lavagens de 5 minutos cada com TBS 0,1M (pH 7,4). Em seguida os cortes foram incubados com albumina de soro bovino (BSA) 1% em TBS 0,1M acrescido de Triton-X 0,02% (TBS-T), durante 30min, a fim de bloquear os sítios de ligações inespecíficas. Após, os cortes foram incubados à temperatura ambiente com um anticorpo primário policlonal de coelho anti-Fos (1:1000, sc52, Santa Cruz Biotechnology), que foi produzido a partir da sequência amino-terminal do peptídeo, o que aumenta sua especificidade para proteína Fos (Hoffman et al., 1993). Decorridas 15h dessa incubação, os cortes foram novamente lavados por três vezes de 5 minutos com TBS 0,1M e incubadas por mais 1h com anticorpo secundário de cabra biotinilado anti-IgG de coelho (1:1000). Os anticorpos foram diluídos em TBS-T + BSA à temperatura ambiente e submetidos à agitação constante. Para remoção do anticorpo secundário foram realizadas três lavagens de 5 min. cada em TBS 0,1M e em seguida os cortes foram incubados por 1 hora e 30 minutos com o complexo avidina – biotina peroxidase (ABC - 1:1500, anticorpo secundário e complexo ABC oriundos do kit Vectastain ABC kit, Vector Lab, Burlingame, Ca, USA). O mesmo processo foi repetido para a imunohistoquímica para detecção da proteína nNOS, utilizando-se o anticorpo primário anti-nNOS (sc648, Santa Cruz Biotechnology). Finalmente, após adequadamente lavadas, as lâminas foram desidratadas através de uma série de alcoóis (90%, 95%, 100% x2, 5 minutos cada), clareadas no xilol (álcool+xilol, xilol 100% x3, cinco minutos cada) e cobertas com *Permount* (Fischer Scientific) e lamínulas.

A imunorreatividade para Fos (Fos-IR) foi visualizada com a adição de diaminobenzidina (DAB, Sigma) em solução de PBS 0,01M e sulfato de níquel a

0,03%, como um produto azul/preto depositado no interior dos núcleos celulares. A imunorreatividade para nNOS (nNOS-IR) foi visualizada com a adição de DAB, como um produto marrom no soma das células. A contagem e o cálculo foram realizados da maneira descrita por Beijamini e Guimarães (2006a). O número de células foi contado manualmente com a ajuda de um sistema de análise de imagem computadorizado (*NIS-Elements 4.0 Nikon Corporation*) para capturar as imagens. Para cada grupo experimental, uma secção de cada animal foi avaliada. Todas as células marcadas na área total de cada região de interesse foram contadas. As áreas das regiões analisadas foram calculadas e os resultados expressos como o número de neurônios marcados/secção/estrutura/ $0,1\text{mm}^2$. O avaliador foi cego em relação aos grupos experimentais.

3.4 Desenho experimental

Experimento 01. Efeitos do tratamento agudo ou repetido com Desipramina sobre a imunomarcção para Fos e nNOS no cérebro de ratos submetidos ao teste do desamparo aprendido.

Este experimento foi realizado a fim de analisar o efeito de um antidepressivo noradrenérgico sobre o padrão de imunorreatividade (Fos e nNOS) em estruturas encefálicas de animais submetidos ao desamparo aprendido. Os animais foram submetidos à sessão pré-teste (choques inescapáveis) e foram tratados por sete dias (grupo tratamento repetido: veículo ou desipramina) ou seis dias com veículo e no sétimo com droga (grupo tratamento agudo: veículo ou desipramina) e então submetidos à sessão teste (choques escapáveis). Foram mensurados a latência para fuga ou esquiva bem como o número de falhas e o número de ITCs como

medida indireta da atividade locomotora dos animais. Duas horas após a sessão teste, os animais foram sacrificados e perfundidos e depois seus cérebros foram retirados e processados como descrito no item 3.3.3, para posterior realização dos ensaios de imunohistoquímica.

Experimento 02. Efeitos do tratamento agudo ou repetido com Fluoxetina sobre a imunomarcção para Fos e nNOS no cérebro de ratos submetidos ao teste do desamparo aprendido.

Este experimento foi realizado a fim de analisar o efeito do tratamento com um antidepressivo serotoninérgico sobre o padrão de imunorreatividade (Fos e nNOS) em estruturas encefálicas de animais submetidos ao desamparo aprendido. Os animais foram submetidos à sessão pré-teste (choques inescapáveis) e foram tratados por sete dias (grupo tratamento repetido: veículo ou fluoxetina) ou seis dias com veículo e no sétimo com droga (grupo tratamento agudo: veículo ou fluoxetina) e então submetidos à sessão teste (choques escapáveis). Foi mensurada a latência para fuga ou esquiva bem como o número de falhas e o número de ITCs como medida indireta da atividade locomotora dos animais. Duas horas após a sessão teste, os animais foram sacrificados e perfundidos e depois seus cérebros foram retirados e processados como descrito no item 3.3.3, para posterior realização dos ensaios de imunohistoquímica.

Experimento 03. Efeitos do tratamento repetido com Desipramina, Fluoxetina ou Imipramina sobre o comportamento dos ratos no teste do campo aberto.

Considerando que o número de ITCs não consiste na melhor medida de atividade locomotora, utilizamos o teste do campo aberto para avaliar se o

tratamento repetido com as drogas utilizadas não levaria a uma alteração na atividade locomotora dos animais. Os animais foram divididos em dois grupos, grupo estressado e grupo não estressado. O grupo estressado passou pela sessão de pré-teste do LH e o grupo não estressado foi apenas exposto à caixa de choques, porém sem sofrer qualquer choque nas patas. Em seguida os animais de cada grupo foram divididos em dois grupos: veículo e droga. Os animais do grupo veículo foram tratados com solução salina por sete dias e os animais do grupo droga foram tratados com a droga em questão durante sete dias (desipramina ou fluoxetina). No dia do teste, todos os animais foram submetidos ao teste do campo aberto (30 minutos) para avaliação da atividade locomotora.

3.5 Análise dos resultados

Os resultados do desamparo aprendido foram apresentados como média $\pm$ EPM do número de falhas em escapar e foram comparados utilizando-se o teste para análise de variância (ANOVA) de uma via seguida de pós-teste de Dunnett.

Os resultados do teste do campo aberto foram apresentados como média $\pm$ EPM do número de cruzamentos agrupados por tempo (0 a 5, 5 a 10, 10 a 15, 15 a 20, 20 a 25, 25 a 30 minutos de teste) e foram comparados utilizando-se ANOVA de duas vias sendo os fatores analisados o tempo e o tratamento, seguido, quando necessário de uma ANOVA de uma via. Alternativamente, os dados referentes ao teste do campo aberto também foram plotados como a média dos cruzamentos totais realizados no teste (30 minutos). Esses dados foram comparados utilizando-se ANOVA de uma via com pós-teste de Dunnett, ou teste *t* de student, quando necessário (comparação apenas de dois grupos).

Os resultados oriundos da análise imunohistoquímica são apresentados como média do número de células marcadas positivamente em 0,1 mm² de área na estrutura cerebral em questão. Esses dados foram analisados utilizando-se ANOVA de uma via seguida de pós-teste de Dunnett, ou teste *t de student*, quando necessário (comparação apenas de dois grupos).

Em todos os casos foram consideradas diferenças significantes quando os valores de *p* foram menores que 0,05. Os dados foram analisados através do software Prisma (Graph Pad Software Inc., 5ª versão).

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

A figura 01 mostra diagramas representando as áreas cerebrais analisadas, indicando o local analisado bem como a localização em relação ao Bregma e em relação à linha interaural.

Figura 1. Diagrama mostrando as regiões analisadas bem como as referências de localização das mesmas. BLAm – Amígdala basolateral; BST – Núcleo leito da estria terminal; CA1 – região *cornu ammonis* do hipocampo; CA3 – região *cornu ammonis* do hipocampo; CeAm – Amígdala central; DG – giro denteado do hipocampo; IL – porção infra-límbica do córtex pré-frontal medial; LAm – amígdala lateral; MeAm – Amígdala medial; mPVN – porção magnocelular do núcleo paraventricular do hipotálamo; PL – porção pré-límbica do córtex pré-frontal medial; pPVN – porção parvocelular do núcleo paraventricular do hipotálamo. (Adaptado de Paxinos e Watson, 1997).

4.1 Resultados dos testes comportamentais

4.1.1 Teste do desamparo aprendido

O tratamento repetido com desipramina na dose de 12,5 mg/Kg não induziu efeito estatisticamente significativo, enquanto o tratamento repetido com desipramina na dose de 25 mg/Kg e com imipramina na dose de 15 mg/kg induziram diminuição estatisticamente significativa no número de falhas (ANOVA de uma via, $p < 0,0001$, $F_{3,56} = 8,621$; pós-teste de Dunnett com $p < 0,05$) e o tempo médio de latência em escapar ou fugir dos choques no teste do desamparo aprendido (ANOVA de uma via, $p < 0,0001$, $F_{3,56} = 8,873$; pós-teste de Dunnett com $p < 0,05$ – Figura 02). O tratamento agudo com desipramina não induziu efeito significativo quando os animais foram comparados com os do grupo tratado apenas com salina no número de falhas (ANOVA de uma via, $p = 0,084$, $F_{2,24} = 5,869$; pós-teste de Dunnett com $p < 0,05$) ou no tempo médio de latência para escapar ou fugir dos choques (ANOVA de uma via, $p = 0,0007$, $F_{2,24} = 9,921$; pós-teste de Dunnett com $p < 0,05$). O tratamento com imipramina na dose de 15 mg/Kg novamente diminuiu tanto o número de falhas quanto o tempo de latência para escapar ou fugir dos choques.

Figura 2. Efeitos do tratamento repetido com desipramina sobre o comportamento de ratos submetidos ao LH. Efeito do tratamento repetido (esquerda) ou agudo (direita) com desipramina sobre o número de falhas em escapar ou se esquivar dos choques nas patas (linha superior) ou sobre latência para a fuga ou esquia (linha inferior). Dados apresentados como média $\pm$ EPM. ** = $p < 0.01$ e *** = $p < 0.001$.

O tratamento repetido com fluoxetina na dose de 30 mg/Kg não induziu efeito estatisticamente significativo, enquanto o tratamento repetido com desipramina na dose de 15mg/Kg e com imipramina na dose de 15 mg/kg induziram diminuição estatisticamente significativa no número de falhas (ANOVA de uma via, $p = 0,0063$, $F_{3,39} = 4,767$; pós-teste de Dunnett com $p < 0,05$) e o tempo médio de latência em escapar ou fugir dos choques no teste do desamparo aprendido (ANOVA de uma via, $p = 0,0065$, $F_{3,39} = 4,745$; pós-teste de Dunnett com $p < 0,05$ – Figura 02). O

tratamento agudo com fluoxetina não induziu efeito significativo quando os animais foram comparados com os do grupo tratado apenas com salina no número de falhas (ANOVA de uma via, $p=0,0016$, $F_{2,15}=10,23$; pós-teste de Dunnett com $p<0,05$) ou no tempo médio de latência para escapar ou fugir dos choques (ANOVA de uma via, $p<0,0001$, $F_{2,15}=20,62$; pós-teste de Dunnett com $p<0,05$). O tratamento com imipramina na dose de 15 mg/Kg novamente diminuiu tanto o número de falhas quanto o tempo de latência para escapar ou fugir dos choques.

Figura 3. Efeitos do tratamento repetido com fluoxetina sobre o comportamento de ratos submetidos ao LH. Efeito do tratamento repetido (esquerda) ou agudo (direita) com desipramina sobre o número de falhas em escapar ou se esquivar dos choques nas patas (linha superior) ou sobre latência para a fuga ou esquia (linha inferior). Dados apresentados como média $\pm$ EPM. * = $p<0.05$, ** = $p<0.01$ e *** = $p<0.001$.

4.1.2 Teste do campo aberto

Figura 4. Efeitos do tratamento repetido com desipramina (esquerda) ou com fluoxetina (direita) sobre o comportamento de ratos submetidos ao teste do campo aberto. Dados apresentados como média $\pm$ EPM. * = $p < 0.05$. DES=grupo tratado com desipramina; NS=grupo que não recebeu choque; FLX=grupo tratado com fluoxetina; PT=grupo que passou pelo pré-teste (choques); Veíc=grupo tratado com veículo.

O tratamento repetido com desipramina, a administração de choques nas patas ou a combinação dos dois não foi capaz de induzir diferenças significativas nos ratos expostos ao teste do campo aberto (Figura 04, painel da esquerda; ANOVA de uma via, $F_{3,26}=0,5475$, $p=0,6542$). O tratamento repetido com fluoxetina assim como a exposição a choques nas patas também não foi capaz de induzir alterações significativas nos animais expostos ao teste do campo aberto, porém a combinação do tratamento com os choques diminui o número de cruzamentos (Figura 04, painel da direita; ANOVA de uma via, $F_{3,16}=2,765$, $p=0,0759$; pós teste de Dunnett, $p < 0,05$), isto é, diminuiu a atividade locomotora dos animais.

4.2 Discussão dos testes comportamentais

O desamparo aprendido é um modelo animal que induz um estado comportamental com aspectos parecidos aos da depressão humana como resultado da exposição a um estímulo aversivo incontrolável e imprevisível. No protocolo experimental proposto neste projeto, ratos foram submetidos a uma sessão de choques inescapáveis nas patas que levam, num posterior teste com choques escapáveis, a um significativo aumento do número de falhas em fugir ou se esquivar destes choques. O prejuízo no aprendizado é um sintoma característico no modelo empregado (Seligman and Beagley, 1975).

O grupo tratado com imipramina foi introduzido no protocolo como um controle positivo, visto que já havia dados prévios do laboratório utilizando o tratamento com imipramina em animais submetidos ao modelo do desamparo aprendido, com essa droga sendo efetiva em diminuir o número de falhas dos animais (Joca *et al.*, 2003). Sendo assim, todos os experimentos comportamentais (dos experimentos com desipramina e com fluoxetina) foram realizados juntamente com animais tratados com imipramina, 15 mg/Kg.

A imipramina é uma das primeiras drogas antidepressivas descobertas (Vetulani e Nalepa, 2000, Lopez-Munoz e Alamo, 2009), e faz parte da classe dos antidepressivos tricíclicos, assim como a desipramina. Apesar de serem drogas consideradas de segunda ou terceira escolha devido à menor segurança e tolerância durante seu uso, os antidepressivos tricíclicos já foram muito utilizados na clínica e ainda o são, com comprovada eficácia contra transtornos depressivos (Lam e Mok, 2008) e tornam-se ferramentas interessantes do ponto de vista experimental. Alguns autores defendem que os antidepressivos tricíclicos ainda são as drogas com melhor eficácia em uso clínico contra a depressão maior (Mitchell, 2004), embora essa questão ainda seja motivo de controvérsias na literatura científica (Ciraulo, 2004).

As doses de desipramina utilizadas no Experimento 2 foram escolhidas de acordo com trabalhos da literatura (Soubrie *et al.*, 1986, Valentine *et al.*, 2008), resultando na escolha de três doses: 12,5, 25 e 50 mg/Kg. A dose de 50 mg/kg se mostrou altamente letal para os ratos, sendo descartada logo após a realização do primeiro experimento (com n=3 animais no grupo). As outras doses não apresentaram efeito letal em nenhum dos animais utilizados (dados não mostrados).

O tratamento repetido com desipramina com a dose de 12,5 mg/Kg não apresentou diferenças significativas quando comparado com o controle, porém o tratamento repetido com a dose de 25 mg/Kg diminuiu significativamente tanto o número de falhas quanto a latência para fuga ou esquiva nos animais submetidos ao desamparo aprendido (Figura 02). De fato, diversos trabalhos na literatura mostram os efeitos do tipo antidepressivo da desipramina no teste do desamparo aprendido (Soubrie *et al.*, 1986, Martin *et al.*, 1987, Valentine *et al.*, 2008). Apesar das diferenças nos protocolos experimentais, os trabalhos supracitados vão de acordo com os resultados aqui encontrados.

O tratamento agudo com desipramina não induziu efeito nem quanto ao número de falhas nem quanto à latência para esquiva/fuga do choque quando comparado com o grupo controle (Figura 03). Esses resultados indicam que o efeito da administração repetida de desipramina não acontece devido à última administração da droga (logo antes do teste com choques escapáveis), mas provavelmente se dá pela somatória do efeito das administrações repetidas.

O tratamento repetido com fluoxetina com a dose de 30 mg/Kg não foi capaz de induzir diferenças significativas quando comparado com o grupo que recebeu apenas veículo. No entanto, o tratamento com fluoxetina na dose de 15 mg/Kg foi capaz de diminuir significativamente o número de falhas dos animais submetidos ao

desamparo aprendido e diminuiu também o tempo de latência para fuga ou esquiva (Figura 04). O tratamento agudo com fluoxetina na dose efetiva não induziu os mesmos efeitos, indicando que, da mesma forma que a desipramina, o efeito da administração repetida não é devido à última administração da droga.

Os resultados com o tratamento repetido com fluoxetina estão de acordo com trabalhos na literatura que utilizam mesma droga para reverter as alterações comportamentais induzidas pela exposição a choques inescapáveis (Fernandez Macedo *et al.*, 2012, Malberg e Duman, 2003, Zazpe *et al.*, 2007, Reines *et al.*, 2008). Reines e cols. (2008), bem como Fernandez-Macedo e cols. (2012), obtiveram resultados semelhantes aos aqui apresentados utilizando a dose de 10 mg/Kg de fluoxetina, porém por um período maior de tratamento (21 dias). Outros trabalhos como o de Malberg e Duman (2003) conseguiram reverter os efeitos dos choques inescapáveis com um tratamento de 7 dias com fluoxetina 10 mg/Kg, onde além do pré-teste, havia uma segunda sessão de choques no dia seguinte para confirmar se o animal realmente havia adquirido o comportamento de desamparo e, depois de 8 dias, uma sessão teste de choques inescapáveis, porém com um grau maior de dificuldade (para desligar o choque o animal deveria passar duas vezes pela porta, isto é, ir e voltar). Já Zazpe e cols. (2007) utilizaram um protocolo mais intenso (120 choques de 1.2 mA e duração de 10s), mas também conseguiram reverter os efeitos desses choques com um tratamento de fluoxetina na dose de 15 mg/Kg ou de 30 mg/Kg durante 3 dias consecutivos, somando 5 administrações.

No intuito de avaliar possíveis alterações psicomotoras induzidas pelas drogas administradas, realizou-se o teste do campo aberto. Como é possível observar, os tratamentos utilizados não induziram efeitos significativos sobre a atividade locomotora (desipramina) ou induziram um efeito de hipolocomoção (fluoxetina – Figura 04). Como

não houve uma indução de hiperlocomoção ou um aumento da atividade psicomotora dos animais, nossos resultados levam a crer que os efeitos do tipo-antidepressivo de aumento de fugas e esquivas (ou diminuição das falhas) no teste de animais tratados repetidamente com as drogas utilizadas, não são oriundos de um falso positivo por simples aumento da atividade locomotora dos animais.

Os resultados aqui apresentados corroboram dados da literatura de que todas as drogas utilizadas neste trabalho induzem efeito tipo antidepressivo em testes de desamparo aprendido (JOCA Soubrie *et al.*, 1986, Martin *et al.*, 1987, Valentine *et al.*, 2008; Fernandez Macedo *et al.*, 2012, Malberg e Duman, 2003, Zazpe *et al.*, 2007, Reines *et al.*, 2008). Além de outros trabalhos com outras drogas da mesma classe (tricíclicos ou inibidores seletivos de recaptação de serotonina) que também induzem efeitos similares (Sherman *et al.*, 1982, Soubrie *et al.*, 1986, Martin *et al.*, 1987, Maier *et al.*, 1990, Murua and Molina, 1992, Meloni *et al.*, 1993, Martin *et al.*, 1996, Nakagawa *et al.*, 1996, Mac Sweeney *et al.*, 1998, Tordera *et al.*, 2002, Joca *et al.*, 2003a, Malberg and Duman, 2003, Joca *et al.*, 2006, Zazpe *et al.*, 2007, Reines *et al.*, 2008, Valentine *et al.*, 2008, Hajszan *et al.*, 2009a, Hajszan *et al.*, 2009b, Bougarel *et al.*, 2011, Padilla *et al.*, 2011, Fernandez Macedo *et al.*, 2012).

4.3 Resultados e discussão dos ensaios de imunohistoquímica

Os resultados referentes às análises dos ensaios de imunohistoquímica foram compilados e podem ser vistos no ANEXO V.

Os resultados das análises de correlação estão compilados no anexo III em quadro único.

4.3.1 Hipocampo

4.3.1.1 Resultados

O tratamento repetido ou agudo com desipramina induziu uma diminuição no número de células Fos-IR na região dHPC-CA1 quando comparados com o grupo controle (ANOVA de uma via, $F_{2,26}=4,459$; $p=0,0216$; pós teste de Dunnett, $p<0,05$), mas não induziu alterações significativas quanto ao número de células nNOS-IR (ANOVA de uma via, $F_{2,26}=0,06257$, $p=0,9395$) ou dupla-IR (ANOVA de uma via, $F_{2,27}=0,9148$, $p=0,4127$). O tratamento repetido com imipramina também induziu um efeito semelhante sobre o número de células Fos-IR (teste t de student, $t_{26}=2,502$, $p=0,0190$), mas não sobre o número de células nNOS-IR (teste t de student, $t_{28}=1,335$, $p=0,1927$). O tratamento agudo ou repetido com fluoxetina não induziu alterações significativas no número de células Fos-IR (ANOVA de uma via, $F_{2,16}=1,414$, $p=0,2721$), nNOS-IR (ANOVA de uma via, $F_{2,16}=1,054$, $p=0,3717$) ou dupla-IR (ANOVA de uma via, $F_{2,27}=0,9148$, $p=0,4127$). Todos esses dados estão representados na Figura 05.

A contagem de células dupla-IR na região dHPC-CA1 dos animais do grupo tratado com imipramina resultou em um número muito baixo de células e por isso não foi inserido na análise estatística. Esses dados podem ser observados no anexo IV.

As análises de correlação entre o número de células imunorreativas e o número de falhas em escapar ou fugir dos choques no teste do LH na região dHPC-CA resultou em uma correlação positiva entre o número de células Fos-IR e o número de falhas (Figura 06).

Figura 5. Efeito do tratamento com desipramina (primeira linha), fluoxetina (segunda linha) ou imipramina (terceira linha) sobre a Fos-IR, nNOS-IR ou dupla-IR na região CA1 do hipocampo dorsal. Dados expressos em média $\pm$ SEM da porcentagem em relação à média apresentada pelo grupo Naive. * = $p < 0,05$.

Figura 6. Relação entre o número de células Fos-IR, nNOS-IR ou dupla-IR na região CA1 do hipocampo dorsal e o número de falhas em escapar ou fugir dos choques dos animais no teste do LH. A linha representa regressão linear dos dados apresentados.

Figura 7. Fotomicrografias representativas de secções coronais (40µm) da região dHPC-CA1 de um animal Naïve, de um animal tratado com PTZ, e de animais tratados com DES, FXT ou IMI e submetidos ao LH. Os cortes foram processados para imunohistoquímica para a detecção da proteína Fos e nNOS. Células Fos-IR em preto e nNOS-IR em marrom.

Na região vHPC-CA1, o tratamento repetido com desipramina induziu efeito significativo diminuindo o número de células Fos-IR (ANOVA de uma via, $F_{2,23}=5,697$, $p=0,0098$). Porém, o tratamento agudo ou repetido com desipramina não induziu efeitos significativos no número de células nNOS-IR (ANOVA de uma via, $F_{2,23}=2,221$, $p=0,1313$) ou dupla-IR (ANOVA de uma via, $F_{2,23}=1,360$, $p=0,2766$), quando comparados ao grupo tratado com veículo. O tratamento agudo ou repetido com fluoxetina não induziu alterações significativas no número de células Fos-IR (ANOVA de uma via, $F_{2,15}=0,5824$, $p=0,5707$) ou nNOS-IR (ANOVA de uma via, $F_{2,16}=0,3851$, $p=0,6865$); e o tratamento repetido com imipramina também não induziu alterações significativas no número de células Fos-IR (teste t de student, $t_{27}=0,1183$, $p=0,9067$) ou nNOS-IR (teste t de student, $t_{28}=0,0686$, $p=0,9458$). Todos esses dados estão representados na Figura 08.

As análises de correlação entre o número de células imunorreativas e o número de falhas em escapar ou fugir dos choques no teste do LH na região vHPC-CA1 não apontou correlações significativas (Figura 09).

Figura 8. Efeito do tratamento com desipramina (primeira linha), fluoxetina (segunda linha) ou imipramina (terceira linha) sobre a Fos-IR, nNOS-IR ou dupla-IR na região CA1 do hipocampo ventral. Dados expressos em média $\pm$ SEM da porcentagem em relação à média apresentada pelo grupo Naïve. * = $p < 0,01$.

Figura 9. Relação entre o número de células Fos-IR, nNOS-IR ou dupla-IR na região CA1 do hipocampo ventral e o número de falhas em escapar ou fugir dos choques dos animais no teste do LH. A linha representa regressão linear dos dados apresentados.

Figura 10. Fotomicrografias representativas de secções coronais (40µm) da região vHPC-CA1 de um animal Naïve, de um animal tratado com PTZ, e de animais tratados com DES, FXT ou IMI e submetidos ao LH. Os cortes foram processados para imunohistoquímica para a detecção da proteína Fos e nNOS. Células Fos-IR em preto e nNOS-IR em marrom.

Na região dHPC-CA3, o tratamento repetido com desipramina induziu efeito significativo diminuindo o número de células Fos-IR (ANOVA de uma via, $F_{2,26}=6,864$, $p=0,004$; pós-teste de Dunnett, $p<0,05$). Porém, o tratamento agudo ou repetido com desipramina não induziu efeitos significativos no número de células nNOS-IR (ANOVA de uma via, $F_{2,26}=0,1139$, $p=0,8928$) ou dupla-IR (ANOVA de uma via, $F_{2,25}=0,1047$, $p=0,901$), quando comparados ao grupo tratado com veículo. O tratamento agudo ou repetido com fluoxetina não induziu alterações significativas no número de células Fos-IR (ANOVA de uma via, $F_{2,16}=0,5148$, $p=0,6072$) ou nNOS-IR (ANOVA de uma via, $F_{2,16}=0,2295$, $p=0,7975$); e o tratamento repetido com imipramina também não induziu alterações significativas no número de células Fos-IR (teste t de student, $t_{25}=0,5405$, $p=0,5936$), nNOS-IR (teste t de student, $t_{26}=1,11$, $p=0,2771$) ou dupla-IR (teste t de student, $t_{11}=0,1246$, $p=0,9031$). Todos esses dados estão representados na Figura 11.

A contagem de células dupla-IR na região dHPC-CA3 dos animais do grupo tratado com fluoxetina resultou em um número muito baixo de células e por isso não foi inserido na análise estatística. Esses dados podem ser observados no anexo IV.

As análises de correlação entre o número de células imunorreativas e o número de falhas em escapar ou fugir dos choques no teste do LH na região dHPC-CA3 indicou uma correlação significativa entre o número de células Fos-IR e o número de falhas em escapar ou fugir dos choques (Figura 12).

Figura 11. Efeito do tratamento com desipramina (primeira linha), fluoxetina (segunda linha) ou imipramina (terceira linha) sobre a Fos-IR, nNOS-IR ou dupla-IR na região CA3 do hipocampo dorsal. Dados expressos em média $\pm$ SEM da porcentagem em relação à média apresentada pelo grupo Naïve. * = $p < 0,05$; ** = $p < 0,01$.

Figura 12. Relação entre o número de células Fos-IR, nNOS-IR ou dupla-IR na região CA3 do hipocampo dorsal e o número de falhas em escapar ou fugir dos choques dos animais no teste do LH. A linha representa regressão linear dos dados apresentados.

Figura 13. Fotomicrografias representativas de secções coronais (40µm) da região dHPC-CA3 de um animal Naïve, de um animal tratado com PTZ, e de animais tratados com DES, FXT ou IMI e submetidos ao LH. Os cortes foram processados para imunohistoquímica para a detecção da proteína Fos e nNOS. Células Fos-IR em preto e nNOS-IR em marrom.

Na região vHPC-CA3, o tratamento repetido com desipramina induziu efeito significativo diminuindo o número de células Fos-IR (ANOVA de uma via, $F_{2,24}=6,33$, $p=0,0062$; pós teste de Dunnett, $p<0,05$). Porém, o tratamento agudo ou repetido com desipramina não induziu efeitos significativos no número de células nNOS-IR (ANOVA de uma via, $F_{2,42}=0,4175$, $p=0,6634$) ou dupla-IR (ANOVA de uma via, $F_{2,24}=0,03139$, $p=0,9691$), quando comparados ao grupo tratado com veículo. O tratamento agudo ou repetido com fluoxetina não induziu alterações significativas no número de células Fos-IR (ANOVA de uma via, $F_{2,16}=0,5349$, $p=0,5959$) ou nNOS-IR (ANOVA de uma via, $F_{2,16}=0,2108$, $p=0,8122$); e o tratamento repetido com imipramina também não induziu alterações significativas no número de células Fos-IR (teste t de student, $t_{25}=1,105$, $p=0,2798$), nNOS-IR (teste t de student, $t_{25}=0,499$, $p=0,6221$) ou dupla-IR (teste t de student, $t_{11}=0,3264$, $p=0,7502$). Todos esses dados estão representados na Figura 14.

A contagem de células dupla-IR na região vHPC-CA3 dos animais do grupo tratado com fluoxetina resultou em um número muito baixo de células e por isso não foi inserido na análise estatística. Esses dados podem ser observados no anexo IV.

As análises de correlação entre o número de células imunorreativas e o número de falhas em escapar ou fugir dos choques no teste do LH na região vHPC-CA3 indicou uma correlação significativa entre o número de células Fos-IR e o número de falhas em escapar ou fugir dos choques (Figura 15).

Figura 14. Efeito do tratamento com desipramina (primeira linha), fluoxetina (segunda linha) ou imipramina (terceira linha) sobre a Fos-IR, nNOS-IR ou dupla-IR na região CA3 do hipocampo ventral. Dados expressos em média $\pm$ SEM da porcentagem em relação à média apresentada pelo grupo Naive. * = $p < 0,05$.

Figura 15. Relação entre o número de células Fos-IR, nNOS-IR ou dupla-IR na região CA3 do hipocampo ventral e o número de falhas em escapar ou fugir dos choques dos animais no teste do LH. A linha representa regressão linear dos dados apresentados.

Figura 16. Fotomicrografias representativas de secções coronais (40µm) da região vHPC-CA3 de um animal Naïve, de um animal tratado com PTZ, e de animais tratados com DES, FXT ou IMI e submetidos ao LH. Os cortes foram processados para imunohistoquímica para a detecção da proteína Fos e nNOS. Células Fos-IR em preto e nNOS-IR em marrom.

Na região dHPC-DG, nem o tratamento agudo ou o repetido com desipramina induziu efeitos significativo no número de células Fos-IR (ANOVA de uma via, $F_{2,28}=0,02099$, $p=0,9792$), nNOS-IR (ANOVA de uma via, $F_{2,28}=0,452$, $p=0,6409$) ou dupla-IR (ANOVA de uma via, $F_{2,27}=0,631$, $p=0,5397$), quando comparados ao grupo tratado com veículo. O tratamento agudo ou repetido com fluoxetina também não induziu alterações significativas no número de células Fos-IR (ANOVA de uma via, $F_{2,16}=0,8017$, $p=0,4658$) ou nNOS-IR (ANOVA de uma via, $F_{2,16}=0,1664$, $p=0,2205$); e o tratamento repetido com imipramina também não induziu alterações significativas no número de células Fos-IR (teste t de student, $t_{28}=0,1788$, $p=0,8594$), nNOS-IR (teste t de student, $t_{28}=0,2689$, $p=0,79$) ou dupla-IR (teste t de student, $t_{14}=0,8698$, $p=0,3991$). Todos esses dados estão representados na Figura 17.

A contagem de células dupla-IR na região dHPC-DG dos animais do grupo tratado com fluoxetina resultou em um número muito baixo de células e por isso não foi inserido na análise estatística. Esses dados podem ser observados no anexo IV.

As análises de correlação entre o número de células imunorreativas e o número de falhas em escapar ou fugir dos choques no teste do LH na região dHPC-DG não indicou correlações significativas (Figura 18).

Figura 17. Efeito do tratamento com desipramina (primeira linha), fluoxetina (segunda linha) ou imipramina (terceira linha) sobre a Fos-IR, nNOS-IR ou dupla-IR na região DG do hipocampo dorsal. Dados expressos em média $\pm$ SEM da porcentagem em relação à média apresentada pelo grupo Naive.

Figura 18. Relação entre o número de células Fos-IR, nNOS-IR ou dupla-IR na região DG do hipocampo dorsal e o número de falhas em escapar ou fugir dos choques dos animais no teste do LH. A linha representa regressão linear dos dados apresentados.

Figura 19. Fotomicrografias representativas de secções coronais (40µm) da região dHPC-DG de um animal Naïve, de um animal tratado com PTZ, e de animais tratados com DES, FXT ou IMI e submetidos ao LH. Os cortes foram processados para imunohistoquímica para a detecção da proteína Fos e nNOS. Células Fos-IR em preto e nNOS-IR em marrom.

Na região vHPC-DG, nem o tratamento agudo ou o repetido com desipramina induziu efeitos significativo no número de células Fos-IR (ANOVA de uma via, $F_{2,27}=2,637$, $p=0,0899$), nNOS-IR (ANOVA de uma via, $F_{2,27}=2,099$, $p=0,1422$) ou dupla-IR (ANOVA de uma via, $F_{2,27}=0,7049$, $p=0,503$), quando comparados ao grupo tratado com veículo. O tratamento agudo ou repetido com fluoxetina também não induziu alterações significativas no número de células Fos-IR (ANOVA de uma via, $F_{2,16}=1,212$, $p=0,3262$) ou nNOS-IR (ANOVA de uma via, $F_{2,16}=0,5005$, $p=0,6154$); e o tratamento repetido com imipramina também não induziu alterações significativas no número de células Fos-IR (teste t de student, $t_{27}=0,383$, $p=0,7047$), nNOS-IR (teste t de student, $t_{27}=0,4864$, $p=0,6306$) ou dupla-IR (teste t de student, $t_{13}=1,355$, $p=0,1985$). Todos esses dados estão representados na Figura 20.

A contagem de células dupla-IR na região vHPC-DG dos animais do grupo tratado com fluoxetina resultou em um número muito baixo de células e por isso não foi inserido na análise estatística. Esses dados podem ser observados no anexo IV.

As análises de correlação entre o número de células imunorreativas e o número de falhas em escapar ou fugir dos choques no teste do LH na região vHPC-DG não indicou correlações significativas (Figura 21).

Figura 20. Efeito do tratamento com desipramina (primeira linha), fluoxetina (segunda linha) ou imipramina (terceira linha) sobre a Fos-IR, nNOS-IR ou dupla-IR na região DG do hipocampo ventral. Dados expressos em média $\pm$ SEM da porcentagem em relação à média apresentada pelo grupo Naïve.

Figura 21. Relação entre o número de células Fos-IR, nNOS-IR ou dupla-IR na região DG do hipocampo ventral e o número de falhas em escapar ou fugir dos choques dos animais no teste do LH. A linha representa regressão linear dos dados apresentados.

Figura 22. Fotomicrografias representativas de secções coronais (40µm) da região vHPC-DG de um animal Naïve, de um animal tratado com PTZ, e de animais tratados com DES, FXT ou IMI e submetidos ao LH. Os cortes foram processados para imunohistoquímica para a detecção da proteína Fos e nNOS. Células Fos-IR em preto e nNOS-IR em marrom.

4.3.1.2 Discussão

O hipocampo é uma estrutura das mais estudadas no sistema nervoso central, tanto em homens quanto nas mais diversas espécies animais, especialmente em roedores. Tradicionalmente relacionado às suas funções cognitivas, especialmente a memória, este também está relacionado com comportamento emocional. O hipocampo parece mediar algumas respostas motoras frente a situações envolvendo emoções, e está envolvido na complexa resposta comportamental a estressores, regulando o funcionamento do eixo HPA, e tendo papel importante na neurobiologia do estresse e, portanto, na neurobiologia de transtornos psiquiátricos relacionados ao estresse, como a depressão (Joca et al., 2003b, Duvernoy, 2005).

Essa relação do hipocampo com o estresse mostra-se cada vez mais complexa (Nestler et al., 2002, 2005). Os estudos relacionando situações aversivas e a expressão de Fos no hipocampo mostram resultados um tanto controversos na literatura. Alguns autores relatam que o estresse do teste do nado forçado é capaz de aumentar significativamente as células Fos-IR no DG, CA1 e CA3 do hipocampo dorsal (Wulsin et al., Bilang-Bleuel et al., 2002, Salchner et al., 2004, Muigg et al., 2007). Já o estudo de Ons e colaboradores (2004) mostrou que o estresse gerado pela exposição a um novo ambiente induz aumento na expressão de Fos em DG, CA1 e CA3, mas esse aumento é pouco expressivo. Além disso, este estudo também mostra que o estresse por imobilização durante 30 minutos não induz alterações no número de células Fos-IR do hipocampo desses ratos em relação ao grupo controle que não passou pela imobilização (Ons et al., 2004). O estudo de Silva e cols. (2012) também apresenta resultados semelhantes onde a exposição dos animais ao teste do nado forçado não induziu alterações significativas no número de células Fos-IR em nenhuma das três áreas hipocampais supracitadas.

Por último, Yochiy e cols. (2012) mostraram que ratos expostos ao teste do desamparo aprendido apresentaram um aumento da expressão da proteína Fos em CA1 e da proteína Egr-1 no DG. O gene *egr-1* é outro IEG que também é utilizado, assim como o *c-fos*, como um indicador da ativação neuronal (Yochiy et al.).

Os resultados aqui apresentados são corroborados em parte pelos resultados encontrados na literatura, indicando que as células hipocampais seriam ativadas após a exposição ao estresse, denotando possível participação desta estrutura no desenvolvimento do comportamento de desamparo. A grande disparidade de resultados encontrada na literatura pode ser explicada pela diversidade de protocolos experimentais utilizados pelos diferentes trabalhos. O tipo de agente estressor, a duração do estresse e principalmente o tempo entre a exposição ao estresse e o momento do sacrifício do animal podem influenciar no padrão de expressão da proteína Fos visualizado ao final do trabalho. A expressão de Fos pode ser regulada de diversas maneiras, inclusive pela própria presença ou ausência de Fos (Hoffman and Lyo, 2002, Kovacs, 2008), e diferenças no momento de sacrifício após a situação de estresse pode levar a mensurações em diferentes fases dessa autorregulação. Além disso, o padrão temporal de expressão de Fos pode variar em diferentes estruturas encefálicas. Há indícios que o pico de expressão de Fos no hipocampo seja de 1h após o estímulo estressante (Tischmeyer and Grimm, 1999, Guzowski, 2002), enquanto outros trabalhos trazem o pico de expressão de Fos no sistema nervoso central como sendo de 1 a 3 horas após a exposição ao estresse (Kovacs, 1998). Como a maioria dos trabalhos utiliza a análise de várias estruturas concomitantemente, o que geralmente é idealizado é um tempo médio que possa abranger todas essas estruturas. Esse tipo de delineamento pode fazer com que o momento do sacrifício esteja mais perto do pico de expressão de Fos em algumas estruturas em relação a outras.

Quanto à participação do hipocampo na neurobiologia do estresse, sabe-se que o estresse promove ativação do eixo hipotálamo-pituitária-adrenal (eixo HPA), que leva a liberação de glicocorticoides pela suprarrenal. Dependendo da duração e da intensidade do estresse, pode haver uma elevação sustentada dos níveis de corticoides, os quais podem promover vários efeitos deletérios ao organismo. O hipocampo é a região encefálica com a maior densidade de receptores para corticosteroides (receptores glicocorticoides e mineralocorticoides; McEwen et al., 1968, Gerlach and McEwen, 1972, de Kloet, 2000), o que evidencia sua importância na regulação do eixo. Por outro lado, como importante alvo para os efeitos dos glicocorticoides, o hipocampo também está sujeito aos seus efeitos prejudiciais. Níveis sustentados de corticosteroides podem resultar em danos estruturais no hipocampo como diminuição da arborização dendrítica, indução de apoptose e diminuição da neurogênese local (Lucassen et al., 2001b, Lee et al., 2002, Santarelli et al., 2003, Czeh and Lucassen, 2007). Tais alterações estruturais, por sua vez, poderiam prejudicar as funções desempenhadas pelo hipocampo, favorecendo alterações comportamentais e afetivas, e tornando o indivíduo mais susceptível ao desenvolvimento de distúrbios psiquiátricos, como a depressão. De fato, o eixo HPA se encontra desregulado em grande parte dos indivíduos depressivos (McEwen, 2007, Joels, 2008). Portanto, a regulação da atividade do eixo HPA tem um papel importante no controle da resposta endócrina e emocional ao estresse e o hipocampo encontra-se numa posição central na regulação dessa resposta.

A diminuição do número de células Fos-IR em CA1 e CA3 do hipocampo dorsal induzida pelo tratamento agudo com desipramina foi um resultado inesperado. Considerando que apenas o tratamento repetido com desipramina induziu efeitos comportamentais, o objetivo primário era de analisar quais os efeitos sobre o padrão de

ativação das células no hipocampo e principalmente, o padrão de ativação das células nNOS-IR. Uma vez que o grupo tratado agudamente com desipramina serve como um controle para mostrar que os efeitos observados não seriam induzidos por essa administração aguda, esse resultado pode sugerir que a diminuição de células Fos-IR nessas regiões seriam efeitos da injeção da droga sem correlação com o efeito comportamental em si. Slattery e cols. (2005), estudando as alterações na expressão de Fos no cérebro de ratos após a administração aguda de diferentes antidepressivos mostrou que, ao menos na região CA1 nenhuma das drogas administradas de forma aguda induziu alterações na expressão de Fos nessa região hipocampal (as drogas foram imipramina, fluoxetina, cloreto de lítio e mirtazapina). Apesar da proximidade química ou estrutural da desipramina com a imipramina, seu espectro de mecanismos de ação não é igual, e pode ser que para a desipramina, haja diferenças no padrão de ativação neuronal no hipocampo, como o indicado pelo presente estudo. Porém, no trabalho de Beck (1995), há o relato de um aumento no número de células Fos-IR na região amígdalo-hipocampal, aumento esse induzido pelo tratamento agudo com desipramina. Neste trabalho, o tratamento agudo com desipramina também não induziu diferenças significativas no número de células Fos-IR nas regiões dHPC-CA1 ou vHPC-CA1, ou dHPC-DG ou vHPC-DG; e o tratamento agudo com fluoxetina, de forma semelhante, aumentou o número de células Fos-IR na região amígdalo-hipocampal e diminuiu no dHPC-DG e vHPC-DG (Beck, 1995). O mesmo estudo ainda mostra que a administração de outra droga que também inibe a recaptação de catecolaminas (chamada de A75200), de bupropiona (um inibidor de recaptação de dopamina) e de tranilcipromina (MAOI com ação liberadora de noradrenalina e dopamina mais fraca, porém semelhante à da anfetamina) também foi capaz de, agudamente, aumentar o

número de células Fos-IR na região parahipocampal. As outras drogas (lprindol, nortriptilina) utilizadas não induziram efeitos significativos em nenhuma área hipocampal.

A diminuição do número de células Fos-IR em CA1 e CA3 pelo tratamento repetido com desipramina indica que a desipramina poderia exercer seus efeitos comportamentais, ao menos em parte, por diminuir a ativação de neurônios dessa estrutura. Muigg e cols. (Muigg et al., 2007) mostraram que o tratamento repetido com paroxetina induziu uma diminuição no aumento de células Fos-IR no hipocampo induzido pelo estresse do nado forçado. Porém esses efeitos foram observados apenas na região do giro denteado e não em CA1 ou CA3. Apesar de, no presente estudo, as diferenças terem sido significativas apenas em CA1 e CA3 e não no giro denteado, mais estudos se fazem necessários para que se avalie sob que condições tais estruturas participariam ou não das respostas comportamentais relacionadas com a depressão e com a ação de drogas antidepressivas. Mais uma vez aqui deve ser considerada a diferença no protocolo experimental, dando ênfase para o tipo de estressor que os animais foram submetidos, pois diferentes estressores induzem diferentes respostas (Pacak et al., 1998, Pacak, 2000, Pacak and Palkovits, 2001).

Como visto, o estresse causado pelos choques nas patas dos animais aumentou o número de células Fos-IR no hipocampo. Além disso, ao se relacionar o número de células Fos-IR presentes nas regiões dHPC-CA1, dHPC-CA3 e vHPC-CA3 verificou-se que, quanto maior o número de células Fos-IR nessas regiões, maior o número de falhas em escapar ou fugir dos choques no teste. Este resultado indica que a maior ativação dessas regiões levaria a um pior desempenho no teste. De fato, sabe-se que uma parte dos indivíduos depressivos apresenta hiperativação hipocampal (Videbech et al., 2002) geralmente acompanhada de déficits funcionais.

Em animais de laboratório, já foi observado que o estresse de restrição leva a um aumento da subunidade NR1 do receptor glutamatérgico do tipo NMDA no hipocampo. A subunidade NR1 é a principal subunidade do receptor NMDA, e um aumento na sua expressão pode levar a um aumento do número de receptores do tipo NMDA na região e, conseqüentemente uma ativação mais elevada em situações onde há a liberação de glutamato, como situações de estresse. Também já foi relatado que há aumento na liberação de glutamato em estruturas como o hipocampo e o córtex pré-frontal frente a situações de estresse (Moghaddam, 1993, 2002). Essa hiperativação glutamatérgica pode ser uma das responsáveis pelos danos estruturais causados nessas estruturas com a persistência do estresse.

O eixo HPA parece estar com suas funções fora de ordem em pacientes depressivos (Jurueña et al., 2004, Douglas and Porter, 2012, Herman et al., 2012). Essa disfunção parece variar de acordo com o subtipo de depressão apresentado, sendo hiperfuncionante na depressão maior (Jurueña et al., 2004). Essa hiperativação é demonstrada por mensurações urinárias de cortisol livre ou por medidas de CRH no líquido cefalorraquidiano de pacientes depressivos (medidas diretas, Nemeroff et al., 1984) ou por testes nos mecanismos de retroalimentação negativa, como o teste de supressão por dexametasona ou pelo teste de supressão por dexametasona e CRF (Heuser et al., 1994, Rybakowski and Twardowska, 1999, Nestler et al., 2002). Além disso, essa hiperativação parece ser sensível ao tratamento com antidepressivos (De Bellis et al., 1993).

As grandes concentrações de glicocorticoides circulantes perante estresse intenso e/ou sustentado, como já mencionado, podem levar a lesões no hipocampo. Essas lesões levariam à disfunção hipocampal, levando a falhas nos mecanismos de retroalimentação negativa pelos quais esta estrutura é responsável. Com essa resposta

diminuída, novos episódios de estresse levariam a maiores concentrações de glicocorticoides que, por sua vez, levariam a mais lesões no tecido hipocampal (Keck and Holsboer, 2001). Essas lesões seriam evidenciadas, por exemplo, por diminuição no tamanho somático de células piramidais hipocampais, diminuição da arborização dendrítica, indução de apoptose e diminuição da neurogênese hipocampal (Lucassen et al., 2001a, Lee et al., 2002, Santarelli et al., 2003, Stockmeier et al., 2004, Stockmeier and Rajkowska, 2004, Czeh and Lucassen, 2007).

Em relação ao sistema nitrérgico, o envolvimento do NO hipocampal na neurobiologia de comportamentos relacionados ao estresse tem sido bastante evidenciado nos últimos anos. Primeiramente, a NOS é amplamente expressa no hipocampo (Bredt et al., 1990, Bredt et al., 1991), e há evidências de que em cérebros de pacientes deprimidos haveria um aumento da expressão da nNOS no hipocampo (Oliveira et al., 2008).

Dados do nosso grupo de pesquisa indicam a participação do NO produzido no hipocampo em comportamentos relacionados à depressão. Joca e cols. (2006) mostraram que administração de um inibidor da NOS diretamente no hipocampo dorsal de ratos, diminuiu o comportamento de imobilidade no teste do nado forçado, um comportamento considerado tipo depressivo. O efeito tipo antidepressivo de inibidores da NOS administrados diretamente no hipocampo foi corroborado por trabalhos na literatura no teste do nado forçado (Hiroaki-Sato et al.); teste do estresse crônico variado (Wang et al., 2008) e desamparo aprendido (Joca et al., 2008). Além disso, a inibição da guanilato ciclase solúvel (sGC), principal alvo farmacológico do NO, diretamente no hipocampo também induz efeitos do tipo antidepressivo no nado forçado (Sales et al., no prelo). Esses efeitos parecem ser mediados por alterações plástico-estruturais, uma vez que a inibição da NOS no hipocampo é capaz de aumentar a expressão de CREB, BDNF e

também a neurogênese hipocampal (Canossa et al., 2002, Kim et al., 2006, Arora et al., 2007, Luo et al., 2007, Hu et al., 2008). Além disso, muitos trabalhos indicam a possível participação da via nitrérgica no efeito antidepressivo dos antidepressivos ou a interação da via nitrérgica hipocampal com a via serotoninérgica, a qual se acredita que possui um papel essencial para o mesmo efeito. A administração de antidepressivos no hipocampo diminui a atividade da NOS (Wegener et al., 2003) bem como a quantificação de nitritos e nitratos, uma medida indireta da produção de NO (Ikenouchi-Sugita et al., 2009). Também já foi descrito que a administração de agonistas de receptores serotoninérgicos do tipo 5HT1A, um dos receptores que seria essencial para o correto funcionamento do hipocampo no processamento afetivo, é capaz de diminuir a liberação de glutamato (Dijk et al., 1995, Matsuyama et al., 1996) e também de diminuir os níveis de NO e cGMP (Strosznajder et al., 1996) no hipocampo. No mesmo sentido, a administração de L-arginina, substrato da NOS, é capaz de atenuar os efeitos do tipo antidepressivo da sertralina no FST (Inan et al., 2004), e o NO endógeno já foi descrito como capaz de diminuir as concentrações de serotonina no hipocampo (Wegener et al., 2000). Por último, Salchner e cols. (Salchner et al., 2004), utilizando camundongos geneticamente modificados para não expressar a enzima nNOS (camundongos nNOS-/-), mostraram que os animais nNOS-/- apresentavam maior número de células Fos-IR em relação aos animais normais em CA1, CA3 e no giro denteado do hipocampo dorsal após passarem pelo estresse do nado forçado. Isso indica a participação do óxido nítrico produzido no hipocampo age como modulador da resposta comportamental induzida pelo estresse do nado forçado em camundongos.

Esses resultados evidenciam a importância da via nitrérgica hipocampal na modulação das funções hipocampais relacionadas com a resposta ao estresse. Por isso, apesar dos resultados negativos envolvendo os neurônios nNOS-IR neste

trabalho, é pouco provável que essa via não tenha participação no desenvolvimento do comportamento de desamparo e/ou no efeito tipo antidepressivo de drogas relatado neste trabalho. A ausência de evidências deve ser oriunda de limitações metodológicas aqui utilizadas.

4.3.2 Amígdala

4.3.2.1 Resultados

O tratamento repetido, mas não o agudo, com desipramina diminuiu o número de células Fos-IR na amígdala basolateral (ANOVA de uma via, $F_{2,29}=5078$, $p=0,0129$; pós-teste de Dunnett, $p<0,05$), porém não houve efeitos significativos na quantidade de células nNOS-IR (ANOVA de uma via, $F_{2,29}=1,778$, $p=0,1869$). O tratamento repetido, mas não o agudo, com fluoxetina também diminuiu tanto o número de células Fos-IR (ANOVA de uma via, $F_{2,17}=3,714$, $p=0,0459$; pós-teste de Dunnett, $p<0,05$) quanto o número de células nNOS-IR (Kruskal-Wallis test, K-W statistic=7,01, $p=0,03$). Já o tratamento repetido com imipramina não induziu efeitos significativos nem no número de células Fos-IR (teste t de student, $t_{29}=0,9255$, $p=0,3623$) nem no número de células nNOS-IR (teste t de student, $t_{29}=0,583$, $p=0,5644$). Esses dados estão representados na Figura 23.

A contagem de células dupla-IR na região BIAm dos animais resultou em um número muito baixo de células e por isso não foi inserido na análise estatística. Esses dados podem ser observados no anexo IV.

As análises de correlação indicaram uma correlação positiva entre o número de células Fos-IR e o número de falhas em escapar ou fugir dos choques no teste do LH (Figura 24).

Figura 23. Efeito do tratamento com desipramina (primeira linha), fluoxetina (segunda linha) ou imipramina (terceira linha) sobre a Fos-IR ou nNOS-IR na região basolateral da amígdala. Dados expressos em média $\pm$ SEM da porcentagem em relação à média apresentada pelo grupo Naïve. * = $p < 0,05$.

Figura 24. Relação entre o número de células Fos-IR, nNOS-IR ou dupla-IR na região basolateral da amígdala e o número de falhas em escapar ou fugir dos choques dos animais no teste do LH. A linha representa regressão linear dos dados apresentados.

Figura 25. Fotomicrografias representativas de secções coronais (40µm) da região BIAm de um animal Naïve, de um animal tratado com PTZ, e de animais tratados com DES, FXT ou IMI e submetidos ao LH. Os cortes foram processados para imunohistoquímica para a detecção da proteína Fos e nNOS. Células Fos-IR em preto e nNOS-IR em marrom.

O tratamento agudo, mas não o repetido, com desipramina (ANOVA de uma via, $F_{2,30}=20,26$, $p<0,0001$; pós-teste de Dunnett, $p<0,05$) e fluoxetina (ANOVA de uma via, $F_{2,16}=15,05$, $p=0,0002$; pós-teste de Dunnett, $p<0,05$) aumentou o número de células Fos-IR na amígdala central. Não houve efeitos significativos induzidos pelo tratamento nem com desipramina (ANOVA de uma via, $F_{2,30}=0,8331$, $p=0,4445$) ou com fluoxetina (ANOVA de uma via, $F_{2,16}=0,009988$, $p=0,9901$) quanto ao número de células nNOS-IR. Já o tratamento repetido com imipramina não induziu efeitos significativos nem no número de células Fos-IR (teste t de student, $t_{27}=1,633$, $p=0,114$) nem no número de células nNOS-IR (teste t de student, $t_{29}=1,901$, $p=0,0672$). Porém, como é possível observar na figura 26, houve uma tendência do tratamento em aumentar os dois parâmetros analisados.

A contagem de células dupla-IR na região CeAm dos animais resultou em um número muito baixo de células e por isso não foi inserido na análise estatística. Esses dados podem ser observados no anexo IV.

As análises de correlação entre o número de células imunorreativas e o número de falhas em escapar ou fugir dos choques no teste do LH na região CeAm não apontou correlações significativas (Figura 27).

Figura 26. Efeito do tratamento com desipramina (primeira linha), fluoxetina (segunda linha) ou imipramina (terceira linha) sobre a Fos-IR ou nNOS-IR na região central da amígdala. Dados expressos em média $\pm$ SEM da porcentagem em relação à média apresentada pelo grupo Naïve. *** = $p < 0,001$.

Figura 27. Relação entre o número de células Fos-IR, nNOS-IR ou dupla-IR na região central da amígdala e o número de falhas em escapar ou fugir dos choques dos animais no teste do LH. A linha representa regressão linear dos dados apresentados.

Figura 28. Fotomicrografias representativas de secções coronais (40µm) da região CeAm de um animal Naïve, de um animal tratado com PTZ, e de animais tratados com DES, FXT ou IMI e submetidos ao LH. Os cortes foram processados para imunohistoquímica para a detecção da proteína Fos e nNOS. Células Fos-IR em preto e nNOS-IR em marrom.

O tratamento repetido, mas não o agudo, com desipramina (ANOVA de uma via, $F_{2,28}=5,044$, $p=0,0135$; pós-teste de Dunnett, $p<0,05$) ou com fluoxetina (ANOVA de uma via, $F_{2,16}=3,804$, $p=0,0445$; pós-teste de Dunnett, $p<0,05$) foi capaz de diminuir o número de células Fos-IR no núcleo lateral da amígdala, mas não houve diferenças significativas quanto ao número de células nNOS-IR (desipramina: ANOVA de uma via, $F_{2,28}=0,7289$, $p=0,4914$; fluoxetina: ANOVA de uma via, $F_{2,17}=0,6826$, $p=0,5186$). O tratamento repetido com imipramina não foi capaz de induzir alterações significativas quanto ao número de células Fos-IR (teste t de student, $t_{29}=0,8585$, $p=0,3976$) ou nNOS-IR (teste t de student, $t_{29}=0,33$, $p=0,7438$). Os dados são apresentados na figura 29.

A contagem de células dupla-IR na região LAm dos animais resultou em um número muito baixo de células e por isso não foi inserido na análise estatística. Esses dados podem ser observados no anexo IV.

As análises de correlação indicaram uma correlação positiva entre o número de células Fos-IR e o número de falhas em escapar ou fugir dos choques no teste do LH (Figura 30).

Figura 29. Efeito do tratamento com desipramina (primeira linha), fluoxetina (segunda linha) ou imipramina (terceira linha) sobre a Fos-IR ou nNOS-IR na região lateral da amígdala. Dados expressos em média $\pm$ SEM da porcentagem em relação à média apresentada pelo grupo Naive.

Figura 30. Relação entre o número de células Fos-IR, nNOS-IR ou dupla-IR na região lateral da amígdala e o número de falhas em escapar ou fugir dos choques dos animais no teste do LH. A linha representa regressão linear dos dados apresentados.

Figura 31. Fotomicrografias representativas de secções coronais (40µm) da região LAm de um animal Naïve, de um animal tratado com PTZ, e de animais tratados com DES, FXT ou IMI e submetidos ao LH. Os cortes foram processados para imunohistoquímica para a detecção da proteína Fos e nNOS. Células Fos-IR em preto e nNOS-IR em marrom.

O tratamento agudo, mas não o repetido, com desipramina (ANOVA de uma via, $F_{2,30}=4,585$, $p=0,0183$; pós-teste de Dunnett, $p<0,05$) aumentou o número de células Fos-IR na amígdala medial. Não houve efeitos significativos induzidos pelo tratamento com fluoxetina sobre o número de células Fos-IR (ANOVA de uma via, $F_{2,17}=0,4823$, $p=0,6255$), ou com desipramina (ANOVA de uma via, $F_{2,30}=1,295$, $p=0,2885$) ou com fluoxetina (ANOVA de uma via, $F_{2,17}=0,9247$, $p=0,4157$) quanto ao número de células nNOS-IR. Já o tratamento repetido com imipramina não induziu efeitos significativos no número de células Fos-IR (teste t de student, $t_{30}=0,02034$, $p=0,9839$), mas sim no número de células nNOS-IR (teste t de student, $t_{30}=2,126$, $p=0,0418$). Os dados podem ser observados na Figura de número 32.

A contagem de células dupla-IR na região MeAm dos animais resultou em um número muito baixo de células e por isso não foi inserido na análise estatística. Esses dados podem ser observados no anexo IV.

As análises de correlação entre o número de células imunorreativas e o número de falhas em escapar ou fugir dos choques no teste do LH na região MeAm não apontou correlações significativas (Figura 33).

Figura 32. Efeito do tratamento com desipramina (primeira linha), fluoxetina (segunda linha) ou imipramina (terceira linha) sobre a Fos-IR ou nNOS-IR na região medial da amígdala. Dados expressos em média $\pm$ SEM da porcentagem em relação à média apresentada pelo grupo Naive. * = $p < 0,05$.

Figura 33. Relação entre o número de células Fos-IR, nNOS-IR ou dupla-IR na região medial da amígdala e o número de falhas em escapar ou fugir dos choques dos animais no teste do LH. A linha representa regressão linear dos dados apresentados.

Figura 34. Fotomicrografias representativas de secções coronais (40µm) da região MeAm de um animal Naïve, de um animal tratado com PTZ, e de animais tratados com DES, FXT ou IMI e submetidos ao LH. Os cortes foram processados para imunohistoquímica para a detecção da proteína Fos e nNOS. Células Fos-IR em preto e nNOS-IR em marrom.

4.3.2.2 Discussão

Apesar de a amígdala ser tradicionalmente relacionada à neurobiologia da ansiedade e do medo, há um crescente no número de trabalhos apontando para seu envolvimento na neurobiologia dos transtornos psiquiátricos relacionados ao estresse em geral (Shin and Liberzon 2009).

A amígdala teria como uma de suas principais funções fazer a detecção de estímulos externos potencialmente (e, às vezes, verdadeiramente) perigosos para o indivíduo, e fazer a ligação desses estímulos aversivos com as respostas comportamentais de defesa adequadas (LeDoux 2003). Apesar de algumas discussões na literatura quanto às subdivisões anatômicas da amígdala e aos critérios utilizados para essa classificação (LeDoux, 2007), uma ideia bastante difundida na literatura é a de que a amígdala consistiria em duas regiões evolutivamente distintas: uma região mais primitiva, relacionada ao sistema olfatório (a região córtico-medial, que consiste basicamente das porções medial e central da amígdala) e uma região mais nova, relacionada com o neocortex (a região basolateral, que consiste basicamente das porções lateral e basolateral da amígdala; Sah et al., 2003, LeDoux, 2007).

A amígdala lateral é uma porção que recebe muitas projeções de áreas importantes dos sistemas sensoriais. Os sistemas auditivos, visual, somatossensorial, olfativo e gustativo possuem projeções para a LAm. Essas aferências somadas àquelas que chegam às outras áreas da amígdala permitem que o complexo amigdalóide processe informações dos mais variados tipos. Já a porção central da amígdala é conhecida como uma importante área de saída da informação já processada internamente, sendo responsável pela expressão de respostas emocionais e respostas

fisiológicas associadas. Sabe-se, por exemplo, que a CeAm possui projeções para sistemas moduladores (noradrenérgicos, colinérgicos, serotoninérgicos e dopaminérgicos), para a substância cinzenta periaqueductal (PAG) e hipotálamo. A amígdala basolateral também funciona como uma via de saída de informação, enviando projeções para regiões com funções mais elaboradas (menos reacionais), como o córtex pré-frontal e o estriado ventral (LeDoux, 2007).

Há uma indução na transcrição de IEGs nos núcleos amigdaloides de ratos constitutivamente, assim como foi encontrado no presente trabalho. Herdegen e cols. (1995) mostram que, em condições basais, foram encontradas marcações positivas para as proteínas c-Jun, JunB, JunD, c-Fos, FosB e Krox-24 nos núcleos central e basolateral da amígdala de ratos da linhagem Sprague-Dawley, detectadas através de imunohistoquímica. Esses níveis basais de ativação de IEGs seriam relacionados ao dia-a-dia normal do animal em sua gaiola, num contexto fisiológico, tendo em vista que não houve estímulos intencionais induzidos nos animais. Por outro lado, Krukoff e cols. (1997) não encontraram células Fos-IR nos núcleos amigdaloides de ratos em condições basais (sem exposição a estressores), mas também não explicaram claramente os resultados encontrados. Nossos resultados também indicam a presença constitutiva de células Fos-IR nos núcleos amigdaloides como um todo, apesar desse número ter sido baixo. Considerando a discussão de Herdegen e cols. (1995) e as dadas funções da amígdala, essa expressão basal de Fos significaria a manutenção das atividades basais da amígdala.

O estresse induzido por choque nas patas aumentou de forma expressiva o número de células Fos-IR em todas as subestruturas analisadas, especialmente a BIAm (Figura 23). É bem estabelecido na literatura que diversos estressores podem induzir a ativação da amígdala, medida, por exemplo, pela expressão de Fos

(para revisão sobre o assunto, ver Knapska et al., 2007). Teste do medo condicionado, labirinto em cruz elevado, labirinto em T elevado, exposição ao odor de predador, teste do campo aberto, teste do residente intruso, testes de reforço comportamental apetitivo, teste da interação social, teste do nado forçado são alguns dos exemplos das manipulações que podem induzir a expressão de Fos nos núcleos da amígdala (Bilang-Bleuel et al., 2002, Knapska et al., 2007, Muigg et al., 2007, Wulsin et al., 2010, Silva et al., 2012). Todos esses testes avaliam aspectos relacionados com sintomas presentes em indivíduos depressivos (como ansiedade, interação social, hedonia e outros).

O tratamento repetido com desipramina e fluoxetina induziu uma diminuição no número de células Fos-IR tanto na LAm quanto na BIAm, indicando uma participação dessas duas regiões no efeito tipo antidepressivo ou anti-aversivo apresentado pelos animais.

Estudos de neuroimagem funcional indicam que a amígdala de pacientes depressivos parece estar hiperfuncionante (Peluso et al., 2009), especialmente quando testados em testes de resposta a faces humanas tristes ou imagens de medo (Sheline et al., 2001, Fu et al., 2004). Além disso, essa atividade aumentada parece normalizar com o tratamento antidepressivo. Drevets e cols. (1992) também mostram que a taxa metabólica da amígdala de pacientes depressivos se normaliza após o tratamento com antidepressivos (Drevets et al., 1992).

As porções lateral e basolateral da amígdala, juntamente com a região central, possuem papel importante tanto na aquisição quanto na expressão da resposta emocional condicionada no teste do medo condicionado (LeDoux, 2000). A amígdala lateral seria a porta de entrada do estímulo sensorial e a amígdala basolateral seria responsável principalmente pela mediação das reações ao

estímulo, principalmente com componente simpático (Knapska, Radwanska et al. 2007). Dessa forma, os resultados podem indicar uma possível modificação de como o animal interpreta o estímulo estressante recebido, podendo modificar todo o comportamento resultante. No entanto se essa diminuição na ativação dessas duas subáreas da amígdala (assim como no PFC e no hipocampo) faz parte da causa ou da consequência da ação da droga neste contexto, é uma questão que merece ser investigada mais a fundo.

O tratamento agudo com desipramina e fluoxetina induziu aumento no número de células Fos-IR na CeAm, e o tratamento agudo com desipramina também aumentou o número de células Fos-IR na MeAm (o tratamento agudo com fluoxetina também aumentou o número de células Fos-IR na MeAm, porém esse aumento não foi estatisticamente significativo – Figura 32). Diversos estudos mostram a ativação da amígdala córtico-medial após administração aguda de diferentes antidepressivos (Beck, 1995, Beck and Fibiger, 1995, Thomsen and Helboe, 2003, Slattery et al., 2005). Em um estudo sobre o efeito da administração aguda de diferentes drogas sobre a expressão de Fos, Slattery e cols. (2005) mostraram que a administração aguda de fluoxetina, imipramina, cloreto de lítio ou mirtazapina induziu o mesmo tipo de efeito, elevando a contagem de células Fos-IR na amígdala central. Os autores do trabalho discutem um pouco sobre trabalhos de neuroimagem onde haveria indícios de hiperativação amigdalар em indivíduos depressivos (para revisões sobre o assunto ver Drevets 1999, Price and Drevets). Porém, a resolução das técnicas de neuroimagem realizadas não permitem subdivisões da amígdala, impedindo uma definição de quais estariam envolvidas nesses efeitos. Outro estudo mostrando efeitos similares foi o de Beck (Beck 1995), onde a administração aguda de iprindol, nortriptilina, A-75200 (um inibidor da recaptação de catecolaminas; Firestone et al.,

1993) fluoxetina, desipramina, bupropiona ou tranilcipromina induziu aumento de células Fos-IR na porção central da amígdala. Os autores relatam a possibilidade de essa ser uma possível estrutura chave na ação antidepressiva das drogas testadas, embora a administração realizada no estudo tenha sido aguda e a resposta dos antidepressivos na clínica funcione apenas com o tratamento crônico. Além disso, os autores dizem que a administração repetida com desipramina em ratos submetidos a choques nas patas, induziu uma reversão do comportamento induzido por estresse e também alterou a expressão de Fos na amígdala central (Beck 1995). Vale lembrar que resultados similares com a administração repetida de desipramina ou fluoxetina foram encontrados neste estudo, porém, nas porções lateral e basolateral da amígdala e não na central. Assim como o discutido no trabalho de Beck e cols. (Beck, 1995), a ativação da porção central amigdaloide por administração aguda de antidepressivos pode ser vista como um mecanismo de ação comum a essas drogas, uma vez que praticamente todos os estudos que efetuam esse tipo de administração com antidepressivos, mostram esse mesmo resultado.

Além disso, é sabido que o tratamento com drogas antidepressivas induz efeitos ansiogênicos quando utilizados para o tratamento da depressão ou para o tratamento de transtornos relacionados à ansiedade (Lipinski et al., 1989, Amsterdam et al., 1994, Salchner and Singewald, 2002). Este efeito ansiogênico induzido por administração aguda de antidepressivos também acontece em modelos animais utilizados para estudo da ansiedade como o labirinto em cruz elevado (Handley and McBlane, 1993, Silva et al., 1999, Silva and Brandao, 2000), teste de interação social (File et al., 1999, To et al., 1999, To and Bagdy, 1999, Bristow et al., 2000, Dekeyne et al., 2000, Bagdy et al., 2001) e o teste da caixa claro-escuro (Griebel et al., 1994, Sanchez and Meier, 1997, Artaiz et al., 1998). Dessa forma, o aumento da ativação da região córtico-medial da

amígdala seria um indício desse efeito ansiogênico, evidenciando talvez, uma maior ativação das vias que levam a estruturas como PAG e PVN, contribuindo para a resposta de fuga e hiperativação do eixo HPA.

O tratamento repetido com imipramina aumentou o número de nNOS-IR na MeAm enquanto o tratamento repetido com fluoxetina apresentou uma tendência em diminuir o mesmo parâmetro na BIAm. A enzima NOS está presente em basicamente todos os núcleos amigdaloides (Rodrigo et al., 1994, Krukoff and Khalili, 1997), porém em padrões bastante diversos quando comparados os subnúcleos. Usunoff e cols. (2006), corroboram os dados aqui encontrados e trazem em seu trabalho que a porção medial seria aquela que possui, dentro da amígdala, uma das maiores populações de neurônios que contém nNOS com grande ramificação neuronal apresentando marcação positiva para NADPH-diaforase, uma medida indireta de localização da enzima. Talvez essa população de neurônios que expressam a enzima NOS na amígdala medial tenha um papel importante no desenvolvimento de comportamentos relacionados ao estresse ou no efeito do tipo antidepressivo induzido por algumas drogas, como a imipramina. Diferentes tipos de estresse podem aumentar a ativação de neurônios que expressam a enzima NOS na MeAm como a simples exposição a ambientes novos e estresse gerado por restrição (Krukoff and Khalili, 1997) e a exposição a predador (Guimaraes et al., 2005). Além disso, é sabido que a LTP na MeAm pode ser induzida por administração de doadores de óxido nítrico em fatias de cérebro (Abe et al., 1996) e que drogas que inibem ou bloqueiam diferentes elementos da via do NO podem bloquear a LTP nessa estrutura (Watanabe et al., 1995), o que não acontece na LAm. A LTP é um processo de plasticidade sináptica que está envolvido com aprendizado e memória e apesar de, na amígdala, este processo ter sido muito mais estudado na região basolateral, é bastante provável que a LTP na região córtico-medial também participem

dos mecanismos envolvidos principalmente na consolidação de memória aversiva (Dityatev and Bolshakov, 2005, Sigurdsson et al., 2007). Em conjunto, esses dados indicam a possibilidade de um papel bastante importante do sistema nitrérgico da MeAm na mediação de comportamentos reacionados ao estresse e memória.

4.3.3 Córtex pré-frontal

4.3.3.1 Resultados

O tratamento repetido, mas não o agudo, com desipramina induziu uma diminuição no número de células Fos-IR (ANOVA de uma via, $F_{2,28}=4,845$, $p=0,0156$; pós-teste de Dunnett, $p<0,05$), mas não alterou significativamente o número de células nNOS-IR (ANOVA de uma via, $F_{2,28}=3,009$, $p=0,0655$) na região infra-límbica do córtex pré-frontal medial. O tratamento com fluoxetina ou imipramina não alterou o número de células Fos-IR (fluoxetina: ANOVA de uma via, $F_{2,15}=1,348$, $p=0,2895$; e imipramina: teste t de student, $t_{29}=0,4623$, $p=0,6473$) ou nNOS-IR (fluoxetina: ANOVA de uma via, $F_{2,17}=3,057$, $p=0,0734$; e imipramina: teste t de student, $t_{29}=0,3422$, $p=0,7347$). Esses dados são mostrados na figura 35.

A contagem de células dupla-IR na região IL do mPFC dos animais resultou em um número muito baixo de células e por isso não foi inserido na análise estatística. Esses dados podem ser observados no anexo IV.

As análises de correlação entre o número de células imunorreativas e o número de falhas em escapar ou fugir dos choques no teste do LH na região IL do mPFC não indicou correlações significativas (Figura 36).

Figura 35. Efeito do tratamento com desipramina (primeira linha), fluoxetina (segunda linha) ou imipramina (terceira linha) sobre a Fos-IR ou nNOS-IR no córtex pré-frontal medial infra-límbico. Dados expressos em média $\pm$ SEM da porcentagem em relação à média apresentada pelo grupo Naïve.

Figura 36. Relação entre o número de células Fos-IR, nNOS-IR ou dupla-IR na região infra-límbica do córtex pré-frontal medial e o número de falhas em escapar ou fugir dos choques dos animais no teste do LH. A linha representa regressão linear dos dados apresentados.

Figura 37. Fotomicrografias representativas de secções coronais (40µm) da região IL do mPFC de um animal Naïve, de um animal tratado com PTZ, e de animais tratados com DES, FXT ou IMI e submetidos ao LH. Os cortes foram processados para imunohistoquímica para a detecção da proteína Fos e nNOS. Células Fos-IR em preto e nNOS-IR em marrom.

O tratamento repetido, mas não o agudo, com desipramina induziu uma diminuição no número de células Fos-IR (ANOVA de uma via, $F_{2,28}=6,378$, $p=0,0052$; pós-teste de Dunnett, $p<0,05$), mas não alterou significativamente o número de células nNOS-IR (ANOVA de uma via, $F_{2,28}=0,2122$, $p=0,8101$) na região pré-límbica do córtex pré-frontal medial. O tratamento com fluoxetina ou imipramina não alterou o número de células Fos-IR (fluoxetina: ANOVA de uma via, $F_{2,15}=1,648$, $p=0,2255$; e imipramina: teste t de student, $t_{29}=0,3784$, $p=0,7079$) ou nNOS-IR (fluoxetina: ANOVA de uma via, $F_{2,15}=1,165$, $p=0,3386$; e imipramina: teste t de student, $t_{29}=0,8735$, $p=0,3895$). Esses dados são mostrados na figura 38.

A contagem de células dupla-IR na região PL do mPFC dos animais resultou em um número muito baixo de células e por isso não foi inserido na análise estatística. Esses dados podem ser observados no anexo IV.

As análises de correlação entre o número de células imunorreativas e o número de falhas em escapar ou fugir dos choques no teste do LH na região IL do mPFC não indicou correlações significativas (Figura 39).

Figura 38. Efeito do tratamento com desipramina (primeira linha), fluoxetina (segunda linha) ou imipramina (terceira linha) sobre a Fos-IR ou nNOS-IR no córtex pré-frontal medial pré-límbico. Dados expressos em média $\pm$ SEM da porcentagem em relação à média apresentada pelo grupo Naïve.

Figura 39. Relação entre o número de células Fos-IR, nNOS-IR ou dupla-IR na região pré-límbica do córtex pré-frontal medial e o número de falhas em escapar ou fugir dos choques dos animais no teste do LH. A linha representa regressão linear dos dados apresentados.

Figura 40. Fotomicrografias representativas de secções coronais (40µm) da região PL do mPFC de um animal Naïve, de um animal tratado com PTZ, e de animais tratados com DES, FXT ou IMI e submetidos ao LH. Os cortes foram processados para imunohistoquímica para a detecção da proteína Fos e nNOS. Células Fos-IR em preto e nNOS-IR em marrom.

4.3.3.2 Discussão

O córtex pré-frontal medial destaca-se na literatura científica, com a demonstração recorrente e cada vez mais importante de sua participação da modulação dos “efeitos do controle sobre o estressor” (stressor controllability effects) (Baratta *et al.*, 2009). As funções básicas relacionadas com o mPFC são consideradas funções de alta ordem como tomada de decisões, memória e aprendizado, além de sua participação na modulação dos sistemas autonômico e neuroendócrino na resposta ao estresse (Czeh *et al.*, 2008). Assim, possíveis falhas no sistema, como redução de arborização dendrítica ou morte celular, acabam por comprometer o bom funcionamento do mPFC, podendo levar a consequências como o desenvolvimento de transtornos psiquiátricos relacionados ao estresse.

O mPFC possui grande número de conexões com diversas outras áreas do sistema límbico como, por exemplo, a amígdala, o hipocampo e o núcleo dorsal da rafe (Hartley e Phelps, 2010, Price e Drevets, 2009, Hoover e Vertes, 2007), que também estão envolvidos com a neurobiologia do estresse.

O córtex pré-frontal pode ser dividido, basicamente de acordo com suas conexões anatômicas e função entre porção ventro-medial e porção dorsolateral (Rosenkilde, 1979, Kringelbach and Rolls, 2004, Zald, 2007). A porção ventral compreende as porções infra-límbica e pré-límbica (Vertes, 2004). O IL teria como funções principais regulação da atividade visceral e autonômica, com projeções para o BST e vários núcleos da amígdala, entre outros; e o PL teria como funções principais a regulação de funções límbico-cognitivas. Com projeções para o núcleo accumbens, PVN, amígdala basolateral e rafe, entre outros (Vertes, 2004).

O grupo do prof. Steven Maier, um dos pioneiros a utilizar o modelo do desamparo aprendido, estudou parte do envolvimento do DRN no desenvolvimento das consequências comportamentais dos choques inescapáveis em ratos (Maier *et al.*, 1994, Maier *et al.*, 1995, Sutton *et al.*, 1997). Acredita-se que o desenvolvimento do estado de desamparo em ratos aconteça como resultado de uma potente ativação do DRN durante a exposição aos choques inescapáveis (Maswood *et al.*, 1998, Grahm *et al.*, 1999). A ativação dessa estrutura promove liberação de serotonina nas regiões inervadas pelas fibras oriundas do DRN como, por exemplo, a amígdala (Amat *et al.*, 1998), o mPFC (Bland *et al.*, 2003, Amat *et al.*, 2005) e o próprio DRN (Maswood *et al.*, 1998, Amat *et al.*, 2001). No entanto, essa intensa ativação do DRN promove dessensibilização dos receptores 5HT1A (inibitórios) no DRN, de modo que um estímulo estressante que for aplicado posteriormente levaria a uma descarga exagerada de serotonina nas regiões para onde os neurônios do DRN enviam suas projeções, o que então ocasionaria alterações comportamentais como congelamento e aumento de ansiedade (aumento de serotonina no PFC e na amígdala), prejuízo dos mecanismos de fuga (aumento de serotonina na dIPAG) e a hipervalorização de memórias aversivas (aumento de serotonina no hipocampo). Além disso, o DRN por si só, parece não ser capaz de processar se o estresse é controlável ou não. Esse processamento parece ser realizado ao menos em parte pelo mPFC que pode, por sua vez, através de suas aferências para o DRN, diminuir a ativação deste quando o estresse é controlável (Amat *et al.*, 2005). Esses resultados mostram a importância que o mPFC teria na resposta comportamental a estímulos estressantes, principalmente de origem psicossocial.

Pelo conhecimento dos autores, este é o primeiro trabalho que mostra o tratamento repetido com desipramina diminuindo o número de células Fos-IR no PL

e IL do cérebro de animais submetidos ao LH quando comparados com o cérebro de animais tratados com veículo. Isso indica que essas regiões do mPFC passam a ser menos recrutadas nos animais que passaram por esse tratamento repetido (mas não pelo tratamento agudo com a mesma droga, ou com o tratamento com as outras drogas testadas, fluoxetina ou imipramina). Esses resultados são corroborados por diversos trabalhos encontrados na literatura. Por exemplo, Duncan e cols. (Duncan *et al.*, 1996) mostraram que o tratamento repetido com desipramina (durante três semanas) antagonizou o aumento de células Fos-IR no mPFC em ratos submetidos ao FST, quando comparados com o cérebro de animais não tratados. No mesmo sentido, Jama e cols. (Jama *et al.*, 2008), mostraram que o tratamento repetido com desipramina antes da exposição de ratos ao FST, diminui os níveis do mRNA para c-fos no PFC. Ainda corroborando esses dados, há evidências de que o bloqueio do mPFC promove efeito tipo antidepressivo em modelos animais (Koenigs *et al.*, 2008, Hamani *et al.*, 2009, Scopinho *et al.*, 2010), assim, o efeito antidepressivo estaria relacionado com uma menor ativação dessa estrutura. Em indivíduos depressivos, alguns pesquisadores relatam indicações de hiperativação cortical (Fitzgerald *et al.*, 2008), embora a questão da hiper ou da hipoativação cortical na depressão ainda seja um pouco controversa (Drevets, 1999). Por exemplo, pacientes depressivos exibem uma maior ativação do mPFC e do córtex cingulado anterior (ACC) durante um teste envolvendo processamento de palavras negativas e autorreferência (Yoshimura *et al.*, 2010). No mesmo sentido, diversos tipos de estresse diferentes parecem eliciar um aumento de atividade do mPFC, incluindo o estresse induzido por nado forçado (Duncan *et al.*, 1993, Salchner *et al.*, 2004, Muigg *et al.*, 2007), restrição (Ostrander *et al.*, 2003) e choques inescapáveis (Li and Sawchenko, 1998, Bland *et al.*, 2005). Esse efeito de aumento da atividade no mPFC induzido por

estresse também é descrito como revertido pelo tratamento repetido com antidepressivos (Duncan et al., 1996, Muigg et al., 2007, Jama et al., 2008).

O trabalho de Silva (2012) mostra que a administração de fluoxetina, venlafaxina ou 7-NI é capaz de reverter o aumento do número de células Fos-IR induzido pelo estresse do nado forçado tanto no PL quanto no IL de ratos. Duncan e colaboradores (1996) também mostram que o tratamento repetido (três semanas) com imipramina impediu o aumento de células Fos-IR no mPFC de ratos induzido pela exposição ao nado forçado, igual ao tratamento com desipramina. No presente trabalho, o tratamento realizado com imipramina ou fluoxetina não induziu o mesmo tipo de efeito. Vale ressaltar que o FST e o LH apesar de ambos serem considerados modelos animais de depressão por muitos autores e serem bastante utilizados ao redor do mundo, possuem diferenças consideráveis, principalmente quanto ao agente estressor e à duração do modelo. Essas diferenças refletem não só no tipo de comportamento induzido por cada teste, mas, também, nas estruturas envolvidas e provavelmente na forma como cada agente estressor leva a ativação de cada estrutura no cérebro dos animais.

Nenhuma diferença significativa foi encontrada em relação ao número de células nNOS-IR, e a contagem de células duplamente marcadas levou a um número pequeno e difícil de analisar. Os dados relativos ao número de células dupla-IR podem ser visualizados no anexo III.

Em relação à via do NO no mPFC, diversos autores indicam sua possível participação em processos relacionados aos transtornos depressivos e outros transtornos psiquiátricos, sendo que a presença da NOS no mPFC já foi demonstrada há muito (Bredt et al., 1990, Bredt et al., 1991).

Trabalhos do nosso grupo de pesquisa mostram a relação da via do Glutamato-NO-sGC do mPFC na modulação de comportamentos relacionados à depressão, causados por estresse incontrolável (Pereira *et al.*, 2013; Pereira *et al.*, 2015). Pereira e cols. (2013) mostraram que o estresse pelo nado forçado induz ao aumento dos níveis de nitrito e nitrato (metabólitos do NO e uma medida indireta da produção local de NO) no mPFC de camundongos e que esse efeito foi revertido pela administração de PPADS, um antagonista purinérgico. Essa droga agiria sobre os receptores do tipo P2, que são canais iônicos os quais, uma vez abertos, permitem a entrada de cálcio nos neurônios. Essa entrada de cálcio pode levar à ativação da nNOS da mesma maneira que acontece com a ativação dos receptores NMDA pelo glutamato. Ademais, Pereira e cols. (2015) mostram que a administração de LY235959 (antagonista dos receptores NMDA) diretamente no PL ou no IL induz efeitos do tipo-antidepressivo, diminuindo o tempo de imobilidade no FST em ratos. Experimentos subsequentes mostram que a via como um todo está envolvida, uma vez que a administração de NPA (inibidor da nNOS) e ODQ (inibidor da sGC) também induz o mesmo efeito de diminuir o tempo de imobilidade no FST (Pereira *et al.*, 2015).

Sabe-se que esta mesma via também está envolvida na expressão do medo condicionado contextual (Resstel *et al.*, 2008). Tanto a resposta de congelamento quanto os parâmetros cardiovasculares analisados durante a reexposição dos animais à caixa onde antes receberam choques inescapáveis foram diminuídas com a administração de LY235959 (antagonista dos receptores NMDA), NPA (N^ω-propil-L-arginina, inibidor da nNOS) ou CPTIO (Carboxi-PTIO, sequestrador de NO) diretamente no mPFC. Além disso, camundongos *knock-out* para nNOS apresentam deficiências cognitivas relacionadas à funcionalidade do mPFC (Zoubovsky *et al.*,

2011), como um pior desempenho no teste do medo condicionado e no teste de reconhecimento de objetos, evidenciando a importância da nNOS para o funcionamento do mPFC.

Curiosamente, ao fazer a correlação do número de células nNOS-IR por 0.1mm^2 em relação ao número de falhas no teste, houve uma correlação positiva para o grupo tratado com veículo (Figura 39), isto é, quanto maior o número de células com nNOS no PL, maior o número de falhas no teste do desamparo. Considerando que essas células, quase que na sua totalidade não apresentaram dupla marcação (indicando que não teriam sido ativadas), e que por mais que a correlação tenha sido positiva, o número total de células nNOS-IR foi pequeno, dificultando conclusões claras a respeito. Mas, uma interpretação possível desse resultado seria que os animais com um maior número de células nNOS-IR no PL e, conseqüentemente, produzissem mais NO nessa região, estariam mais susceptíveis a falhar no teste do desamparo. Diversos tipos de estresse parecem favorecer a via do NO no mPFC, como estresse crônico de restrição (Gadek-Michalska et al., 2012), isolamento social crônico (Zlatkovic e Filipovic), e nado forçado (Murakami et al., 2009). Além disso, a redução de NO no PFC induz efeito tipo-antidepressivo, ao menos no FST(Pereira et al., 2013). Esse aumento de NO induzido por episódios de estresse repetido ou sustentado pode levar às disfunções do mPFC verificadas em animais de laboratório submetidos a essas situações, bem como em pacientes depressivos. Assim, uma maior expressão da enzima nessa estrutura pode indicar uma maior produção de NO mesmo em situações basais sem a exposição a estressores intensos, levando a uma predisposição ao aparecimento de comportamentos relacionados com a depressão.

Apesar do crescente número de trabalhos evidenciando a importância do NO do mPFC em processos relacionados a transtornos psiquiátricos, nossos resultados mostraram uma baixa marcação de células nNOS-IR no PL e no IL. Considerando que diversos trabalhos supracitados indicam que haveria um aumento da produção de NO após situações de estresse, imaginava-se que haveria, nos grupos de animais estressados, um aumento do número de células duplamente marcadas para Fos e nNOS, evidenciando que mais células que contêm essa enzima teriam sido ativadas. E mais, nos grupos cujo comportamento tipo depressivo foi revertido pelo tratamento com drogas, esperava-se uma reversão desse efeito de aumento da ativação de células duplamente marcadas.

Parece que a participação de neurônios capazes de produzir NO no mPFC não estariam sendo recrutados durante o teste do desamparo, nem no efeito de reversão desse comportamento induzido pela desipramina, fluoxetina ou imipramina. Porém, não é possível descartar a participação do NO como neuromodulador no comportamento analisado, uma vez que as análises feitas neste trabalho foram apenas em relação a neurônios que continham nNOS. O NO pode ser produzido por mais duas isoformas: a iNOS e a eNOS, ambas presentes no mPFC. Além disso, é importante ressaltar que as análises foram realizadas em apenas um momento (após o teste), relacionadas à expressão do comportamento de desamparo aprendido, de modo que isso não exclui uma possível participação do NO em outros momentos que poderiam contribuir, por exemplo, para o estabelecimento de alterações após o pré-teste que culminariam com a expressão do desamparo aprendido no dia do teste.

De qualquer maneira, houve aumento do número de células Fos-IR tanto no PL quanto no IL, o que aponta a possibilidade de outros neurônios não produtores

de NO estarem sendo recrutados perante o estímulo aplicado. Sabe-se que o mPFC possui diversos outros tipos de neurotransmissores além dos principais (GABA e Glutamato) como, por exemplo, a acetilcolina, a noradrenalina e a serotonina (Paxinos and Watson, 2004). Sendo assim, e sabendo da possibilidade de participação de outras substâncias nos comportamentos relacionados ao estresse e à depressão, outras neurotransmissões que não a nitrérgica com certeza participam também na modulação da resposta ao estresse dos choques nas patas, modulado pelo mPFC.

4.3.4 Núcleo leito da estria terminal

4.3.4.1 Resultados

O tratamento agudo ou repetido com desipramina ou fluoxetina não induziu alterações significativas no número de células Fos-IR (desipramina: ANOVA de uma via, $F_{2,28}=1,358$, $p=0,2735$; fluoxetina: ANOVA de uma via, $F_{2,13}=3,379$, $p=0,0658$), nNOS-IR (desipramina: ANOVA de uma via, $F_{2,28}=1,088$, $p=0,3507$; fluoxetina: ANOVA de uma via, $F_{2,13}=3,241$, $p=0,0721$) ou dupla-IR (desipramina: ANOVA de uma via, $F_{2,28}=0,1943$, $p=0,8245$) no núcleo leito da estria terminal. Já o tratamento repetido com imipramina aumentou o número de células dupla-IR (teste t de student, $t_{12}=3,755$, $p=0,0027$), mas não alterou significativamente o número de Fos-IR (teste t de student, $t_{25}=0,4726$, $t=0,6406$) ou de nNOS-IR (teste t de student, $t_{25}=0,03874$, $p=0,9644$). Os dados são mostrados na figura 41.

A contagem de células dupla-IR no BST dos animais do grupo tratado com fluoxetina resultou em um número muito baixo de células e por isso não foi inserido na análise estatística. Esses dados podem ser observados no anexo IV.

As análises de correlação entre o número de células imunorreativas e o número de falhas em escapar ou fugir dos choques no teste do LH na região MeAm não apontou correlações significativas (Figura 42).

Figura 41. Efeito do tratamento com desipramina (primeira linha), fluoxetina (segunda linha) ou imipramina (terceira linha) sobre a Fos-IR, nNOS-IR ou dupla-IR no núcleo leito da estria terminal. Dados expressos em média $\pm$ SEM da porcentagem em relação à média apresentada pelo grupo Naïve. ** = $p < 0,01$.

Figura 42. Relação entre o número de células Fos-IR, nNOS-IR ou dupla-IR no núcleo leito da estria terminal e o número de falhas em escapar ou fugir dos choques dos animais no teste do LH. A linha representa regressão linear dos dados apresentados.

Figura 43. Fotomicrografias representativas de secções coronais (40µm) da região BST de um animal Naïve, de um animal tratado com PTZ, e de animais tratados com DES, FXT ou IMI e submetidos ao LH. Os cortes foram processados para imunohistoquímica para a detecção da proteína Fos e nNOS. Células Fos-IR em preto e nNOS-IR em marrom.

4.3.4.2 Discussão

O BST é uma estrutura assim nomeada devido à sua localização, em uma das extremidades da estria terminal, um feixe de axônios que o conecta com o complexo amigdalóide (Dumont, 2009). Estudos sobre suas conexões sugerem que o BST seria um núcleo relé que coordenaria a atividade de sistemas autonômicos, neuroendócrinos e somático-motores, organizando as informações recebidas (Prewitt and Herman, 1998, Dong and Swanson, 2003, 2004, 2006, Crestani et al., 2013). Uma das vias na qual o BST desempenharia essa função é o eixo sistema límbico – HPA (Forray and Gysling, 2004, Choi et al., 2007, Choi et al., 2008a, Choi et al., 2008b, Evanson et al., 2009). Esse sistema teria como estruturas chave o PFC, o hipocampo e a amígdala como modulares límbicos do eixo; e o BST como núcleo de processamento das informações enviando então o comando resultante ao PVN, que efetuará a ação de acordo com a informação recebida (Choi et al., 2007, Choi et al., 2008a, Choi et al., 2008b).

Já foi demonstrado que o BST pode ser ativado por diferentes estímulos estressantes como estresse por nado forçado (Muigg et al., 2007), labirinto em cruz elevado (Beijamini and Guimaraes, 2006b), e estresse por choques nas patas (Greenwood et al., 2005a). Essa ativação em decorrência do estresse parece ser diminuída com a administração de antidepressivos (Muigg et al., 2007, Silva et al., 2012). Além disso, a inativação do BST utilizando-se microinjeções locais de cloreto de cobalto (um inibidor não específico de sinapses) induz a diminuição do tempo de imobilidade no teste do nado forçado em ratos, um efeito do tipo antidepressivo (Crestani et al., 2010). Esses efeitos parecem ser mediados por receptores da neurotransmissão noradrenérgica (Nagai et al., 2013). Outros estudos utilizaram

lesões no BST para verificar sua participação em comportamentos relacionados ao estresse. Treit e cols. (1998) mostraram que lesões na amígdala e na área septal lateral induziram efeitos ansiolíticos no teste do labirinto em cruz elevado e no teste de enterrar defensivo, e esse efeito não foi apresentado pelos animais com lesões no BST (Treit et al., 1998). Outros mostraram que lesões no BST aumentaram o tempo de imobilidade no nado forçado (Schulz and Canbeyli, 2000, Pezuk et al., 2006), mas sem induzir modificações significativas no desempenho dos animais no teste do labirinto aquático de Morris. Esses dados indicariam uma participação importante do BST no comportamento de imobilidade, porém dissociado dos componentes cognitivos (Pezuk et al., 2006). Também já foi mostrado que lesões químicas no BST bloqueiam a potencialização do comportamento de congelamento e o aumento das falhas em escapar de choques no teste do desamparo aprendido (Hammack et al., 2004). Choques inescapáveis além de ativar, parecem sensibilizar os neurônios (especialmente da porção anterior) do BST (Greenwood et al., 2005b). Além disso, a atividade do BST tem sido relacionada com comportamento de anedonia induzido pelo modelo do estresse crônico variado (Stout, 2000).

Dessa forma o BST parece necessário para o desenvolvimento de uma série de comportamentos apresentados no animal desamparado, tanto os relacionados ao medo/ansiedade quanto os relacionados à depressão.

Primeiramente, os resultados deste trabalho mostram um aumento no número de células Fos-IR nos grupos estressados em relação ao grupo naïve, que não passou pelos choques nas patas. Trabalhos na literatura corroboram estes resultados, onde o estresse do nado forçado aumentou o número de células Fos-IR no BST de ratos (Wulsin et al., 2010, Silva et al., 2012, Choi et al., 2013). Os resultados encontrados neste trabalho não mostram alterações no número de

células imunorreativas para as proteínas analisadas no BST induzidas pelo tratamento com as drogas utilizadas. Nos trabalhos supracitados, tanto no trabalho de Wulsin e cols. (2010) quanto no de Choi e cols. (2013), o tratamento com antidepressivos não foi capaz de contrapor o aumento de células Fos-IR induzido pelo estresse. Apenas no trabalho de Silva e cols. (2012) houve uma diminuição no número células Fos-IR, comparável ao grupo naïve. O fato de o tipo de estressor e o desenho experimental dos testes ser diferente pode explicar ao menos em parte tais resultados. O FST é um teste que utiliza normalmente tratamento agudo com drogas (três injeções num intervalo de 24h), diferente do LH que utiliza um tratamento repetido (sete injeções num intervalo de sete dias). Apesar de os dois serem considerados modelos animais de depressão, há uma clara diferença tanto nos efeitos do estressor quanto do tratamento aos quais os animais são submetidos, influenciando certamente no padrão de ativação de diferentes estruturas cerebrais.

Apesar da via nitrérgica no BST ainda ter sido pouco explorada quanto à sua participação em comportamentos relacionados ao estresse, há indícios da literatura de que há neurônios que expressam nNOS em diversas regiões que compõe o BST (Du and Hull, 1999, Steinbusch et al., 2000, Beijamini and Guimaraes, 2006b, a, Usunoff et al., 2006, Real et al., 2008, Martini et al., 2010). Silva e cols. (2012) mostraram que o estresse induzido pelo nado forçado foi capaz de aumentar o número de células Fos-IR no BST e o tratamento com 7-NI, uma droga que inibe preferencialmente a nNOS foi capaz de diminuir esse efeito do estresse. No mesmo sentido, Beijamini e cols. mostraram que a exposição de ratos a um gato vivo aumentava o número de células duplamente marcadas para Fos e NADPH-d (Beijamini et al., 2006b), o que não acontece quando o animal é exposto ao teste do labirinto em cruz elevado (Beijamini et al., 2006a). A exposição dos ratos aos

choques inescapáveis nas patas não induziu mudanças significativas no número de células nNOS-IR ou dupla-IR, porém o tratamento repetido com imipramina foi capaz de aumentar o número de células dupla-IR. Esses resultados são um pouco contraditórios, mas podem estar relacionados, mais uma vez, com o tipo de estresse desencadeado. Além disso, o próprio BST é uma estrutura que, hoje em dia possui uma série de subdivisões anatômicas e várias delas com funções distintas e até antagônicas já relacionadas na literatura (Choi et al., 2007). Por exemplo, parece haver uma grande diferença quanto ao tipo de modulação exercida ao longo do eixo antero-posterior do BST sobre o eixo HPA, onde a porção anterior (principalmente a antero-ventral) estaria relacionada à modulação excitatória do eixo HPA enquanto a porção posterior estaria envolvida na inibição do eixo. Dessa forma, análises mais refinadas dos subnúcleos do BST poderiam levar a efeitos significativos quanto à contagem de células, porém isso não foi realizado até o presente momento.

4.3.5 Núcleo paraventricular do hipotálamo

4.3.5.1 Resultados

O tratamento agudo ou repetido com desipramina ou fluoxetina, ou o tratamento repetido com imipramina não induziu alterações significativas no número de células Fos-IR (desipramina: ANOVA de uma via, $F_{2,29}=1,654$, $p=0,2087$; fluoxetina: ANOVA de uma via, $F_{2,11}=1,048$, $p=0,3831$; imipramina: teste t de student, $t_{29}=0,854$, $p=0,4001$), nNOS-IR (desipramina: ANOVA de uma via, $F_{2,29}=0,2464$, $p=0,7833$; fluoxetina: ANOVA de uma via, $F_{2,11}=0,7627$, $p=0,4896$; imipramina: teste t de student, $t_{29}=1,945$, $p=0,0615$) ou dupla-IR (desipramina: ANOVA de uma via,

$F_{2,28}=0,6044$, $p=0,5534$, fluoxetina: ANOVA de uma via, $F_{2,13}=1,174$, $p=0,3397$; imipramina: teste t de student, $t_{24}=1,977$, $p=0,0597$) na região magnocelular do PVN. Os dados são apresentados na figura 44.

As análises de correlação entre o número de células imunorreativas e o número de falhas em escapar ou fugir dos choques no teste do LH na região magnocelular do PVN não apontou correlações significativas (Figura 45).

Figura 44. Efeito do tratamento com desipramina (primeira linha), fluoxetina (segunda linha) ou imipramina (terceira linha) sobre a Fos-IR, nNOS-IR ou dupla-IR no núcleo paraventricular do hipotálamo, porção magnocelular. Dados expressos em média $\pm$ SEM da porcentagem em relação à média apresentada pelo grupo Naive.

Figura 45. Relação entre o número de células Fos-IR, nNOS-IR ou dupla-IR na região magnocelular do PVN e o número de falhas em escapar ou fugir dos choques dos animais no teste do LH. A linha representa regressão linear dos dados apresentados.

Figura 46. Fotomicrografias representativas de secções coronais (40µm) da região mPVN de um animal Naïve, de um animal tratado com PTZ, e de animais tratados com DES, FXT ou IMI e submetidos ao LH. Os cortes foram processados para imunohistoquímica para a detecção da proteína Fos e nNOS. Células Fos-IR em preto e nNOS-IR em marrom.

O tratamento agudo ou repetido com desipramina ou fluoxetina, ou o tratamento repetido com imipramina não induziu alterações significativas no número de células Fos-IR (desipramina: ANOVA de uma via, $F_{2,29}=0,9009$, $p=0,4173$; fluoxetina: ANOVA de uma via, $F_{2,13}=0,779$, $p=0,4791$; imipramina: teste t de student, $t_{29}=1,045$, $p=0,3048$) ou nNOS-IR (desipramina: ANOVA de uma via, $F_{2,29}=0,6196$, $p=0,5452$; fluoxetina: ANOVA de uma via, $F_{2,13}=0,6227$, $p=0,5518$; imipramina: teste t de student, $t_{29}=0,8509$, $p=0,4018$). O tratamento repetido com desipramina ou imipramina induziu uma diminuição do número de células dupla-IR (desipramina: ANOVA de uma via, $F_{2,29}=4,093$, $p=0,0272$ – pós-teste de Dunnett, $p<0,05$; imipramina: teste t de student, $t_{29}=2,42$, $p=0,0220$), o que não aconteceu com o grupo tratado com fluoxetina (ANOVA de uma via, $F_{2,13}=1,793$, $p=0,2052$). Os dados são apresentados na figura 47.

As análises de correlação entre o número de células imunorreativas e o número de falhas em escapar ou fugir dos choques no teste do LH na região parvocelular do PVN não apontou correlações significativas (Figura 48).

Figura 47. Efeito do tratamento com desipramina (primeira linha), fluoxetina (segunda linha) ou imipramina (terceira linha) sobre a Fos-IR, nNOS-IR ou dupla-IR no núcleo paraventricular do hipotálamo, porção parvocelular. Dados expressos em média $\pm$ SEM da porcentagem em relação à média apresentada pelo grupo Naïve. * = $p < 0,05$.

Figura 48. Relação entre o número de células Fos-IR, nNOS-IR ou dupla-IR na região parvocelular do PVN e o número de falhas em escapar ou fugir dos choques dos animais no teste do LH. A linha representa regressão linear dos dados apresentados.

Figura 49. Fotomicrografias representativas de secções coronais (40µm) da região pPVN de um animal Naïve, de um animal tratado com PTZ, e de animais tratados com DES, FXT ou IMI e submetidos ao LH. Os cortes foram processados para imunohistoquímica para a detecção da proteína Fos e nNOS. Células Fos-IR em preto e nNOS-IR em marrom.

4.3.5.2 Discussão

O PVN é uma estrutura composta basicamente de dois grandes grupos celulares. As células do sistema secretório magnocelular do PVN são células que projetam para a neuro-hipófise, sendo neurônios produtores de arginina vasopressina (AVP) e ocitocina. As células da região parvocelular fazem parte do chamado sistema túberohipofisário do PVN e são células que projetam para a camada externa da eminência média. Esses neurônios modulam a secreção de hormônios pela adenohipófise: hormônio do crescimento, hormônio adrenocorticotrófico (ACTH), hormônio luteinizante e hormônio tireóideo-estimulante (Armstrong 2004). O PVN se encontra, portanto, numa posição importantíssima tanto para o eixo HPA quanto para modulação de sistemas como o eixo hipotálamo-hipófise-gônadas e outros. O PVN também recebe modulação de diversas estruturas como, por exemplo, o hipocampo, o PFC e a amígdala. Porém, existem muito poucas ou quase nenhuma evidência anatômica de conexões diretas dessas estruturas límbicas com o PVN (Cullinan, Herman et al. 1993, Prewitt and Herman 1998). Como já discutido, o BST recebe projeções do hipocampo, PFC e amígdala (Canteras and Swanson 1992, Dong, Petrovich et al. 2001, Vertes 2004) e envia projeções para o PVN (Sawchenko and Swanson 1983, Dong, Petrovich et al. 2001, Dong and Swanson 2004). Além disso, a estimulação do BST aumenta a atividade do eixo HPA e a lesão dessa área diminui a secreção de ACTH induzida por estresse e de corticosterona (Herman, Cullinan et al. 1994, Zhu, Umegaki et al. 2001, Crane, Buller et al. 2003, Choi, Furay et al. 2007).

Como já mencionado anteriormente, o eixo HPA tem uma ligação muito próxima com o comportamento de enfrentamento ao estresse de um indivíduo e,

uma vez desregulado, pode contribuir para o desenvolvimento de transtornos psiquiátricos como os relacionados à depressão e ansiedade.

Um grande número de trabalhos na literatura relata o aumento da expressão de Fos no PVN após a exposição dos mais variados tipos de agentes estressores (para revisão ver Senba and Ueyama, 1997, Kovacs, 1998). Os resultados aqui apresentados também seguem no mesmo sentido da literatura, mostrando um aumento expressivo no número de células Fos-IR no PVN nos grupos estressados em relação ao grupo naïve. Porém o tratamento com desipramina, fluoxetina ou imipramina não diminuiu o número de células Fos-IR como esperado. Alguns trabalhos na literatura mostram, utilizando o estresse do nado forçado, resultados onde o estresse induz aumento no número de células Fos-IR enquanto o tratamento repetido com antidepressivos diminui essa marcação no PVN (Duncan et al., 1996, Jama et al., 2008, Silva et al., 2012). Silva e cols. (2012), por exemplo, mostraram que o estresse do nado forçado aumentou, e o tratamento repetido com fluoxetina, venlafaxina e 7-NI foi capaz de diminuir o número de células Fos-IR no PVN. Por sua vez, usando paroxetina, o estudo de Muigg e cols. mostra o efeito de diminuição no número de células Fos-IR na região parvocelular do PVN, também aumentado pelo estresse do nado forçado (Muigg, Hoelzl et al. 2007). Nos casos citados, o tipo diferente de estímulo estressante (nado forçado enquanto no presente estudo o estresse foi de choque nas patas) pode também ser um dos motivos da diferença nas respostas encontradas por esses trabalhos e o apresentado aqui.

Beck e Fibiger (Beck and Fibiger 1995), utilizando-se também do estresse de choque nas patas, observaram que o estresse aumentou o número de células Fos-IR em diversas estruturas inclusive no hipotálamo. Nesse estudo o tratamento repetido com desipramina diminuiu a expressão de Fos em determinadas estruturas

como o cíngulo anterior, núcleo central da amígdala e giro denteado do hipocampo dorsal. Porém, assim como o observado no presente estudo, o tratamento repetido com desipramina não foi capaz de atenuar a marcação de células Fos-IR no hipotálamo. Uma possível explicação seria que a desipramina induziria seus efeitos antiaversivos nesses casos sem grande influência no hipotálamo ou talvez levasse a uma ativação de diferentes populações neuronais dentro dessa estrutura, uma vez que a marcação para Fos permite apenas a visualização de células que teriam sido ativadas, independente de outras características dessas células, como os tipos de neurotransmissores presentes.

Diversos estudos utilizando imunohistoquímica ou histoquímica já demonstraram a presença da NOS em células tanto na região magnocelular quanto na região parvocelular do PVN (Arevalo et al., 1992, Bhat et al., 1996, Ceccatelli et al., 1996, Nylen et al., 2001, Gao et al., 2014). E o NO produzido nessas regiões parece participar na regulação do eixo HPA (Bhat et al., 1996, Mancuso et al., 2010, Ruginsk et al., 2015). Primeiramente, diversos tipos diferentes de estressores parecem de alguma forma aumentar o número de células que contém nNOS ou aumentar a atividade da NOS no PVN em ratos. O estresse do nado forçado é capaz de induzir aumento no número de neurônios que contém nNOS no PVN (Sanchez et al., 1999, Silva et al., 2012), assim como o estresse induzido pela administração de LPS e o estresse por restrição em ratos (Yang et al., 1999), e o estresse por imobilização (Kishimoto et al., 1996). O estresse induzido pela administração de endotoxinas também aumenta as quantidades de mRNA para nNOS em ratos (Lee et al., 1995), e, in vitro, induzir a atividade da nNOS (Kostoglou-Athanassiou et al., 1998). Considerando a participação do NO sobre o eixo, esse parece agir de forma a inibir o eixo. Já foi demonstrado que, in vitro, o aumento da atividade da NOS

induzida por administração de endotoxinas inibe a liberação de CRH (Kostoglou-Athanassiou et al., 1998), e também que a inibição sustentada da NOS pela administração repetida de L-NAME (inibidor da NOS) leva a uma resposta de liberação exagerada de ACTH induzida por exercício físico (Jankord et al., 2009). A administração de L-NAME também parece diminuir o efeito induzido por choques em ratos, efeito esse de aumentar o mRNA de CRF e VP (Rivier, 1998, Lee et al., 1999), e a administração ICV de um doador de NO (SIN-1) parece estimular células CRFérgicas e vasopressinérgicas no PVN (Lee et al., 1999).

O tratamento repetido com desipramina aumenta o número de células dupla-IR, enquanto o tratamento repetido com imipramina ou fluoxetina diminui o número de células dupla-IR na região parvoceular do PVN. Gao e cols. (2014) trazem em seu trabalho um estudo de colocalização de nNOS com CRF, VP e oxitocina no PVN. Nesse estudo, os autores explicam que encontraram um valor auto no número de células do PVN com colocalização de OXT e nNOS, muito poucos neurônios com colocalização de nNOS e VP e praticamente nenhuma colocalização de nNOS com CRF. É sabido que a ocitocina no PVN, além de outras funções, pode estar relacionado com a diminuição da atividade do eixo HPA, diminuindo a secreção de ACTH (Legros, 2001, Bao et al., 2008), e antagonizando os efeitos da vasopressina, que seria responsável por manter a habilidade do PVN em responder com secreção de ACTH mesmo em situações onde há uma alta concentração de corticosteroides circulantes, como em situações de estresse repetido ou depressão (Aguilera and Rabadan-Diehl, 2000). Esse caráter antagônico das duas substâncias poderia explicar os resultados contraditórios aqui apresentados. Uma vez que a dupla marcação de Fos e nNOS não permite revelar outras características das células em questão, diferentes drogas antidepressivas poderiam influenciar diferentes

populações de células no PVN, ou influenciar as populações de células de forma diferente, resultando na maior ou menor dupla marcação para nNOS e Fos. Nesse sentido, também se sabe que as projeções de neurônios serotoninérgicos e noradrenérgicos para o PVN possuem padrões distintos (Sawchenko et al., 1983) o que poderia resultar em uma modulação de diferentes populações de neurônios no PVN.

5 DISCUSSÃO GERAL

De uma forma geral, a busca por uma via comum final que fosse responsável pela gênese do transtorno depressivo e/ou responsável pelo efeito dos antidepressivos tem sido alvo constante de estudos sobre a neurobiologia da depressão e comportamentos relacionados (Stone et al., 2008). Williamson (2011) defende que o desafio da atualidade seria encontrar as vias finais comuns aos transtornos psiquiátricos, muito mais do que tentar definir a contribuição específica de cada componente de sua etiologia. Os estudos de neuroimagem estão cada vez mais avançados, com melhorias crescentes de sua resolução técnica, oferecendo um entendimento cada vez maior das redes neurais e circuitos que estão envolvidos na neurobiologia da depressão. Os circuitos associados com o processamento de informação emocional estão sendo extensivamente estudados (Phillips et al., 2003, Price and Drevets, 2009, Belzung et al., 2015). Os processos neuropsicológicos importantes para a percepção emocional envolveriam a identificação do significado emocional de um estímulo ambiental, a produção de um estado afetivo e um comportamento emocional, e a regulação desse estado afetivo e desse comportamento emocional, permitindo que toda uma complexa resposta sentimental, afetiva e comportamental fosse adequada aos seus devidos contextos. Para isso, seriam importantes principalmente dois sistemas: um ventral e um dorsal. O sistema ventral compreenderia a amígdala, o mPFC e outras estruturas, e seria responsável pela identificação do significado emocional do estímulo ambiental apresentado, resultando na gênese de um estado emocional. O sistema dorsal compreenderia o hipocampo, o mPFC e outros, e seria responsável pela integração dos processos cognitivos regulando-os e sendo responsável por tarefas executivas como atenção e

planejamento de ação (Phillips et al., 2003). Além dos estudos de neuroimagem e funcionais, estudos mais profundos são necessários para um esclarecimento dos mecanismos moleculares que estariam envolvidos no funcionamento incorreto de estruturas específicas dentro do neurocircuito envolvido com o desenvolvimento da depressão. Nesse ínterim, o desenvolvimento cada vez maior das técnicas de biologia molecular estão sendo muito bem aproveitados em busca de respostas cada vez mais afinadas quando ao papel de cada molécula e neurônio. Os resultados que foram obtidos no presente trabalho não são de fato muito conclusivos, mas a maioria é corroborada pelas propostas a respeito da neurobiologia da depressão vigentes. Principalmente os resultados encontrados com o tratamento repetido com a desipramina no mPFC, HPC e amígdala. O tratamento com desipramina foi capaz de diminuir o número de células Fos-IR nessas estruturas de uma forma geral, e no caso da amígdala, apenas na porção basolateral, indicando uma diminuição na ativação dessas regiões. Os resultados apresentados dizem respeito ao comportamento de desamparo aprendido em ratos, e não dão muito mais informações a respeito de como as células que contém nNOS poderiam estar envolvidas nesse comportamento, porém abrem questões mais específicas quanto à participação do sistema nitrérgico dentro de cada região na modulação dos comportamentos apresentados.

6 CONCLUSÕES

Os resultados aqui apresentados vão, dadas as devidas ressalvas, ao encontro do modelo teórico de um neurocircuito responsável pela mediação de comportamentos defensivos relacionados aos transtornos psiquiátricos, onde há um claro envolvimento das estruturas aqui analisadas. Apesar disso, de uma maneira geral, os resultados não corresponderam à expectativa a respeito da participação de neurônios que produzem nNOS no comportamento de desamparo e no efeito tipo-antidepressivo induzido pela desipramina, fluoxetina ou imipramina. Os resultados aqui encontrados apresentam falhas já discutidas, bem como limitações resultantes das técnicas escolhidas no trabalho. Talvez com a subclassificação dos neurônios que contêm nNOS quantificados, seria possível observar resultados que ajudassem a esclarecer melhor o papel da via nitrérgica dentro desse circuito. Em alguns casos, como o do BST, o desmembramento da estrutura em subestruturas, talvez pudesse trazer resultados mais claros quanto à participação desta no comportamento estudado. Mesmo com essas limitações o trabalho abre alguns caminhos, com a formulação de algumas questões mais específicas a serem elucidadas nos próximos trabalhos do grupo de pesquisa. A busca pela identificação de subpopulações específicas de neurônios que expressam a nNOS talvez seja a principal delas, buscando compreender quais são esses tipos de neurônios, os transmissores existentes neles, suas conexões específicas e como eles se comportam frente a estímulos aversivos, agudos e sustentados. Com o advento desses próximos estudos, espera-se formular um cenário cada vez mais completo da participação de cada estrutura dentro desse neurocircuito do estresse e depressão, e principalmente da participação do sistema nitrérgico dentro desse contexto.

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- (2011) American Heritage Dictionary of the English Language. In: American Heritage Dictionary of the English Language www.thefreedictionary.com.
- Abe K, Watanabe Y, Saito H (1996) Differential role of nitric oxide in long-term potentiation in the medial and lateral amygdala. *Eur J Pharmacol* 297:43-46.
- Adrien J, Dugovic C, Martin P (1991) Sleep-wakefulness patterns in the helpless rat. *Physiol Behav* 49:257-262.
- Aguilera G, Rabadan-Diehl C (2000) Vasopressinergic regulation of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis: implications for stress adaptation. *Regul Pept* 96:23-29.
- Amsterdam JD, Hornig-Rohan M, Maislin G (1994) Efficacy of alprazolam in reducing fluoxetine-induced jitteriness in patients with major depression. *J Clin Psychiatry* 55:394-400.
- Anderson DC, Cole J, McVaugh W (1968) Variations in unsignaled inescapable preshock as determinants of responses to punishment. *J Comp Physiol Psychol* 65:Suppl:1-17.
- Arevalo R, Sanchez F, Alonso JR, Carretero J, Vazquez R, Aijon J (1992) NADPH-diaphorase activity in the hypothalamic magnocellular neurosecretory nuclei of the rat. *Brain Res Bull* 28:599-603.
- Arora DK, Cosgrave AS, Howard MR, Bubb V, Quinn JP, Thippeswamy T (2007) Evidence of postnatal neurogenesis in dorsal root ganglion: role of nitric oxide and neuronal restrictive silencer transcription factor. *J Mol Neurosci* 32:97-107.
- Artaiz I, Zazpe A, Del Rio J (1998) Characterization of serotonergic mechanisms involved in the behavioural inhibition induced by 5-hydroxytryptophan in a modified light-dark test in mice. *Behav Pharmacol* 9:103-112.
- Artigas F (2013) Developments in the field of antidepressants, where do we go now? *Eur Neuropsychopharmacol* 25:657-670.
- Bagdy G, Graf M, Anheuer ZE, Modos EA, Kantor S (2001) Anxiety-like effects induced by acute fluoxetine, sertraline or m-CPP treatment are reversed by pretreatment with the 5-HT_{2C} receptor antagonist SB-242084 but not the 5-HT_{1A} receptor antagonist WAY-100635. *Int J Neuropsychopharmacol* 4:399-408.

- Baisley SK, Cloninger CL, Bakshi VP (2011) Fos expression following regimens of predator stress versus footshock that differentially affect prepulse inhibition in rats. *Physiol Behav* 104:796-803.
- Bao AM, Meynen G, Swaab DF (2008) The stress system in depression and neurodegeneration: focus on the human hypothalamus. *Brain Res Rev* 57:531-553.
- Beck CH (1995) Acute treatment with antidepressant drugs selectively increases the expression of c-fos in the rat brain. *J Psychiatry Neurosci* 20:25-32.
- Beck CH, Fibiger HC (1995) Chronic desipramine alters stress-induced behaviors and regional expression of the immediate early gene, c-fos. *Pharmacol Biochem Behav* 51:331-338.
- Beijamini V, Guimaraes FS (2006a) Activation of neurons containing the enzyme nitric oxide synthase following exposure to an elevated plus maze. *Brain Res Bull* 69:347-355.
- Beijamini V, Guimaraes FS (2006b) c-Fos expression increase in NADPH-diaphorase positive neurons after exposure to a live cat. *Behav Brain Res* 170:52-61.
- Belzung C, Willner P, Philippot P (2015) Depression: from psychopathology to pathophysiology. *Curr Opin Neurobiol* 30:24-30.
- Bhat G, Mahesh VB, Aguan K, Brann DW (1996) Evidence that brain nitric oxide synthase is the major nitric oxide synthase isoform in the hypothalamus of the adult female rat and that nitric oxide potently regulates hypothalamic cGMP levels. *Neuroendocrinology* 64:93-102.
- Bilang-Bleuel A, Rech J, De Carli S, Holsboer F, Reul JM (2002) Forced swimming evokes a biphasic response in CREB phosphorylation in extrahypothalamic limbic and neocortical brain structures in the rat. *Eur J Neurosci* 15:1048-1060.
- Bishop JM (1985) Viral oncogenes. *Cell* 42:23-38.
- Bland ST, Schmid MJ, Der-Avakian A, Watkins LR, Spencer RL, Maier SF (2005) Expression of c-fos and BDNF mRNA in subregions of the prefrontal cortex of male and female rats after acute uncontrollable stress. *Brain Res* 1051:90-99.
- Blier P (2010) The well of novel antidepressants: running dry. *J Psychiatry Neurosci* 35:219-220.

- Booij L, Van der Does AJ, Riedel WJ (2003) Monoamine depletion in psychiatric and healthy populations: review. *Mol Psychiatry* 8:951-973.
- Bougarel L, Guitton J, Zimmer L, Vaugeois JM, El Yacoubi M (2011) Behaviour of a genetic mouse model of depression in the learned helplessness paradigm. *Psychopharmacology (Berl)* 215:595-605.
- Bredt DS, Glatt CE, Hwang PM, Fotuhi M, Dawson TM, Snyder SH (1991) Nitric oxide synthase protein and mRNA are discretely localized in neuronal populations of the mammalian CNS together with NADPH diaphorase. *Neuron* 7:615-624.
- Bredt DS, Hwang PM, Snyder SH (1990) Localization of nitric oxide synthase indicating a neural role for nitric oxide. *Nature* 347:768-770.
- Bristow LJ, O'Connor D, Watts R, Duxon MS, Hutson PH (2000) Evidence for accelerated desensitisation of 5-HT(2C) receptors following combined treatment with fluoxetine and the 5-HT(1A) receptor antagonist, WAY 100,635, in the rat. *Neuropharmacology* 39:1222-1236.
- Cai N, Chang S, Li Y, Li Q, Hu J, Liang J, Song L, Kretzschmar W, Gan X, Nicod J, Rivera M, Deng H, Du B, Li K, Sang W, Gao J, Gao S, Ha B, Ho HY, Hu C, Hu Z, Huang G, Jiang G, Jiang T, Jin W, Li G, Lin YT, Liu L, Liu T, Liu Y, Lu Y, Lv L, Meng H, Qian P, Sang H, Shen J, Shi J, Sun J, Tao M, Wang G, Wang J, Wang L, Wang X, Yang H, Yang L, Yin Y, Zhang J, Zhang K, Sun N, Zhang W, Zhang X, Zhang Z, Zhong H, Breen G, Marchini J, Chen Y, Xu Q, Xu X, Mott R, Huang GJ, Kendler K, Flint J (2015) Molecular signatures of major depression. *Curr Biol* 25:1146-1156.
- Calabrese V, Mancuso C, Calvani M, Rizzarelli E, Butterfield DA, Stella AM (2007) Nitric oxide in the central nervous system: neuroprotection versus neurotoxicity. *Nat Rev Neurosci* 8:766-775.
- Campeau S, Hayward MD, Hope BT, Rosen JB, Nestler EJ, Davis M (1991) Induction of the c-fos proto-oncogene in rat amygdala during unconditioned and conditioned fear. *Brain Res* 565:349-352.
- Canossa M, Giordano E, Cappello S, Guarnieri C, Ferri S (2002) Nitric oxide down-regulates brain-derived neurotrophic factor secretion in cultured hippocampal neurons. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99:3282-3287.
- Caspi A, Sugden K, Moffitt TE, Taylor A, Craig IW, Harrington H, McClay J, Mill J, Martin J, Braithwaite A, Poulton R (2003) Influence of life stress on depression: moderation by a polymorphism in the 5-HTT gene. *Science* 301:386-389.

- Castren E (2005) Is mood chemistry? *Nat Rev Neurosci* 6:241-246.
- Ceccatelli S, Grandison L, Scott RE, Pfaff DW, Kow LM (1996) Estradiol regulation of nitric oxide synthase mRNAs in rat hypothalamus. *Neuroendocrinology* 64:357-363.
- Chen X, Herbert J (1995) Regional changes in c-fos expression in the basal forebrain and brainstem during adaptation to repeated stress: correlations with cardiovascular, hypothermic and endocrine responses. *Neuroscience* 64:675-685.
- Choi DC, Evanson NK, Furay AR, Ulrich-Lai YM, Ostrander MM, Herman JP (2008a) The anteroventral bed nucleus of the stria terminalis differentially regulates hypothalamic-pituitary-adrenocortical axis responses to acute and chronic stress. *Endocrinology* 149:818-826.
- Choi DC, Furay AR, Evanson NK, Ostrander MM, Ulrich-Lai YM, Herman JP (2007) Bed nucleus of the stria terminalis subregions differentially regulate hypothalamic-pituitary-adrenal axis activity: implications for the integration of limbic inputs. *J Neurosci* 27:2025-2034.
- Choi DC, Furay AR, Evanson NK, Ulrich-Lai YM, Nguyen MM, Ostrander MM, Herman JP (2008b) The role of the posterior medial bed nucleus of the stria terminalis in modulating hypothalamic-pituitary-adrenocortical axis responsiveness to acute and chronic stress. *Psychoneuroendocrinology* 33:659-669.
- Choi SH, Chung S, Cho JH, Cho YH, Kim JW, Kim JM, Kim HJ, Shin KH (2013) Changes in c-Fos Expression in the Forced Swimming Test: Common and Distinct Modulation in Rat Brain by Desipramine and Citalopram. *Korean J Physiol Pharmacol* 17:321-329.
- Ciraulo DAS, R. I. (2004) *Pharmacotherapy of Depression*. Totowa, New Jersey: Humana Press.
- Connor TJ, Kelly JP, Leonard BE (1998) Forced swim test-induced endocrine and immune changes in the rat: effect of subacute desipramine treatment. *Pharmacol Biochem Behav* 59:171-177.
- Consortium C-DGotPG (2013) Identification of risk loci with shared effects on five major psychiatric disorders: a genome-wide analysis. *Lancet* 381:1371-1379.
- Cox T (1978) *Stress*: Macmillan.

- Crestani CC, Alves FH, Correa FM, Guimaraes FS, Joca SR (2010) Acute reversible inactivation of the bed nucleus of stria terminalis induces antidepressant-like effect in the rat forced swimming test. *Behav Brain Funct* 6:30.
- Crestani CC, Alves FH, Gomes FV, Resstel LB, Correa FM, Herman JP (2013) Mechanisms in the bed nucleus of the stria terminalis involved in control of autonomic and neuroendocrine functions: a review. *Curr Neuropharmacol* 11:141-159.
- Crisafulli C, Fabbri C, Porcelli S, Drago A, Spina E, De Ronchi D, Serretti A (2011) Pharmacogenetics of antidepressants. *Front Pharmacol* 2:6.
- Cryan JF, Slattery DA (2007) Animal models of mood disorders: Recent developments. *Curr Opin Psychiatry* 20:1-7.
- Curran T, Morgan JI (1987) Memories of fos. *Bioessays* 7:255-258.
- Czeh B, Lucassen PJ (2007) What causes the hippocampal volume decrease in depression? Are neurogenesis, glial changes and apoptosis implicated? *Eur Arch Psychiatry Clin Neurosci* 257:250-260.
- Czeh B, Perez-Cruz C, Fuchs E, Flugge G (2008) Chronic stress-induced cellular changes in the medial prefrontal cortex and their potential clinical implications: does hemisphere location matter? *Behav Brain Res* 190:1-13.
- Darwin CR (1872) *The expression of emotions in man and animals*. London: John Murray.
- De Bellis MD, Gold PW, Geraciotti TD, Jr., Listwak SJ, Kling MA (1993) Association of fluoxetine treatment with reductions in CSF concentrations of corticotropin-releasing hormone and arginine vasopressin in patients with major depression. *Am J Psychiatry* 150:656-657.
- de Kloet ER (2000) Stress in the brain. *Eur J Pharmacol* 405:187-198.
- Dekeyne A, Denorme B, Monneyron S, Millan MJ (2000) Citalopram reduces social interaction in rats by activation of serotonin (5-HT)_{2C} receptors. *Neuropharmacology* 39:1114-1117.
- Delgado PL (2006) Monoamine depletion studies: implications for antidepressant discontinuation syndrome. *J Clin Psychiatry* 67 Suppl 4:22-26.

- Desan PH, Silbert LH, Maier SF (1988) Long-term effects of inescapable stress on daily running activity and antagonism by desipramine. *Pharmacol Biochem Behav* 30:21-29.
- Dess NK, Raizer J, Chapman CD, Garcia J (1988) Stressors in the learned helplessness paradigm: effects on body weight and conditioned taste aversion in rats. *Physiol Behav* 44:483-490.
- Dielenberg RA, Hunt GE, McGregor IS (2001) "When a rat smells a cat": the distribution of Fos immunoreactivity in rat brain following exposure to a predatory odor. *Neuroscience* 104:1085-1097.
- Dijk SN, Francis PT, Stratmann GC, Bowen DM (1995) NMDA-induced glutamate and aspartate release from rat cortical pyramidal neurones: evidence for modulation by a 5-HT1A antagonist. *Br J Pharmacol* 115:1169-1174.
- Dityatev AE, Bolshakov VY (2005) Amygdala, long-term potentiation, and fear conditioning. *Neuroscientist* 11:75-88.
- Dong HW, Swanson LW (2003) Projections from the rhomboid nucleus of the bed nuclei of the stria terminalis: implications for cerebral hemisphere regulation of ingestive behaviors. *J Comp Neurol* 463:434-472.
- Dong HW, Swanson LW (2004) Projections from bed nuclei of the stria terminalis, posterior division: implications for cerebral hemisphere regulation of defensive and reproductive behaviors. *J Comp Neurol* 471:396-433.
- Dong HW, Swanson LW (2006) Projections from bed nuclei of the stria terminalis, anteromedial area: cerebral hemisphere integration of neuroendocrine, autonomic, and behavioral aspects of energy balance. *J Comp Neurol* 494:142-178.
- Douglas KM, Porter RJ (2012) Associations between hypothalamic-pituitary-adrenal axis function and facial emotion processing in depressed and control participants. *Psychiatry Clin Neurosci* 66:442-450.
- Drevets WC (1999) Prefrontal cortical-amygdalar metabolism in major depression. *Ann N Y Acad Sci* 877:614-637.
- Drevets WC, Videen TO, Price JL, Preskorn SH, Carmichael ST, Raichle ME (1992) A functional anatomical study of unipolar depression. *J Neurosci* 12:3628-3641.

- Du J, Hull EM (1999) Effects of testosterone on neuronal nitric oxide synthase and tyrosine hydroxylase. *Brain Res* 836:90-98.
- Duman CH (2010) Models of depression. *Vitam Horm* 82:1-21.
- Dumont EC (2009) What is the bed nucleus of the stria terminalis? *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* 33:1289-1290.
- Duncan GE, Johnson KB, Breese GR (1993) Topographic patterns of brain activity in response to swim stress: assessment by 2-deoxyglucose uptake and expression of Fos-like immunoreactivity. *J Neurosci* 13:3932-3943.
- Duncan GE, Knapp DJ, Johnson KB, Breese GR (1996) Functional classification of antidepressants based on antagonism of swim stress-induced fos-like immunoreactivity. *J Pharmacol Exp Ther* 277:1076-1089.
- Duvernoy HM (2005) *The Human Hippocampus - Functional anatomy, vascularization and serial sections with MRI*. Berlin, Heidelberg: Springer.
- Evanson NK, Van Hooren DC, Herman JP (2009) GluR5-mediated glutamate signaling regulates hypothalamo-pituitary-adrenocortical stress responses at the paraventricular nucleus and median eminence. *Psychoneuroendocrinology* 34:1370-1379.
- Fava M, Kendler KS (2000) Major depressive disorder. *Neuron* 28:335-341.
- Fernandez Macedo GV, Cladouchos ML, Sifonios L, Cassanelli PM, Wikinski S (2012) Effects of fluoxetine on CRF and CRF1 expression in rats exposed to the learned helplessness paradigm. *Psychopharmacology (Berl)* 225:647-659.
- File SE, Ouagazzal AM, Gonzalez LE, Overstreet DH (1999) Chronic fluoxetine in tests of anxiety in rat lines selectively bred for differential 5-HT_{1A} receptor function. *Pharmacol Biochem Behav* 62:695-701.
- Firestone JA, Gerhardt GA, DeBernardis JF, McKelvy JF, Browning MD (1993) Actions of A-75200, a novel catecholamine uptake inhibitor, on norepinephrine uptake and release from bovine adrenal chromaffin cells. *J Pharmacol Exp Ther* 264:1206-1210.
- Fitzgerald PB, Laird AR, Maller J, Daskalakis ZJ (2008) A meta-analytic study of changes in brain activation in depression. *Human brain mapping* 29:683-695.

- Forray MI, Gysling K (2004) Role of noradrenergic projections to the bed nucleus of the stria terminalis in the regulation of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis. *Brain Res Brain Res Rev* 47:145-160.
- Fu CH, Williams SC, Cleare AJ, Brammer MJ, Walsh ND, Kim J, Andrew CM, Pich EM, Williams PM, Reed LJ, Mitterschiffthaler MT, Suckling J, Bullmore ET (2004) Attenuation of the neural response to sad faces in major depression by antidepressant treatment: a prospective, event-related functional magnetic resonance imaging study. *Arch Gen Psychiatry* 61:877-889.
- Gao SF, Lu YR, Shi LG, Wu XY, Sun B, Fu XY, Luo JH, Bao AM (2014) Nitric oxide synthase and nitric oxide alterations in chronically stressed rats: a model for nitric oxide in major depressive disorder. *Psychoneuroendocrinology* 47:136-140.
- Garthwaite J, Charles SL, Chess-Williams R (1988) Endothelium-derived relaxing factor release on activation of NMDA receptors suggests role as intercellular messenger in the brain. *Nature* 336:385-388.
- Gerlach JL, McEwen BS (1972) Rat brain binds adrenal steroid hormone: radioautography of hippocampus with corticosterone. *Science* 175:1133-1136.
- Greenberg L, Edwards E, Henn FA (1989) Dexamethasone suppression test in helpless rats. *Biol Psychiatry* 26:530-532.
- Greenwood BN, Foley TE, Burhans D, Maier SF, Fleshner M (2005a) The consequences of uncontrollable stress are sensitive to duration of prior wheel running. *Brain Res* 1033:164-178.
- Greenwood BN, Foley TE, Day HE, Burhans D, Brooks L, Campeau S, Fleshner M (2005b) Wheel running alters serotonin (5-HT) transporter, 5-HT1A, 5-HT1B, and alpha 1b-adrenergic receptor mRNA in the rat raphe nuclei. *Biol Psychiatry* 57:559-568.
- Griebel G, Moreau JL, Jenck F, Misslin R, Martin JR (1994) Acute and chronic treatment with 5-HT reuptake inhibitors differentially modulate emotional responses in anxiety models in rodents. *Psychopharmacology (Berl)* 113:463-470.
- Guimaraes FS, Bejamini V, Moreira FA, Aguiar DC, de Lucca AC (2005) Role of nitric oxide in brain regions related to defensive reactions. *Neurosci Biobehav Rev* 29:1313-1322.

- Guzowski JF (2002) Insights into immediate-early gene function in hippocampal memory consolidation using antisense oligonucleotide and fluorescent imaging approaches. *Hippocampus* 12:86-104.
- Hajszan T, Dow A, Warner-Schmidt JL, Szigeti-Buck K, Sallam NL, Parducz A, Leranath C, Duman RS (2009a) Remodeling of hippocampal spine synapses in the rat learned helplessness model of depression. *Biol Psychiatry* 65:392-400.
- Hajszan T, Szigeti-Buck K, Sallam NL, Bober J, Parducz A, Maclusky NJ, Leranath C, Duman RS (2009b) Effects of estradiol on learned helplessness and associated remodeling of hippocampal spine synapses in female rats. *Biol Psychiatry* 67:168-174.
- Hamani C, Diwan M, Macedo CE, Brandao ML, Shumake J, Gonzalez-Lima F, Raymond R, Lozano AM, Fletcher PJ, Nobrega JN (2009) Antidepressant-like effects of medial prefrontal cortex deep brain stimulation in rats. *Biol Psychiatry* 67:117-124.
- Hammack SE, Richey KJ, Watkins LR, Maier SF (2004) Chemical lesion of the bed nucleus of the stria terminalis blocks the behavioral consequences of uncontrollable stress. *Behav Neurosci* 118:443-448.
- Handley SL, McBlane JW (1993) 5HT drugs in animal models of anxiety. *Psychopharmacology (Berl)* 112:13-20.
- Harkin A, Connor TJ, Burns MP, Kelly JP (2004) Nitric oxide synthase inhibitors augment the effects of serotonin re-uptake inhibitors in the forced swimming test. *Eur Neuropsychopharmacol* 14:274-281.
- Harkin A, Connor TJ, Walsh M, St John N, Kelly JP (2003) Serotonergic mediation of the antidepressant-like effects of nitric oxide synthase inhibitors. *Neuropharmacology* 44:616-623.
- Harvey BH, Duvenhage I, Viljoen F, Scheepers N, Malan SF, Wegener G, Brink CB, Petzer JP (2010) Role of monoamine oxidase, nitric oxide synthase and regional brain monoamines in the antidepressant-like effects of methylene blue and selected structural analogues. *Biochem Pharmacol* 80:1580-1591.
- Heiberg IL, Wegener G, Rosenberg R (2002) Reduction of cGMP and nitric oxide has antidepressant-like effects in the forced swimming test in rats. *Behav Brain Res* 134:479-484.

- Herman JP, McKlveen JM, Solomon MB, Carvalho-Netto E, Myers B (2012) Neural regulation of the stress response: glucocorticoid feedback mechanisms. *Braz J Med Biol Res* 45:292-298.
- Heuser I, Yassouridis A, Holsboer F (1994) The combined dexamethasone/CRH test: a refined laboratory test for psychiatric disorders. *J Psychiatr Res* 28:341-356.
- Hinkle LE, Jr. (1974) The concept of "stress" in the biological and social sciences. *Int J Psychiatry Med* 5:335-357.
- Hinkle LE, Jr. (1987) Stress and disease: the concept after 50 years. *Soc Sci Med* 25:561-566.
- Hiroaki-Sato VA, Sales AJ, Biojone C, Joca SR (2014) Hippocampal nNOS inhibition induces an antidepressant-like effect: involvement of 5HT1A receptors. *Behav Pharmacol* 25:187-196.
- Hoffman GE, Lyo D (2002) Anatomical markers of activity in neuroendocrine systems: are we all 'fos-ed out'? *J Neuroendocrinol* 14:259-268.
- Hoffman GE, Smith MS, Verbalis JG (1993) c-Fos and related immediate early gene products as markers of activity in neuroendocrine systems. *Front Neuroendocrinol* 14:173-213.
- Holmans P, Weissman MM, Zubenko GS, Scheftner WA, Crowe RR, Depaulo JR, Jr., Knowles JA, Zubenko WN, Murphy-Eberenz K, Marta DH, Boutelle S, McInnis MG, Adams P, Gladis M, Steele J, Miller EB, Potash JB, Mackinnon DF, Levinson DF (2007) Genetics of recurrent early-onset major depression (GenRED): final genome scan report. *Am J Psychiatry* 164:248-258.
- Hu M, Sun YJ, Zhou QG, Chen L, Hu Y, Luo CX, Wu JY, Xu JS, Li LX, Zhu DY (2008) Negative regulation of neurogenesis and spatial memory by NR2B-containing NMDA receptors. *J Neurochem* 106:1900-1913.
- Huang YH, Cheng CY, Hong CJ, Tsai SJ (2004) Expression of c-Fos-like immunoreactivity in the brain of mice with learned helplessness. *Neurosci Lett* 363:280-283.
- Hughes P, Dragunow M (1995) Induction of immediate-early genes and the control of neurotransmitter-regulated gene expression within the nervous system. *Pharmacol Rev* 47:133-178.

- Hughes P, Lawlor P, Dragunow M (1992) Basal expression of Fos, Fos-related, Jun, and Krox 24 proteins in rat hippocampus. *Brain Res Mol Brain Res* 13:355-357.
- Ikenouchi-Sugita A, Toyohira Y, Yoshimura R, Ueno S, Tsutsui M, Nakamura J, Yanagihara N (2009) Opposite effects of milnacipran, a serotonin norepinephrine reuptake inhibitor, on the levels of nitric oxide and brain-derived neurotrophic factor in mouse brain cortex. *Naunyn Schmiedeberg Arch Pharmacol* 380:479-486.
- Inan SY, Yalcin I, Aksu F (2004) Dual effects of nitric oxide in the mouse forced swimming test: possible contribution of nitric oxide-mediated serotonin release and potassium channel modulation. *Pharmacol Biochem Behav* 77:457-464.
- Jama A, Cecchi M, Calvo N, Watson SJ, Akil H (2008) Inter-individual differences in novelty-seeking behavior in rats predict differential responses to desipramine in the forced swim test. *Psychopharmacology (Berl)* 198:333-340.
- Jankord R, McAllister RM, Ganjam VK, Laughlin MH (2009) Chronic inhibition of nitric oxide synthase augments the ACTH response to exercise. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 296:R728-734.
- Jefferys D, Funder J (1996) Nitric oxide modulates retention of immobility in the forced swimming test in rats. *Eur J Pharmacol* 295:131-135.
- Joca S, Stanquini L, Ferreira F, Guimaraes F (2008) Chronic, but not acute, inhibition of nitric oxide (NO) synthesis prevents learned helplessness development in rats. *International Journal of Neuropsychopharmacology* 11:122-122.
- Joca SR, Guimaraes FS (2006) Inhibition of neuronal nitric oxide synthase in the rat hippocampus induces antidepressant-like effects. *Psychopharmacology (Berl)* 185:298-305.
- Joca SR, Padovan CM, Guimaraes FS (2003a) Activation of post-synaptic 5-HT(1A) receptors in the dorsal hippocampus prevents learned helplessness development. *Brain Res* 978:177-184.
- Joca SR, Padovan CM, Guimaraes FS (2003b) [Stress, depression and the hippocampus]. *Rev Bras Psiquiatr* 25 Suppl 2:46-51.
- Joca SR, Zanelati T, Guimaraes FS (2006) Post-stress facilitation of serotonergic, but not noradrenergic, neurotransmission in the dorsal hippocampus prevents learned helplessness development in rats. *Brain Res* 1087:67-74.

- Joels M (2008) Functional actions of corticosteroids in the hippocampus. *Eur J Pharmacol* 583:312-321.
- Juruena MF, Cleare AJ, Pariante CM (2004) [The hypothalamic pituitary adrenal axis, glucocorticoid receptor function and relevance to depression]. *Rev Bras Psiquiatr* 26:189-201.
- Kandratavicius L, Balista PA, Wolf DC, Abrao J, Evora PR, Rodrigues AJ, Chaves C, Maia-de-Oliveira JP, Leite JP, Dursun SM, Baker GB, Guimaraes FS, Hallak JE (2015) Effects of nitric oxide-related compounds in the acute ketamine animal model of schizophrenia. *BMC Neurosci* 16:9.
- Keck ME, Holsboer F (2001) Hyperactivity of CRH neuronal circuits as a target for therapeutic interventions in affective disorders. *Peptides* 22:835-844.
- Keks NA, Burrows GD, Copolov DL, Newton R, Paoletti N, Schweitzer I, Tiller J (2007) Beyond the evidence: is there a place for antidepressant combinations in the pharmacotherapy of depression? *Med J Aust* 186:142-144.
- Kendler KS, Thornton LM, Gardner CO (2001) Genetic risk, number of previous depressive episodes, and stressful life events in predicting onset of major depression. *Am J Psychiatry* 158:582-586.
- Kessler RC (1997) The effects of stressful life events on depression. *Annu Rev Psychol* 48:191-214.
- Kim SH, Won SJ, Mao XO, Ledent C, Jin K, Greenberg DA (2006) Role for neuronal nitric-oxide synthase in cannabinoid-induced neurogenesis. *J Pharmacol Exp Ther* 319:150-154.
- Kishimoto J, Tsuchiya T, Emson PC, Nakayama Y (1996) Immobilization-induced stress activates neuronal nitric oxide synthase (nNOS) mRNA and protein in hypothalamic-pituitary-adrenal axis in rats. *Brain Res* 720:159-171.
- Knapska E, Radwanska K, Werka T, Kaczmarek L (2007) Functional internal complexity of amygdala: focus on gene activity mapping after behavioral training and drugs of abuse. *Physiol Rev* 87:1113-1173.
- Knowles RG, Palacios M, Palmer RM, Moncada S (1989) Formation of nitric oxide from L-arginine in the central nervous system: a transduction mechanism for stimulation of the soluble guanylate cyclase. *Proc Natl Acad Sci U S A* 86:5159-5162.

- Koenigs M, Huey ED, Calamia M, Rayment V, Tranel D, Grafman J (2008) Distinct regions of prefrontal cortex mediate resistance and vulnerability to depression. *J Neurosci* 28:12341-12348.
- Kostoglou-Athanassiou I, Costa A, Navarra P, Nappi G, Forsling ML, Grossman AB (1998) Endotoxin stimulates an endogenous pathway regulating corticotropin-releasing hormone and vasopressin release involving the generation of nitric oxide and carbon monoxide. *J Neuroimmunol* 86:104-109.
- Kovacs KJ (1998) c-Fos as a transcription factor: a stressful (re)view from a functional map. *Neurochem Int* 33:287-297.
- Kovacs KJ (2008) Measurement of immediate-early gene activation- c-fos and beyond. *J Neuroendocrinol* 20:665-672.
- Kringelbach ML, Rolls ET (2004) The functional neuroanatomy of the human orbitofrontal cortex: evidence from neuroimaging and neuropsychology. *Prog Neurobiol* 72:341-372.
- Krukoff TL, Khalili P (1997) Stress-induced activation of nitric oxide-producing neurons in the rat brain. *J Comp Neurol* 377:509-519.
- Lapin IP, Oxenkrug GF (1969) Intensification of the central serotonergic processes as a possible determinant of the thymoleptic effect. *Lancet* 1:132-136.
- LeDoux J (2007) The amygdala. *Curr Biol* 17:R868-874.
- Lee J, Duan W, Mattson MP (2002) Evidence that brain-derived neurotrophic factor is required for basal neurogenesis and mediates, in part, the enhancement of neurogenesis by dietary restriction in the hippocampus of adult mice. *J Neurochem* 82:1367-1375.
- Lee S, Barbanel G, Rivier C (1995) Systemic endotoxin increases steady-state gene expression of hypothalamic nitric oxide synthase: comparison with corticotropin-releasing factor and vasopressin gene transcripts. *Brain Res* 705:136-148.
- Lee S, Kim CK, Rivier C (1999) Nitric oxide stimulates ACTH secretion and the transcription of the genes encoding for NGFI-B, corticotropin-releasing factor, corticotropin-releasing factor receptor type 1, and vasopressin in the hypothalamus of the intact rat. *J Neurosci* 19:7640-7647.

Lee SH, Ripke S, Neale BM, Faraone SV, Purcell SM, Perlis RH, Mowry BJ, Thapar A, Goddard ME, Witte JS, Absher D, Agartz I, Akil H, Amin F, Andreassen OA, Anjorin A, Anney R, Anttila V, Arking DE, Asherson P, Azevedo MH, Backlund L, Badner JA, Bailey AJ, Banaschewski T, Barchas JD, Barnes MR, Barrett TB, Bass N, Battaglia A, Bauer M, Bayes M, Bellivier F, Bergen SE, Berrettini W, Betancur C, Bettecken T, Biederman J, Binder EB, Black DW, Blackwood DH, Bloss CS, Boehnke M, Boomsma DI, Breen G, Breuer R, Bruggeman R, Cormican P, Buccola NG, Buitelaar JK, Bunney WE, Buxbaum JD, Byerley WF, Byrne EM, Caesar S, Cahn W, Cantor RM, Casas M, Chakravarti A, Chambert K, Choudhury K, Cichon S, Cloninger CR, Collier DA, Cook EH, Coon H, Cormand B, Corvin A, Coryell WH, Craig DW, Craig IW, Crosbie J, Cuccaro ML, Curtis D, Czamara D, Datta S, Dawson G, Day R, De Geus EJ, Degenhardt F, Djurovic S, Donohoe GJ, Doyle AE, Duan J, Dudbridge F, Duketis E, Ebstein RP, Edenberg HJ, Elia J, Ennis S, Etain B, Fanous A, Farmer AE, Ferrier IN, Flickinger M, Fombonne E, Foroud T, Frank J, Franke B, Fraser C, Freedman R, Freimer NB, Freitag CM, Friedl M, Frisen L, Gallagher L, Gejman PV, Georgieva L, Gershon ES, Geschwind DH, Giegling I, Gill M, Gordon SD, Gordon-Smith K, Green EK, Greenwood TA, Grice DE, Gross M, Grozeva D, Guan W, Gurling H, De Haan L, Haines JL, Hakonarson H, Hallmayer J, Hamilton SP, Hamshere ML, Hansen TF, Hartmann AM, Hautzinger M, Heath AC, Henders AK, Herms S, Hickie IB, Hipolito M, Hoefels S, Holmans PA, Holsboer F, Hoogendijk WJ, Hottenga JJ, Hultman CM, Hus V, Ingason A, Ising M, Jamain S, Jones EG, Jones I, Jones L, Tzeng JY, Kahler AK, Kahn RS, Kandaswamy R, Keller MC, Kennedy JL, Kenny E, Kent L, Kim Y, Kirov GK, Klauck SM, Klei L, Knowles JA, Kohli MA, Koller DL, Konte B, Korszun A, Krabbendam L, Krasucki R, Kuntsi J, Kwan P, Landen M, Langstrom N, Lathrop M, Lawrence J, Lawson WB, Leboyer M, Ledbetter DH, Lee PH, Lencz T, Lesch KP, Levinson DF, Lewis CM, Li J, Lichtenstein P, Lieberman JA, Lin DY, Linszen DH, Liu C, Lohoff FW, Loo SK, Lord C, Lowe JK, Lucae S, MacIntyre DJ, Madden PA, Maestrini E, Magnusson PK, Mahon PB, Maier W, Malhotra AK, Mane SM, Martin CL, Martin NG, Mattheisen M, Matthews K, Mattingsdal M, McCarroll SA, McGhee KA, McGough JJ, McGrath PJ, McGuffin P, McInnis MG, McIntosh A, McKinney R, McLean AW, McMahon FJ, McMahon WM, McQuillin A, Medeiros H, Medland SE, Meier S, Melle I, Meng F, Meyer J, Middeldorp CM, Middleton L, Milanova V, Miranda A, Monaco AP, Montgomery GW, Moran JL, Moreno-De-Luca D, Morken G, Morris DW, Morrow EM, Moskvina V, Muglia P, Muhleisen TW, Muir WJ, Muller-Myhsok B, Murtha M, Myers RM, Myin-Germeys I, Neale MC, Nelson SF, Nievergelt CM, Nikolov I, Nimgaonkar V, Nolen WA, Nothen MM, Numberger JI, Nwulia EA, Nyholt DR, O'Dushlaine C, Oades RD, Olincy A, Oliveira G, Olsen L, Ophoff RA, Osby U, Owen MJ, Palotie A, Parr JR, Paterson AD, Pato CN, Pato MT, Penninx BW, Pergadia ML, Pericak-Vance MA, Pickard BS, Pimm J, Piven J, Posthuma D, Potash JB, Poustka F, Propping P, Puri V, Quedstedt DJ, Quinn EM, Ramos-Quiroga JA, Rasmussen HB, Raychaudhuri S, Rehnstrom K, Reif A, Ribases M, Rice JP, Rietschel M, Roeder K, Roeyers H, Rossin L, Rothenberger A, Rouleau G, Ruderfer D, Rujescu D, Sanders AR, Sanders SJ, Santangelo SL, Sergeant JA, Schachar R, Schalling M, Schatzberg AF, Scheftner WA, Schellenberg GD, Scherer SW, Schork NJ, Schulze TG, Schumacher J, Schwarz M, Scolnick E, Scott LJ, Shi J, Shilling PD, Shyn SI, Silverman JM, Slager SL, Smalley SL, Smit JH, Smith EN, Sonuga-Barke EJ, St Clair D, State M, Steffens M, Steinhausen HC, Strauss JS, Strohmaier J, Stroup TS, Sutcliffe JS, Szatmari P, Szelenberger S,

- Thirumalai S, Thompson RC, Todorov AA, Tozzi F, Treutlein J, Uhr M, van den Oord EJ, Van Grootheest G, Van Os J, Vicente AM, Vieland VJ, Vincent JB, Visscher PM, Walsh CA, Wassink TH, Watson SJ, Weissman MM, Werge T, Wienker TF, Wijsman EM, Willemsen G, Williams N, Willsey AJ, Witt SH, Xu W, Young AH, Yu TW, Zammit S, Zandi PP, Zhang P, Zitman FG, Zollner S, Devlin B, Kelsoe JR, Sklar P, Daly MJ, O'Donovan MC, Craddock N, Sullivan PF, Smoller JW, Kendler KS, Wray NR (2013) Genetic relationship between five psychiatric disorders estimated from genome-wide SNPs. *Nat Genet* 45:984-994.
- Legros JJ (2001) Inhibitory effect of oxytocin on corticotrope function in humans: are vasopressin and oxytocin ying-yang neurohormones? *Psychoneuroendocrinology* 26:649-655.
- Leshner AI, Remler H, Biegon A, Samuel D (1979) Desmethylinipramine (DMI) counteracts learned helplessness in rats. *Psychopharmacology (Berl)* 66:207-208.
- Li HY, Sawchenko PE (1998) Hypothalamic effector neurons and extended circuitries activated in "neurogenic" stress: a comparison of footshock effects exerted acutely, chronically, and in animals with controlled glucocorticoid levels. *J Comp Neurol* 393:244-266.
- Lino-de-Oliveira C, Sales AJ, Del Bel EA, Silveira MC, Guimaraes FS (2001) Effects of acute and chronic fluoxetine treatments on restraint stress-induced Fos expression. *Brain Res Bull* 55:747-754.
- Lipinski JF, Jr., Mallya G, Zimmerman P, Pope HG, Jr. (1989) Fluoxetine-induced akathisia: clinical and theoretical implications. *J Clin Psychiatry* 50:339-342.
- Lucassen PJ, Muller MB, Holsboer F, Bauer J, Holtrop A, Wouda J, Hoogendijk WJ, De Kloet ER, Swaab DF (2001a) Hippocampal apoptosis in major depression is a minor event and absent from subareas at risk for glucocorticoid overexposure. *Am J Pathol* 158:453-468.
- Lucassen PJ, Vollmann-Honsdorf GK, Gleisberg M, Czeh B, De Kloet ER, Fuchs E (2001b) Chronic psychosocial stress differentially affects apoptosis in hippocampal subregions and cortex of the adult tree shrew. *Eur J Neurosci* 14:161-166.
- Luo CX, Zhu XJ, Zhou QG, Wang B, Wang W, Cai HH, Sun YJ, Hu M, Jiang J, Hua Y, Han X, Zhu DY (2007) Reduced neuronal nitric oxide synthase is involved in ischemia-induced hippocampal neurogenesis by up-regulating inducible nitric oxide synthase expression. *J Neurochem* 103:1872-1882.

- Mac Sweeney CP, Lesourd M, Gandon JM (1998) Antidepressant-like effects of alnespirone (S 20499) in the learned helplessness test in rats. *Eur J Pharmacol* 345:133-137.
- Maier SF, Anderson C, Lieberman DA (1972) Influence of control of shock on subsequent shock-elicited aggression. *J Comp Physiol Psychol* 81:94-100.
- Maier SF, Grahn RE, Maswood S, Watkins LR (1995) The benzodiazepine receptor antagonists flumazenil and CGS8216 block the enhancement of fear conditioning and interference with escape behavior produced by inescapable shock. *Psychopharmacology (Berl)* 121:250-258.
- Maier SF, Sherman JE, Lewis JW, Terman GW, Liebeskind JC (1983) The opioid/nonopioid nature of stress-induced analgesia and learned helplessness. *J Exp Psychol Anim Behav Process* 9:80-90.
- Maier SF, Silbert LH, Woodmansee WW, Desan PH (1990) Adinazolam both prevents and reverses the long-term reduction of daily activity produced by inescapable shock. *Pharmacol Biochem Behav* 36:767-773.
- Maier SF, Watkins LR (2005) Stressor controllability and learned helplessness: the roles of the dorsal raphe nucleus, serotonin, and corticotropin-releasing factor. *Neurosci Biobehav Rev* 29:829-841.
- Majkutewicz I, Myslinska D, Jerzemowska G, Plucinska K, Listowska M, Grembecka B, Podlacha M, Wrona D (2012) Stress-induced differences in the limbic system Fos expression are more pronounced in rats differing in responsiveness to novelty than social position. *Brain Res Bull* 89:31-40.
- Malberg JE, Duman RS (2003) Cell proliferation in adult hippocampus is decreased by inescapable stress: reversal by fluoxetine treatment. *Neuropsychopharmacology* 28:1562-1571.
- Mancuso C, Navarra P, Preziosi P (2010) Roles of nitric oxide, carbon monoxide, and hydrogen sulfide in the regulation of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis. *J Neurochem* 113:563-575.
- Martin GS (1970) Rous sarcoma virus: a function required for the maintenance of the transformed state. *Nature* 227:1021-1023.
- Martin P, Guillou N, Lacroix P, Billardon M (1996) [Effects of co-administration of an antidepressant and an anxiolytic drug in the "learned helplessness" paradigm: importance of hydroxyzine]. *Encephale* 22:270-279.

- Martin P, Soubrie P, Simon P (1987) The effect of monoamine oxidase inhibitors compared with classical tricyclic antidepressants on learned helplessness paradigm. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* 11:1-7.
- Martin RD (1984) A critical review of the concept of stress in psychosomatic medicine. *Perspect Biol Med* 27:443-464.
- Martini M, Miceli D, Gotti S, Viglietti-Panzica C, Fissore E, Palanza P, Panzica G (2010) Effects of perinatal administration of Bisphenol A on the neuronal nitric oxide synthase expressing system in the hypothalamus and limbic system of CD1 mice. *J Neuroendocrinol* 22:1004-1012.
- Mason JW (1975) A historical view of the stress field. *J Human Stress* 1:6-12 contd.
- Matsuyama S, Nei K, Tanaka C (1996) Regulation of glutamate release via NMDA and 5-HT_{1A} receptors in guinea pig dentate gyrus. *Brain Res* 728:175-180.
- McArthur R, Borsini F (2006) Animal models of depression in drug discovery: a historical perspective. *Pharmacol Biochem Behav* 84:436-452.
- McEwen BS (2007) Physiology and neurobiology of stress and adaptation: central role of the brain. *Physiol Rev* 87:873-904.
- McEwen BS, Weiss JM, Schwartz LS (1968) Selective retention of corticosterone by limbic structures in rat brain. *Nature* 220:911-912.
- McKinney WT, Jr., Bunney WE, Jr. (1969) Animal model of depression. I. Review of evidence: implications for research. *Arch Gen Psychiatry* 21:240-248.
- McLeod TM, Lopez-Figueroa AL, Lopez-Figueroa MO (2001) Nitric oxide, stress, and depression. *Psychopharmacol Bull* 35:24-41.
- Meloni D, Gambarana C, De Montis MG, Dal Pra P, Taddei I, Tagliamonte A (1993) Dizocilpine antagonizes the effect of chronic imipramine on learned helplessness in rats. *Pharmacol Biochem Behav* 46:423-426.
- Miller WR, Seligman ME (1975) Depression and learned helplessness in man. *J Abnorm Psychol* 84:228-238.
- Miller WR, Seligman ME, Kurlander HM (1975) Learned helplessness, depression, and anxiety. *J Nerv Ment Dis* 161:347-357.

- Minor TR, Dess NK, Ben-David E, Chang WC (1994) Individual differences in vulnerability to inescapable shock in rats. *J Exp Psychol Anim Behav Process* 20:402-412.
- Mitchell ES (2004) *Antidepressants*: Chelsea House Publishers.
- Moghaddam B (1993) Stress preferentially increases extraneuronal levels of excitatory amino acids in the prefrontal cortex: comparison to hippocampus and basal ganglia. *J Neurochem* 60:1650-1657.
- Moghaddam B (2002) Stress activation of glutamate neurotransmission in the prefrontal cortex: implications for dopamine-associated psychiatric disorders. *Biol Psychiatry* 51:775-787.
- Moreno FA, Parkinson D, Palmer C, Castro WL, Misiaszek J, El Khoury A, Mathe AA, Wright R, Delgado PL (2010) CSF neurochemicals during tryptophan depletion in individuals with remitted depression and healthy controls. *Eur Neuropsychopharmacol* 20:18-24.
- Morgan JI, Cohen DR, Hempstead JL, Curran T (1987) Mapping patterns of c-fos expression in the central nervous system after seizure. *Science* 237:192-197.
- Morgan JI, Curran T (1989) Stimulus-transcription coupling in neurons: role of cellular immediate-early genes. *Trends Neurosci* 12:459-462.
- Muigg P, Hoelzl U, Palfrader K, Neumann I, Wigger A, Landgraf R, Singewald N (2007) Altered brain activation pattern associated with drug-induced attenuation of enhanced depression-like behavior in rats bred for high anxiety. *Biol Psychiatry* 61:782-796.
- Murua VS, Molina VA (1992) Effects of chronic variable stress and antidepressant drugs on behavioral inactivity during an uncontrollable stress: interaction between both treatments. *Behav Neural Biol* 57:87-89.
- Nagai MM, Gomes FV, Crestani CC, Resstel LB, Joca SR (2013) Noradrenergic neurotransmission within the bed nucleus of the stria terminalis modulates the retention of immobility in the rat forced swimming test. *Behav Pharmacol* 24:214-221.
- Nakagawa Y, Ishima T, Ishibashi Y, Tsuji M, Takashima T (1996) Involvement of GABAB receptor systems in action of antidepressants. II: Baclofen attenuates the effect of desipramine whereas muscimol has no effect in learned helplessness paradigm in rats. *Brain Res* 728:225-230.
- Naylor GJ, Smith AH, Connelly P (1987) A controlled trial of methylene blue in severe depressive illness. *Biol Psychiatry* 22:657-659.

- Nemeroff CB, Widerlov E, Bissette G, Walleus H, Karlsson I, Eklund K, Kilts CD, Loosen PT, Vale W (1984) Elevated concentrations of CSF corticotropin-releasing factor-like immunoreactivity in depressed patients. *Science* 226:1342-1344.
- Nestler EJ (1998) Antidepressant treatments in the 21st century. *Biol Psychiatry* 44:526-533.
- Nestler EJ, Barrot M, DiLeone RJ, Eisch AJ, Gold SJ, Monteggia LM (2002) Neurobiology of depression. *Neuron* 34:13-25.
- Nylen A, Skagerberg G, Alm P, Larsson B, Holmqvist B, Andersson KE (2001) Nitric oxide synthase in the hypothalamic paraventricular nucleus of the female rat; organization of spinal projections and coexistence with oxytocin or vasopressin. *Brain Res* 908:10-24.
- Oliveira RM, Guimaraes FS, Deakin JF (2008) Expression of neuronal nitric oxide synthase in the hippocampal formation in affective disorders. *Braz J Med Biol Res* 41:333-341.
- Ons S, Marti O, Armario A (2004) Stress-induced activation of the immediate early gene *Arc* (activity-regulated cytoskeleton-associated protein) is restricted to telencephalic areas in the rat brain: relationship to *c-fos* mRNA. *J Neurochem* 89:1111-1118.
- Ostrander MM, Richtand NM, Herman JP (2003) Stress and amphetamine induce Fos expression in medial prefrontal cortex neurons containing glucocorticoid receptors. *Brain Res* 990:209-214.
- Overmier JB, Leaf RC (1965) Effects of discriminative Pavlovian fear conditioning upon previously or subsequently acquired avoidance responding. *J Comp Physiol Psychol* 60:213-217.
- Overmier JB, Seligman ME (1967) Effects of inescapable shock upon subsequent escape and avoidance responding. *J Comp Physiol Psychol* 63:28-33.
- Pacak K (2000) Stressor-specific activation of the hypothalamic-pituitary-adrenocortical axis. *Physiological research / Academia Scientiarum Bohemoslovaca* 49 Suppl 1:S11-17.
- Pacak K, Palkovits M (2001) Stressor specificity of central neuroendocrine responses: implications for stress-related disorders. *Endocr Rev* 22:502-548.

- Pacak K, Palkovits M, Yadid G, Kvetnansky R, Kopin IJ, Goldstein DS (1998) Heterogeneous neurochemical responses to different stressors: a test of Selye's doctrine of nonspecificity. *Am J Physiol* 275:R1247-1255.
- Padilla E, Shumake J, Barrett DW, Sheridan EC, Gonzalez-Lima F (2011) Mesolimbic effects of the antidepressant fluoxetine in Holtzman rats, a genetic strain with increased vulnerability to stress. *Brain Res* 1387:71-84.
- Papp M, Moryl E (1993) New evidence for the antidepressant activity of MK-801, a non-competitive antagonist of NMDA receptors. *Pol J Pharmacol* 45:549-553.
- Papp M, Moryl E (1994) Antidepressant activity of non-competitive and competitive NMDA receptor antagonists in a chronic mild stress model of depression. *Eur J Pharmacol* 263:1-7.
- Paxinos G, Watson C (2004) *The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates*: Elsevier Academic Press.
- Peluso MA, Glahn DC, Matsuo K, Monkul ES, Najt P, Zamarripa F, Li J, Lancaster JL, Fox PT, Gao JH, Soares JC (2009) Amygdala hyperactivation in untreated depressed individuals. *Psychiatry Res* 173:158-161.
- Pereira VS, Casarotto PC, Hiroaki-Sato VA, Sartim AG, Guimaraes FS, Joca SR (2013) Antidepressant- and anticomulsive-like effects of purinergic receptor blockade: involvement of nitric oxide. *Eur Neuropsychopharmacol* 23:1769-1778.
- Pereira VS, Romano A, Wegener G, Joca SR (2015) Antidepressant-like effects induced by NMDA receptor blockade and NO synthesis inhibition in the ventral medial prefrontal cortex of rats exposed to the forced swim test. *Psychopharmacology (Berl)* 232:2263-2273.
- Petty F, Sherman AD (1979) Reversal of learned helplessness by imipramine. *Commun Psychopharmacol* 3:371-373.
- Petty F, Sherman AD (1980) Regional aspects of the prevention of learned helplessness by desipramine. *Life Sci* 26:1447-1452.
- Pezuk P, Goz D, Aksoy A, Canbeyli R (2006) BNST lesions aggravate behavioral despair but do not impair navigational learning in rats. *Brain Res Bull* 69:416-421.
- Phillips ML, Drevets WC, Rauch SL, Lane R (2003) Neurobiology of emotion perception I: The neural basis of normal emotion perception. *Biol Psychiatry* 54:504-514.

- Post RM (1992) Transduction of psychosocial stress into the neurobiology of recurrent affective disorder. *Am J Psychiatry* 149:999-1010.
- Prast H, Philippu A (2001) Nitric oxide as modulator of neuronal function. *Prog Neurobiol* 64:51-68.
- Prewitt CM, Herman JP (1998) Anatomical interactions between the central amygdaloid nucleus and the hypothalamic paraventricular nucleus of the rat: a dual tract-tracing analysis. *J Chem Neuroanat* 15:173-185.
- Price JL, Drevets WC (2009) Neurocircuitry of mood disorders. *Neuropsychopharmacology* 35:192-216.
- Real MA, Pineda D, Davila JC, Guirado S (2008) Development and adult organization of the lateral part of the bed nucleus of the stria terminalis in the chicken. *Brain Res Bull* 75:410-413.
- Reddy EPS, A. M.; Curran, T. (1988) *The oncogene handbook*. Amsterdam, New York: Elsevier.
- Reines A, Cereseto M, Ferrero A, Sifonios L, Podesta MF, Wikinski S (2008) Maintenance treatment with fluoxetine is necessary to sustain normal levels of synaptic markers in an experimental model of depression: correlation with behavioral response. *Neuropsychopharmacology* 33:1896-1908.
- Ripke S, Wray NR, Lewis CM, Hamilton SP, Weissman MM, Breen G, Byrne EM, Blackwood DH, Boomsma DI, Cichon S, Heath AC, Holsboer F, Lucae S, Madden PA, Martin NG, McGuffin P, Muglia P, Noethen MM, Penninx BP, Pergadia ML, Potash JB, Rietschel M, Lin D, Muller-Myhsok B, Shi J, Steinberg S, Grabe HJ, Lichtenstein P, Magnusson P, Perlis RH, Preisig M, Smoller JW, Stefansson K, Uher R, Kutalik Z, Tansey KE, Teumer A, Viktorin A, Barnes MR, Bettecken T, Binder EB, Breuer R, Castro VM, Churchill SE, Coryell WH, Craddock N, Craig IW, Czamara D, De Geus EJ, Degenhardt F, Farmer AE, Fava M, Frank J, Gainer VS, Gallagher PJ, Gordon SD, Goryachev S, Gross M, Guipponi M, Henders AK, Herms S, Hickie IB, Hoefels S, Hoogendijk W, Hottenga JJ, Iosifescu DV, Ising M, Jones I, Jones L, Jung-Ying T, Knowles JA, Kohane IS, Kohli MA, Korszun A, Landen M, Lawson WB, Lewis G, Macintyre D, Maier W, Mattheisen M, McGrath PJ, McIntosh A, McLean A, Middeldorp CM, Middleton L, Montgomery GM, Murphy SN, Nauck M, Nolen WA, Nyholt DR, O'Donovan M, Oskarsson H, Pedersen N, Scheftner WA, Schulz A, Schulze TG, Shyn SI, Sigurdsson E, Slager SL, Smit JH, Stefansson H, Steffens M, Thorgeirsson T, Tozzi F, Treutlein J, Uhr M, van den Oord EJ, Van Grootheest G, Volzke H, Weiburg JB, Willemsen G, Zitman FG, Neale B, Daly M, Levinson DF, Sullivan PF (2013) A mega-analysis of genome-wide association studies for major depressive disorder. *Mol Psychiatry* 18:497-511.

- Rivier C (1998) Role of nitric oxide and carbon monoxide in modulating the ACTH response to immune and nonimmune signals. *Neuroimmunomodulation* 5:203-213.
- Rodrigo J, Springall DR, Uttenthal O, Bentura ML, Abadia-Molina F, Riveros-Moreno V, Martinez-Murillo R, Polak JM, Moncada S (1994) Localization of nitric oxide synthase in the adult rat brain. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 345:175-221.
- Rose SP (1998) Neurogenetic determinism and the new euphenics. *BMJ* 317:1707-1708.
- Rosellini RA (1978) Inescapable shock interferes with the acquisition of a free appetitive operant. *Anim Learn Behav* 6:155-159.
- Rosellini RA (1981) Inescapable shock interferes with the acquisition of a low-activity response in an appetitive context. *Anim Learn Behav* 9.
- Rosenkilde CE (1979) Functional heterogeneity of the prefrontal cortex in the monkey: a review. *Behav Neural Biol* 25:301-345.
- Ruginsk SG, Mecawi AS, da Silva MP, Reis WL, Coletti R, de Lima JB, Elias LL, Antunes-Rodrigues J (2015) Gaseous modulators in the control of the hypothalamic neurohypophyseal system. *Physiology* 30:127-138.
- Rybakowski JK, Twardowska K (1999) The dexamethasone/corticotropin-releasing hormone test in depression in bipolar and unipolar affective illness. *J Psychiatr Res* 33:363-370.
- Sagar SM, Sharp FR, Curran T (1988) Expression of c-fos protein in brain: metabolic mapping at the cellular level. *Science* 240:1328-1331.
- Sah P, Faber ES, Lopez De Armentia M, Power J (2003) The amygdaloid complex: anatomy and physiology. *Physiol Rev* 83:803-834.
- Salchner P, Lubec G, Engelmann M, Orlando GF, Wolf G, Sartori SB, Hoeger H, Singewald N (2004) Genetic functional inactivation of neuronal nitric oxide synthase affects stress-related Fos expression in specific brain regions. *Cell Mol Life Sci* 61:1498-1506.
- Salchner P, Singewald N (2002) Neuroanatomical substrates involved in the anxiogenic-like effect of acute fluoxetine treatment. *Neuropharmacology* 43:1238-1248.

- Sanacora G, Zarate CA, Krystal JH, Manji HK (2008) Targeting the glutamatergic system to develop novel, improved therapeutics for mood disorders. *Nat Rev Drug Discov* 7:426-437.
- Sanchez C, Meier E (1997) Behavioral profiles of SSRIs in animal models of depression, anxiety and aggression. Are they all alike? *Psychopharmacology (Berl)* 129:197-205.
- Sanchez F, Moreno MN, Vacas P, Carretero J, Vazquez R (1999) Swim stress enhances the NADPH-diaphorase histochemical staining in the paraventricular nucleus of the hypothalamus. *Brain Res* 828:159-162.
- Santarelli L, Saxe M, Gross C, Surget A, Battaglia F, Dulawa S, Weisstaub N, Lee J, Duman R, Arancio O, Belzung C, Hen R (2003) Requirement of hippocampal neurogenesis for the behavioral effects of antidepressants. *Science* 301:805-809.
- Sawchenko PE, Swanson LW, Steinbusch HW, Verhofstad AA (1983) The distribution and cells of origin of serotonergic inputs to the paraventricular and supraoptic nuclei of the rat. *Brain Res* 277:355-360.
- Schildkraut JJ (1965) The catecholamine hypothesis of affective disorders: a review of supporting evidence. *Am J Psychiatry* 122:509-522.
- Schulz D, Canbeyli RS (2000) Lesion of the bed nucleus of the stria terminalis enhances learned despair. *Brain Res Bull* 52:83-87.
- Scopinho AA, Scopinho M, Lisboa SF, Correa FM, Guimaraes FS, Joca SR (2010) Acute reversible inactivation of the ventral medial prefrontal cortex induces antidepressant-like effects in rats. *Behav Brain Res* 214:437-442.
- Seligman ME, Beagley G (1975) Learned helplessness in the rat. *J Comp Physiol Psychol* 88:534-541.
- Seligman ME, Maier SF (1967) Failure to escape traumatic shock. *J Exp Psychol* 74:1-9.
- Selye H (1936) A Syndrome produced by Diverse Nocuous Agents. *Nature* 138:32.
- Selye H (1956) *The Stress of Life*. New York: McGraw-Hill Book Co. In.

- Selye H (1973) The evolution of the stress concept. *Am Sci* 61:692-699.
- Senba E, Ueyama T (1997) Stress-induced expression of immediate early genes in the brain and peripheral organs of the rat. *Neurosci Res* 29:183-207.
- Sharp FR, Sagar SM, Hicks K, Lowenstein D, Hisanaga K (1991) c-fos mRNA, Fos, and Fos-related antigen induction by hypertonic saline and stress. *J Neurosci* 11:2321-2331.
- Sheline YI, Barch DM, Donnelly JM, Ollinger JM, Snyder AZ, Mintun MA (2001) Increased amygdala response to masked emotional faces in depressed subjects resolves with antidepressant treatment: an fMRI study. *Biol Psychiatry* 50:651-658.
- Sherman AD, Sacquitne JL, Petty F (1982) Specificity of the learned helplessness model of depression. *Pharmacol Biochem Behav* 16:449-454.
- Short KR, Maier SF (1993) Stressor controllability, social interaction, and benzodiazepine systems. *Pharmacol Biochem Behav* 45:827-835.
- Sigurdsson T, Doyere V, Cain CK, LeDoux JE (2007) Long-term potentiation in the amygdala: a cellular mechanism of fear learning and memory. *Neuropharmacology* 52:215-227.
- Silva M, Aguiar DC, Diniz CR, Guimaraes FS, Joca SR (2012) Neuronal NOS inhibitor and conventional antidepressant drugs attenuate stress-induced fos expression in overlapping brain regions. *Cell Mol Neurobiol* 32:443-453.
- Silva MT, Alves CR, Santarem EM (1999) Anxiogenic-like effect of acute and chronic fluoxetine on rats tested on the elevated plus-maze. *Braz J Med Biol Res* 32:333-339.
- Silva RC, Brandao ML (2000) Acute and chronic effects of gepirone and fluoxetine in rats tested in the elevated plus-maze: an ethological analysis. *Pharmacol Biochem Behav* 65:209-216.
- Slattery DA, Morrow JA, Hudson AL, Hill DR, Nutt DJ, Henry B (2005) Comparison of alterations in c-fos and Egr-1 (zif268) expression throughout the rat brain following acute administration of different classes of antidepressant compounds. *Neuropsychopharmacology* 30:1278-1287.

- Smith MA, Banerjee S, Gold PW, Glowa J (1992) Induction of c-fos mRNA in rat brain by conditioned and unconditioned stressors. *Brain Res* 578:135-141.
- Soubrie P, Martin P, el Mestikawy S, Thiebot MH, Simon P, Hamon M (1986) The lesion of serotonergic neurons does not prevent antidepressant-induced reversal of escape failures produced by inescapable shocks in rats. *Pharmacol Biochem Behav* 25:1-6.
- Steinbusch HW, De Vente J, Vincent SR (2000) *Functional Neuroanatomy of the Nitric Oxide System*. Amsterdam: Elsevier Publishing Group.
- Stockmeier CA, Mahajan GJ, Konick LC, Overholser JC, Jurjus GJ, Meltzer HY, Uylings HB, Friedman L, Rajkowska G (2004) Cellular changes in the postmortem hippocampus in major depression. *Biol Psychiatry* 56:640-650.
- Stockmeier CA, Rajkowska G (2004) Cellular abnormalities in depression: evidence from postmortem brain tissue. *Dialogues Clin Neurosci* 6:185-197.
- Stone EA, Lin Y, Quartermain D (2008) A final common pathway for depression? Progress toward a general conceptual framework. *Neurosci Biobehav Rev* 32:508-524.
- Strosznajder J, Chalimoniuk M, Samochocki M (1996) Activation of serotonergic 5-HT_{1A} receptor reduces Ca²⁺- and glutamatergic receptor-evoked arachidonic acid and No/cGMP release in adult hippocampus. *Neurochem Int* 28:439-444.
- Sullivan PF, Neale MC, Kendler KS (2000) Genetic epidemiology of major depression: review and meta-analysis. *Am J Psychiatry* 157:1552-1562.
- Suzuki E, Yagi G, Nakaki T, Kanba S, Asai M (2001) Elevated plasma nitrate levels in depressive states. *J Affect Disord* 63:221-224.
- Szabo S (1998) Hans Selye and the development of the stress concept. Special reference to gastroduodenal ulcerogenesis. *Ann N Y Acad Sci* 851:19-27.
- Telner JL, Singhal RL (1981) Effects of nortriptyline treatment on learned helplessness in the rat. *Pharmacol Biochem Behav* 14:823-826.
- Thomsen C, Helboe L (2003) Regional pattern of binding and c-Fos induction by (R)- and (S)-citalopram in rat brain. *Neuroreport* 14:2411-2414.

- Tischmeyer W, Grimm R (1999) Activation of immediate early genes and memory formation. *Cell Mol Life Sci* 55:564-574.
- To CT, Anheuer ZE, Bagdy G (1999) Effects of acute and chronic fluoxetine treatment of CRH-induced anxiety. *Neuroreport* 10:553-555.
- To CT, Bagdy G (1999) Anxiogenic effect of central CCK administration is attenuated by chronic fluoxetine or ipsapirone treatment. *Neuropharmacology* 38:279-282.
- Tordera RM, Monge A, Del Rio J, Lasheras B (2002) Antidepressant-like activity of VN2222, a serotonin reuptake inhibitor with high affinity at 5-HT1A receptors. *Eur J Pharmacol* 442:63-71.
- Treit D, Aujla H, Menard J (1998) Does the bed nucleus of the stria terminalis mediate fear behaviors? *Behav Neurosci* 112:379-386.
- Trentani A, Kuipers SD, te Meerman GJ, Beekman J, ter Horst GJ, den Boer JA (2003) Immunohistochemical changes induced by repeated footshock stress: revelations of gender-based differences. *Neurobiol Dis* 14:602-618.
- Ueyama T, Kawai Y, Nemoto K, Sekimoto M, Tone S, Senba E (1997) Immobilization stress reduced the expression of neurotrophins and their receptors in the rat brain. *Neurosci Res* 28:103-110.
- Umemoto S, Kawai Y, Ueyama T, Senba E (1997) Chronic glucocorticoid administration as well as repeated stress affects the subsequent acute immobilization stress-induced expression of immediate early genes but not that of NGFI-A. *Neuroscience* 80:763-773.
- Urani A, Chourbaji S, Gass P (2005) Mutant mouse models of depression: candidate genes and current mouse lines. *Neurosci Biobehav Rev* 29:805-828.
- Usunoff KG, Itzev DE, Rolfs A, Schmitt O, Wree A (2006) Nitric oxide synthase-containing neurons in the amygdaloid nuclear complex of the rat. *Anatomy and embryology* 211:721-737.
- Valentine G, Dow A, Banasr M, Pittman B, Duman R (2008) Differential effects of chronic antidepressant treatment on shuttle box escape deficits induced by uncontrollable stress. *Psychopharmacology (Berl)* 200:585-596.

- van der Staay FJ (2006) Animal models of behavioral dysfunctions: basic concepts and classifications, and an evaluation strategy. *Brain Res Rev* 52:131-159.
- Vertes RP (2004) Differential projections of the infralimbic and prelimbic cortex in the rat. *Synapse* 51:32-58.
- Videbech P, Ravnkilde B, Pedersen TH, Hartvig H, Egander A, Clemmensen K, Rasmussen NA, Andersen F, Gjedde A, Rosenberg R (2002) The Danish PET/depression project: clinical symptoms and cerebral blood flow. A regions-of-interest analysis. *Acta Psychiatr Scand* 106:35-44.
- Vollmayr B, Henn FA (2003) Stress models of depression. *Clinical Neuroscience Research* 3:245-251.
- Wagner HR, 2nd, Hall TL, Cote IL (1977) The applicability of inescapable shock as a source of animal depression. *J Gen Psychol* 96:313-318.
- Wang D, An SC, Zhang X (2008) Prevention of chronic stress-induced depression-like behavior by inducible nitric oxide inhibitor. *Neurosci Lett* 433:59-64.
- Wang Y, Yang F, Liu YF, Gao F, Jiang W (2011) Acetylsalicylic acid as an augmentation agent in fluoxetine treatment resistant depressive rats. *Neurosci Lett* 499:74-79.
- Watanabe Y, Saito H, Abe K (1995) Nitric oxide is involved in long-term potentiation in the medial but not lateral amygdala neuron synapses in vitro. *Brain Res* 688:233-236.
- Wegener G, Volke V, Harvey BH, Rosenberg R (2003) Local, but not systemic, administration of serotonergic antidepressants decreases hippocampal nitric oxide synthase activity. *Brain Res* 959:128-134.
- Wegener G, Volke V, Rosenberg R (2000) Endogenous nitric oxide decreases hippocampal levels of serotonin and dopamine in vivo. *Br J Pharmacol* 130:575-580.
- Weiss JM (1968) Effects of coping responses on stress. *J Comp Physiol Psychol* 65:251-260.
- Weiss JM, Bailey WH, Goodman PA, Hoffman LJ, Ambrose MJ, Salman S, Charry JM (1982) A model for neurochemical study of depression. In: *Behavioral models and the analysis of drug action*, pp 195-223 Amsterdam: Elsevier.

- Williamson PC (2011) Toward a final common pathway of depression: an editorial comment to Jarnum H, Eskildsen SF, Steffensen EG et al. 'Longitudinal MRI study of cortical thickness, perfusion, and metabolite levels in depressed patients' (1). *Acta Psychiatr Scand* 124:415-416.
- Willner P (1984) The validity of animal models of depression. *Psychopharmacology (Berl)* 83:1-16.
- Willner P (1986) Validation criteria for animal models of human mental disorders: learned helplessness as a paradigm case. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* 10:677-690.
- Willner P (1990) Animal models of depression: an overview. *Pharmacol Ther* 45:425-455.
- Willner P, Mitchell PJ (2002) The validity of animal models of predisposition to depression. *Behav Pharmacol* 13:169-188.
- Wulsin AC, Herman JP, Solomon MB (1990) Mifepristone decreases depression-like behavior and modulates neuroendocrine and central hypothalamic-pituitary-adrenocortical axis responsiveness to stress. *Psychoneuroendocrinology* 35:1100-1112.
- Wulsin AC, Herman JP, Solomon MB (2010) Mifepristone decreases depression-like behavior and modulates neuroendocrine and central hypothalamic-pituitary-adrenocortical axis responsiveness to stress. *Psychoneuroendocrinology* 35:1100-1112.
- Yan HC, Cao X, Das M, Zhu XH, Gao TM (2010) Behavioral animal models of depression. *Neurosci Bull* 26:327-337.
- Yang W, Oskin O, Krukoff TL (1999) Immune stress activates putative nitric oxide-producing neurons in rat brain: cumulative effects with restraint. *J Comp Neurol* 405:380-387.
- Yildiz F, Erden BF, Ulak G, Utkan T, Gacar N (2000) Antidepressant-like effect of 7-nitroindazole in the forced swimming test in rats. *Psychopharmacology (Berl)* 149:41-44.
- Yochiy A, Britto LR, Hunziker MH (2012) Novelty, but not operant aversive learning, enhances Fos and Egr-1 expression in the medial prefrontal cortex and hippocampal areas of rats. *Behav Neurosci* 126:826-834.

- Yoshimura S, Okamoto Y, Onoda K, Matsunaga M, Ueda K, Suzuki S, Shigetoyamawaki (2010) Rostral anterior cingulate cortex activity mediates the relationship between the depressive symptoms and the medial prefrontal cortex activity. *J Affect Disord* 122:76-85.
- Zacharko RM, Bowers WJ, Kokkinidis L, Anisman H (1982) Alteration of intracranial self-stimulation in mice following inescapable stress. *Soc Neurosci Abstr* 8:898.
- Zald DH (2007) Orbital versus dorsolateral prefrontal cortex: anatomical insights into content versus process differentiation models of the prefrontal cortex. *Ann N Y Acad Sci* 1121:395-406.
- Zazpe A, Artaiz I, Labeaga L, Lucero ML, Orjales A (2007) Reversal of learned helplessness by selective serotonin reuptake inhibitors in rats is not dependent on 5-HT availability. *Neuropharmacology* 52:975-984.

ANEXOS

ANEXO I

Certificado do Comitê de Ética e Uso de Animais.

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
Campus de Ribeirão Preto
Comissão de Ética no Uso de Animais

CERTIFICADO

Certificamos que o trabalho (Protocolo nº 11.1.1358.53.0), intitulado "Substratos Neurais Envolvidos com o Desenvolvimento do Comportamento de Desamparo em Ratos: possível envolvimento do NO", de autoria de **Vinicius Antonio Hiroaki Sato** e de **Sâmia Regiane Lourenço Joca**, por estar de acordo com os **Princípios Éticos na Experimentação Animal** adotado pela **Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA)** do *Campus de Ribeirão Preto – USP* foi aprovado em reunião da CEUA de 06.06.2012.

Colaborador: Francisco Silveira Guimarães

This is to certify that the work (Protocol number 11.1.1358.53.0), entitled: "Substratos Neurais Envolvidos com o Desenvolvimento do Comportamento de Desamparo em Ratos: possível envolvimento do NO", by **Vinicius Antonio Hiroaki Sato** and **Sâmia Regiane Lourenço Joca**, is in accordance with the Ethic Principles in Animal Experimentation adopted by Ethic Commission for the Use of Animals (CEUA) of the *Campus of Ribeirão Preto – USP*, and was approved in the meeting, June, 6 2012.

Ribeirão Preto, 15 de junho de 2012.

Presidente da CEUA
Profa. Dra. Cláudia Maria Padovan

Secretária da CEUA
Maria Angélica Depiro

ANEXO II

Efeito da aplicação de testes inescapáveis sobre o comportamento de fuga ou esquiva no teste do desamparo aprendido.

Animais: Foram utilizados animais assim como relatado no item 3.1 do documento principal.

Desenho Experimental: Os animais foram divididos em dois grupos experimentais. No grupo Pré-teste – Teste os animais foram submetidos ao pré-teste com a aplicação de 40 choques inescapáveis (0,4 mA, 10s de duração, 30–90 segundos de intervalo) nas patas no dia 01. Os animais do grupo Habituação – Teste foram apenas expostos à caixa de choques no dia 01, sem aplicação de nenhum choque e permaneceram na caixa por 40 minutos. No dia 07, todos os animais foram submetidos ao teste do desamparo aprendido, com a aplicação de 30 choques (0,4 mA, 10 s duração, 30–90 s de intervalo) precedidos (5 segundos antes do início do choque) por um tom de aviso (60 dB, 670 Hz, durante toda a aplicação do choque). Na sessão teste o choque foi escapável, uma vez que poderia ser interrompido e/ou evitado pelo próprio animal se este cruzasse de um compartimento para o outro lado durante a apresentação do tom ou durante a aplicação do choque.

Análise dos dados: Foi analisado o número de falhas em escapar ou fugir dos choques no teste bem como o tempo de latência para fuga ou esquiva. Os dados são apresentados como a média do número de falhas de cada grupo ou a média do tempo de latência para escapar ou fugir dos choques dos animais. Foi utilizado o teste *t* de *student* para análise estatística, considerando-se um $p < 0,05$ como significativo.

Resultados: O grupo habituação/teste apresentou um número de falhas significativamente menor (teste *t* de *student*, $t_{22}=2.528$, $n=12$ por grupo, $p=0.0191$ – Fig. 01) e também apresentou um menor tempo de latência para fuga/esquiva (teste *t* de *student*, $t_{22}=2.691$, $n=12$ por grupo, $p=0.0134$ – Fig. 02) do que o grupo pré-teste/teste.

Figura 01. Número de falhas no teste do desamparo aprendido. O grupo que recebeu choques inescapáveis apresentou um número maior de falhas no dia do teste do que o grupo que foi apenas exposto à caixa (teste t de *student*, $t_{22}=2.528$, $n=12$ por grupo, $p=0.0191$). Dados apresentados como média $\pm$ erro padrão da média.

Figura 02. Tempo médio de latência para fuga ou esquia no teste do desamparo aprendido. O grupo que recebeu choques inescapáveis apresentou maior tempo médio de latência para fuga ou esquia no dia do teste do que o grupo que foi apenas exposto à caixa (teste t de *student*, $t_{22}=2.691$, $n=12$ por grupo, $p=0.0134$). Dados apresentados como média $\pm$ erro padrão da média.

ANEXO III

Resultados da análise de correlação entre o número de células imunorreativas e número de falhas em escapar/fugir de choques no teste do LH nas diferentes regiões analisadas.

Estrutura	Regressão linear (Fos-IR x falhas)	Regressão linear (nNOS-IR x falhas)	Regressão linear (dupla-IR x falhas)	Resultado
BIAm	$r^2=0,08634$ $F_{1,35}=3,307$ $p=0,0775$	$r^2=0,0005229$ $F_{1,36}=0,01883$ $p=0,8916$	Não analisado	Correlação positiva (Fos)
CeAm	$r^2=0,0008277$ $F_{1,62}=0,05136$ $p=0,8215$	$r^2=0,07721$ $F_{1,35}=2,928$ $p=0,0959$	Não analisado	Ns
LAm	$r^2=0,1603$ $F_{1,35}=6,68$ $p=0,0141$	$r^2=0,05367$ $F_{1,37}=2,099$ $p=0,1559$	Não analisado	Correlação positiva (Fos)
MeAm	$r^2=0,1660$ $F_{1,34}=6,769$ $p=0,0136$	$r^2=0,02095$ $F_{1,35}=0,7488$ $p=0,3927$	Não analisado	Ns
BST	$r^2=0,07588$ $F_{1,37}=3,038$ $p=0,0896$	$r^2=0,003323$ $F_{1,37}=0,1234$ $p=0,7279$	$r^2=0,009325$ $F_{1,37}=0,3483$ $p=0,5587$	Ns
IL PFC	$r^2=0,06465$ $F_{1,40}=2,765$ $p=0,1042$	$r^2=0,01967$ $F_{1,40}=0,8026$ $p=0,3757$	$r^2=0,04513$ $F_{1,40}=1,890$ $p=0,1768$	Ns
PL PFC	$r^2=0,05381$ $F_{1,40}=2,275$ $p=0,1393$	$r^2=0,001797$ $F_{1,40}=0,07202$ $p=0,7898$	$r^2=0,041$ $F_{1,40}=1,710$ $p=0,1984$	Ns
dHPC-CA1	$r^2=0,1184$ $F_{1,33}=4,433$ $p=0,0429$	$r^2=0,004621$ $F_{1,33}=0,1532$ $p=0,6980$	$r^2=0,05171$ $F_{1,33}=1,799$ $p=0,1889$	Correlação positiva (Fos)
dHPC-CA3	$r^2=0,1633$ $F_{1,33}=6,441$ $p=0,0161$	$r^2=0,07001$ $F_{1,29}=2,183$ $p=0,1503$	$r^2=0,0002817$ $F_{1,33}=0,009299$ $p=0,9238$	Correlação positiva (Fos)
dHPC-DG	$r^2=0,008095$ $F_{1,37}=0,3019$ $p=0,5860$	$r^2=0,01468$ $F_{1,36}=0,5363$ $p=0,4687$	$r^2=0,01468$ $F_{1,36}=0,5363$ $p=0,4687$	Ns

vHPC-CA1	$r^2=0,01573$ $F_{1,29}=0,4634$ $p=0,5015$	$r^2=0,003846$ $F_{1,33}=0,1274$ $p=0,7234$	$r^2=0,00001728$ $F_{1,29}=0,000501$ $p=0,9823$	Ns
vHPC-CA3	$r^2=0,1755$ $F_{1,30}=6,384$ $p=0,0170$	$r^2=0,004762$ $F_{1,30}=0,1435$ $p=0,7075$	$r^2=0,03215$ $F_{1,30}=0,9965$ $p=0,3261$	Correlação positiva (Fos)
vHPC-DG	$r^2=0,02279$ $F_{1,33}=0,7697$ $p=0,3867$	$r^2=0,02453$ $F_{1,33}=0,8298$ $p=0,3689$	$r^2=0,04851$ $F_{1,33}=1,682$ $p=0,2036$	Ns
mPVN	$r^2=0,007150$ $F_{1,33}=0,2377$ $p=0,6291$	$r^2=0,01262$ $F_{1,34}=0,4346$ $p=0,5142$	$r^2=0,003108$ $F_{1,34}=1,091$ $p=0,3037$	Ns
pPVN	$r^2=0,04722$ $F_{1,32}=1,586$ $p=0,2170$	$r^2=0,00167$ $F_{1,32}=0,05353$ $p=0,8185$	$r^2=0,08847$ $F_{1,32}=3,106$ $p=0,0876$	Ns

Legenda:

BIAm = porção basolateral da amígdala.

BST = núcleo leito da estria terminal.

CeAm = porção central da amígdala.

dHPC-CA1 = região CA1 do hipocampo dorsal.

dHPC-CA3 = região CA3 do hipocampo dorsal.

dHPC-DG = giro denteado do hipocampo dorsal.

Dupla-IR = imunorreatividade para proteína Fos-IR e nNOS-IR.

Fos-IR = imunorreatividade para proteína Fos.

IL = porção infra-límbica do córtex pré frontal medial.

LAm = porção lateral da amígdala.

MeAm = porção medial da amígdala.

mPVN = porção magnocelular do núcleo paraventricular do hipotálamo.

nNOS-IR = imunorreatividade para proteína nNOS.

ns = não significativo.

PL = porção pré-límbica do córtex pré-frontal medial.

pPVN = porção parvocelular do núcleo paraventricular do hipotálamo.

vHPC-CA1 = região CA1 do hipocampo ventral.

vHPC-CA3 = região CA3 do hipocampo ventral.

vHPC-DG = giro denteado do hipocampo ventral.

ANEXO IV

Quadros com o número de células duplamente imunorreativas para proteínas Fos e nNOS não apresentados em gráficos devido ao pequeno número de células encontradas.

Área	Grupo	Número de células por animal	Média ± EPM	Número de animais
PL	Veículo	0, 0, 1, 8, 0, 0, 2, 0, 0, 1, 1	1.182±0.7112	11
	Naïve	0, 0, 0, 0	0	4
	Desipramina Agudo	1, 2, 0, 0, 1, 0, 0, 0	0.5±0.2673	8
	Desipramina Repetido	0, 0, 0, 1, 0, 1, 0, 0, 0, 0, 0, 0	0.1667±0.1124	12
IL	Veículo	0, 1, 1, 0, 0, 1, 0, 0, 0, 0, 1	0.3636±0.1521	11
	Naïve	0, 0, 0, 0	0	4
	Desipramina Agudo	0, 5, 0, 2, 4, 0, 2, 0	1.625±0.7055	8
	Desipramina Repetido	0, 0, 0, 0, 1, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0	0.0833±0.0833	12
CeAm	Veículo	0, 1, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0	0.0909±0.0909	11
	Naïve	0, 0, 0, 0	0	4
	Desipramina Agudo	0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0	0	10
	Desipramina Repetido	0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 1	0.0769±0.0769	13
MeAm	Veículo	0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0	0	11
	Naïve	0, 0, 0, 0	0	4
	Desipramina Agudo	0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 2, 0	0.2±0.2	10
	Desipramina Repetido	0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0	0	13
LAm	Veículo	0, 7, 1, 2, 0, 0, 2, 0, 1, 0, 0	1.182±0.6298	11
	Naïve	0, 0, 1, 0	0.25±0.25	4
	Desipramina Agudo	2, 8, 2, 1, 1, 1, 0, 0, 0	1.667±0.8333	9
	Desipramina Repetido	1, 0, 0, 0, 0, 2, 0, 0, 0, 0, 0, 0	0.25±0.1794	12
BIAm	Veículo	0, 1, 2, 2, 0, 0, 1, 0, 0, 0	0.6±0.2667	10
	Naïve	0, 0, 0, 1	0.25±0.25	4
	Desipramina Agudo	2, 2, 0, 2, 1, 0, 0, 0, 0	0.7778±0.3239	9
	Desipramina Repetido	1, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0	0.0833±0.0833	12

Tabela 01. Número de células duplamente imunorreativas para proteínas Fos e nNOS de animais que não receberam tratamento (naïve) ou que receberam tratamento agudo com desipramina ou repetido com salina ou desipramina.

Área	Grupo	Número de células por animal	Média ± EPM	Número de animais
PL	Veículo	0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0	0	9
	Naïve	0, 0, 0, 0	0	4
	Fluoxetina Agudo	0, 0, 0, 0, 0, 3	0.5±0.5	6
	Fluoxetina Repetido	0, 0, 0, 0, 0	0	5
IL	Veículo	0, 1, 1, 0, 1, 0, 0, 0, 2	0.5556±0.2422	9
	Naïve	0, 0, 0, 0	0	4
	Fluoxetina Agudo	0, 0, 0, 0, 0, 1	0.1667±0.1667	6
	Fluoxetina Repetido	1, 0, 0, 0, 0	0.2±0.2	5
CeAm	Veículo	0, 0, 1, 0, 0, 0, 0, 0, 0	0.1111±0.1111	9
	Naïve	0, 0, 0, 0	0	4
	Fluoxetina Agudo	0, 0, 0, 0, 0, 0	0	6
	Fluoxetina Repetido	1, 0, 0, 0, 0	0.2±0.2	5
MeAm	Veículo	0, 0, 1, 1, 0, 0, 0, 0, 0	0.2222±0.1470	9
	Naïve	0, 0, 0, 0	0	4
	Fluoxetina Agudo	0, 0, 0, 0, 0, 0	0	6
	Fluoxetina Repetido	0, 0, 0, 0, 0	0	5
LAm	Veículo	0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 2	0.2222±0.2222	9
	Naïve	0, 0, 0, 0	0	4
	Fluoxetina Agudo	0, 0, 0, 0, 0, 1	0.1667±0.1667	6
	Fluoxetina Repetido	0, 0, 0, 0, 0	0	5
BIAm	Veículo	0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0	0	9
	Naïve	0, 0, 0, 0	0	4
	Fluoxetina Agudo	0, 0, 0, 0, 0, 0	0	6
	Fluoxetina Repetido	0, 0, 0, 0, 0	0	5
dHPC-CA3	Veículo	0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 1	0.1111±0.1111	9
	Naïve	0, 0, 0, 0	0	4
	Fluoxetina Agudo	0, 0, 0, 0, 0, 0	0	6
	Fluoxetina Repetido	0, 0, 0, 0, 0	0	5
dHPC-DG	Veículo	0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0	0	9
	Naïve	0, 0, 0, 0	0	4
	Fluoxetina Agudo	0, 0, 0, 0, 1	0.2±0.2	5
	Fluoxetina Repetido	0, 0, 0, 0, 0	0	5
vHPC-CA1	Veículo	0, 0, 0, 6, 0, 0, 0, 0, 1	0.7778±0.662	9
	Naïve	0, 1, 0, 0	0.25±0.25	4

	Fluoxetina Agudo	0, 0, 0, 0, 0, 3	0.5±0.5	6
	Fluoxetina Repetido	0, 0, 0, 0, 0	0	5
vHPC-CA3	Veículo	0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 1	0.1111±0.1111	9
	Naïve	0, 0, 0, 0	0	4
	Fluoxetina Agudo	0, 0, 0, 0, 0, 0	0	6
	Fluoxetina Repetido	0, 0, 0, 0, 0	0	5
vHPC-DG	Veículo	0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0	0	9
	Naïve	0, 0, 0, 3	0.75±0.75	4
	Fluoxetina Agudo	0, 0, 3, 0, 0	0.6±0.6	5
	Fluoxetina Repetido	1, 0, 0, 0, 0	0.2±0.2	5

Tabela 02. Número de células duplamente imunorreativas para proteínas Fos e nNOS de animais que não receberam tratamento (naïve) ou que receberam tratamento agudo com desipramina ou repetido com salina ou fluoxetina.

Área	Grupo	Número de células por animal	Média ± EPM	Número de animais
PL	Imipramina repetido	0, 0, 1, 2, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 1	0.3333±0.188	12
IL		0, 0, 1, 2, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 1	0.3333±0.188	12
CeAm		0, 0, 0, 0, 0, 0 0, 0, 0, 0, 0, 0	0	12
MeAm		0, 0, 0, 0, 0, 0 0, 0, 1, 0, 0, 0	0.0833±0.0833	12
LAm		1, 0, 2, 0, 0, 0 0, 1, 0, 0, 0, 1	0.4167±0.1930	12
BIAm		0, 0, 2, 3, 0, 0 0, 0, 0, 0, 0, 0	0.4167±0.2876	12
dHPC-CA1		13, 5, 18, 3, 16 0, 0, 0, 0, 0, 0	5.5±2.311	10
vHPC-CA1		6, 11, 13, 4, 10 0, 0, 0, 0, 0, 0	4.4±1.661	10

Tabela 03. Número de células duplamente imunorreativas para proteínas Fos e nNOS de animais que receberam tratamento repetido com imipramina.

ANEXO V

Compilação dos resultados de imunohistoquímica por tratamento.

Tabela 01. Efeitos do tratamento agudo ou repetido com desipramina sobre o número de células Fos-IR, nNOS-IR ou dupla-IR de ratos submetidos ao LH.

		Desipramina Repetido			Desipramina Agudo		
Região		Fos-IR	nNOS-IR	Dupla-IR	Fos-IR	nNOS-IR	Dupla-IR
Amígdala	BIAm	-	0	0	0	0	0
	CeAm	0	0	0	+	0	0
	LAm	-	0	0	0	0	0
	MeAm	0	+	0	0	0	0
mPFC	IL	-	0	0	0	0	0
	PL	-	0	0	0	0	0
BST		0	0	0	0	0	0
dHPC	CA1	-	0	0	-	0	0
	CA3	-	0	0	-	0	0
	DG	0	0	0	0	0	0
vHPC	CA1	-	0	0	0	0	0
	CA3	-	0	0	0	0	0
	DG	0	0	0	0	0	0
PVN	Magno	0	0	0	0	0	0
	Parvo	0	0	0	0	0	0

Tabela 02. Efeitos do tratamento agudo ou repetido com fluoxetina sobre o número de células Fos-IR, nNOS-IR ou dupla-IR de ratos submetidos ao LH.

		Fluoxetina Repetido			Fluoxetina Agudo		
Região		Fos-IR	nNOS-IR	Dupla-IR	Fos-IR	nNOS-IR	Dupla-IR
Amígdala	BIAm	-	-	0	0	0	0
	CeAm	0	0	0	+	0	0
	LAm	-	0	0	0	0	0
	MeAm	0	0	0	0	0	0
mPFC	IL	0	0	0	0	0	0
	PL	0	0	0	0	0	0
BST		0	0	0	0	0	0
dHPC	CA1	0	0	0	0	0	0
	CA3	0	0	0	0	0	0
	DG	0	0	0	0	0	0
vHPC	CA1	0	0	0	0	0	0
	CA3	0	0	0	0	0	0
	DG	0	0	0	0	0	0
PVN	Magno	0	0	0	0	0	0
	Parvo	0	0	0	0	0	0

Tabela 03. Efeitos do tratamento repetido com imipramina sobre o número de células Fos-IR, nNOS-IR ou dupla-IR de ratos submetidos ao LH.

		Imipramina Repetido		
Região		Fos-IR	nNOS-IR	Dupla-IR
Amígdala	BIAm	0	0	0
	CeAm	0	0	0
	LAm	0	0	0
	MeAm	0	+	0
mPFC	IL	0	0	0
	PL	0	0	0
BST		0	0	+
dHPC	CA1	-	0	0
	CA3	0	0	0
	DG	0	0	0
vHPC	CA1	0	0	0
	CA3	0	0	0
	DG	0	0	0
PVN	Magno	0	0	0
	Parvo	0	0	-