UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO
DEPARTAMENTO DE FARMACOLOGIA – FMRP

Izaque de Sousa Maciel

Envolvimento do Óxido Nítrico na metilação do DNA induzida por estresse

Ribeirão Preto 2018

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO
DEPARTAMENTO DE FARMACOLOGIA – FMRP

Izaque de Sousa Maciel

Envolvimento do Óxido Nítrico na metilação do DNA induzida por estresse

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto – FMRP-USP para a obtenção do título de Doutor em Ciências.

Áreas de concentração: Farmacologia

Orientadora: Dra. Sâmia Regiane Lourenço Joca

Ribeirão Preto 2018

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

Maciel, Izaque de Sousa

Envolvimento do óxido nítrico na metilação do DNA induzida por estresse. Ribeirão Preto, 2018. 148 p. : il. ; 30 cm

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

Orientadora: Sâmia Regiane Lourenço Joca

1. Óxido Nítrico. 2. Epigenética. 3. metilação do DNA. 4. DNMT. 5. desamparo aprendido.

FOLHA DE APROVAÇÃO

Izaque de Sousa Maciel

Envolvimento do Óxido Nítrico na metilação do DNA induzida por estresse

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto – FMRP-USP para a obtenção do título de Doutor em Ciências.

Áreas de concentração: Farmacologia

Orientadora: Dra. Sâmia Regiane Lourenço Joca

Aprovada em: ____/____/____

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

*Dedico este trabalho ao garoto que mudou
sua condição social através do estudo.*

AGRADECIMENTOS

Obrigado,

A professora Doutora Sâmia Joca por ter me aceitado no seu grupo e por me proporcionar um grande aprimoramento científico, por me inspirar e me conduzir nesta jornada do doutorado,

Ao professor Doutor Eero Castrén, que abriu as portas do seu laboratório e me proporcionou um grande aprendizado e treinamento técnico. Além disso me demonstrou como um líder conduz uma equipe, “kiitos”,

Aos doutores membros da banca examinadora, pela disponibilidade de avaliar o meu trabalho,

A doutora Caroline Biojone e ao doutor Plínio Cazarotto, por me acolher e me orientar durante meu estágio no exterior,

A Amanda Sales, por compartilhar seus conhecimentos durante os meus primeiros anos no laboratório, por todas as contribuições científicas e também pela amizade,

Aos amigos do laboratório, Vinícios, Vitor, Ariandra, Pedro, Aline, Kênnia, Gabriela, Deidiane, Rebeca e Flávia, pela contribuição na minha formação como pesquisador e por todos os cafés compartilhados,

Ao alunos e técnicos do laboratório da professora Dra. Márcia, por sempre me ajudar e tirar minhas dúvidas em biologia molecular,

A Jéssica Rosa, minha noiva, amiga e colega de pós-graduação. Obrigado por compartilhar essa jornada comigo,

A minha família que compreendeu a minha distância e sempre me apoiou nas minhas escolhas,

Ao PROUNI, que possibilitou o meu acesso ao ensino superior e a ciência,

A FAPESP que patrocinou este projeto e o meu estágio científico no exterior – BEPE (processos: 2015/06271-1 e 2015/25067-6),

A CAPES e CNPq.

*O conhecimento é libertador, porém te prende em
uma sociedade desigual (ISM)*

Resumo

Maciel, I. S. **Envolvimento do Óxido Nítrico na metilação do DNA induzida por estresse**. 2018. 148 f. Tese (Doutorado) – Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2018.

Introdução: A exposição ao estresse induz um aumento dos níveis de óxido nítrico (NO) e glutamato em estruturas do cérebro de ratos, as quais estão relacionadas com o transtorno de depressão maior (DM) em humanos. Ademais, o estresse está diretamente relacionado com o aumento da metilação do DNA, uma alteração epigenética repressiva, no hipocampo de animais. Estudos anteriores demonstraram o efeito tipo antidepressivo dos inibidores da enzima óxido nítrico sintase (NOS) em animais submetidos ao estresse. Porém não se sabe se há uma relação entre o aumento do NO e glutamato induzido pelo estresse e alteração na metilação do DNA em genes relacionado com a patofisiologia da DM. Assim, o objetivo deste estudo foi investigar os efeitos dos inibidores da NOS nas alterações comportamentais e nos mecanismos intracelulares relacionado com a metilação do DNA no cérebro de ratos submetidos ao teste do desamparo aprendido (learned helplessness – LH) e em cultura celular do hipocampo desafiadas com NMDA e dexametasona. **Métodos:** Estudo 1: Cultura primária de células do hipocampo ou cultura imortalizada HiB5 foram desafiadas/estressadas com NMDA (30 μ M, 1h), L-arginina (500 μ M, 1h) e/ou dexametasona (1 μ M, 1h ou 24h) e pré-tratadas com inibidor seletivo da nNOS (NPA, 100nM, 30min antes do desafio) ou com inibidor da DNMT (5-Aza, 10 μ M, 30 min antes do desafio). A expressão dos genes para as enzimas DNMTs, BDNF, NT4, TrkB e nNOS foram avaliadas por RT-qPCR, a expressão proteica das enzimas DNMT3b e nNOS foram avaliadas por western blotting. Estudo 2: Ratos foram submetidos à choques inescapáveis (0,4 mA; 40 choques) na sessão de pré-teste do LH, após sete dias os animais foram submetidos a sessão de teste (choques escapáveis de 0,4 mA). Os animais foram tratados com inibidores da NOS 7-nitroindazole (7-NI; 60mg/kg, i.p), aminoguanidina (AMG; 30mg/kg, i.p) ou veículo por 7 dias e submetidos a sessão de teste 1h, após a última injeção. A metilação global foi analisada por imunoensaio (ELISA) e a expressão dos genes DNMT3b, BDNF, nNOS e iNOS foram avaliadas por RT-qPCR, nas estruturas: cortex, hipocampo ventral e hipocampo dorsal. **Resultados:** Estudo 1: O pré-tratamento com NPA, atenuou o aumento da expressão do mRNA para a enzima DNMT3b, em cultura primária do hipocampo desafiada com NMDA, dexametasona e L-arginina, e também em cultura HiB5 desafiada com dexametasona. Porém, o NPA não inibiu a diminuição da expressão do BDNF (exon 1, exon 4 e exon 9), em cultura primária de células do hipocampo desafiadas com NMDA. O pré tratamento com 5-Aza, não inibiu as alterações induzidas pelo NMDA em cultura primária de hipocampo. Estudo 2: Ratos submetidos ao estresse dos choques inescapáveis na sessão de pré-teste apresentaram aumento no número de falhas em escapar dos choques na sessão de teste (desamparo aprendido), um efeito que foi atenuado pelo tratamento com AMG ou 7-NI. Interessantemente, o efeito comportamental do estresse foi acompanhado por aumento nos níveis da metilação global do DNA e DNMT3b no hipocampo ventral (vHPC), que foi atenuado pelos pré-tratamentos com AMG e 7-NI, porém não houve diferença estatisticamente significativa no córtex e no hipocampo dorsal dos ratos. **Conclusão:** Os dados apresentados demonstraram que tanto o estresse (in vivo) quanto o desafio com glicocorticóides, NMDA e L-arginina (in vitro) são capazes de modular a expressão da

enzima DNMT3b e a metilação de DNA no hipocampo. O tratamento com inibidores da NOS reduzem os efeitos do estresse in vivo (comportamental e molecular) e in vitro. Em conjunto, os dados sugerem que a liberação de glutamato e NO durante o estresse pode modular a expressão da enzima DNMT3b, levando ao aumento da metilação do DNA em genes relacionados com a resposta de adaptação ao estresse. Essa é a primeira evidência de que o NO pode modular metilação do DNA induzida por estresse.

Palavras-chave: Óxido Nítrico, epigenética, metilação do DNA, DNMT, desamparo aprendido.

Abstract

Maciel, I. S. **Role of nitric oxide in stress-induced DNA methylation**. 2018. 148 f. Tese (Doutorado) – Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2018.

Introduction: Stress exposure increases glutamate and nitric oxide (NO) levels, as well as DNA methylation in the hippocampus. However, it is not yet known if there is a causal relationship between these events. Moreover, both nitric oxide synthase (NOS) inhibitors and DNA methylation inhibitors counteract the behavioral effects of stress. Therefore, our aim was to investigate the effects of NOS inhibitors on stress-induced changes on behaviour, DNA methylation and genes expression in the hippocampus of rats submitted to learned helplessness – LH. Moreover, the effects of direct administration of dexamethasone (glucocorticoid), NMDA and L-arginine was investigated in hippocampal cell cultures. **Methods:** Study 1: Primary hippocampal cell culture was challenged with NMDA (30 μ M, 1h), L-arginine (500 μ M, 1h) or dexamethasone (1 μ M, 24h) and pretreated with nNOS inhibitor (NPA, 100nM, 30min before the challenge) or with DNMT inhibitor (5-Aza, 10 μ M, 30 min before the challenge). DNMTs, BDNF, NT4, TrkB and nNOS gene expression was assessed by RT-qPCR. DNMT3b and nNOS levels were assessed by western blotting. Study 2: Rats were submitted to inescapable footshocks and treated with the NOS inhibitors 7-nitroindazole (7-NI; 60 mg/kg, i.p) or aminoguanidine (AMG; 30 mg/kg, i.p), or vehicle for 7 days and tested 1h after the last injection with escapable footshocks. The number of escape failures during the test, global DNA methylation (ELISA) and DNMT3b, BDNF, nNOS and iNOS mRNA expression (RT-qPCR) was evaluated. **Results:** NPA pretreatment attenuated DNMT3b mRNA expression in hippocampus primary cell culture challenged with NMDA, dexamethasone or L-arginine. Similarly effects were observed in HiB5 cell challenged with dexamethasone. However, NPA pretreatment did not inhibit the decrease of BDNF (exon 1, exon 4 and exon 9) induced by NMDA. Moreover, pretreatment with 5-Aza did not inhibit the decreased of BDNF induced by NMDA in primary cell culture. Study 2: Stress exposure increased the number of escape failures in the test, which was attenuated by treatment with AMG or 7-NI, an antidepressant-like effect. Interestingly, the increased DNA methylation DNMT3b mRNA expression in the ventral hippocampus (vHPC) of stressed rats were also attenuated by treatment with both AMG and 7-NI. **Conclusions:** NOS inhibitors attenuated stress-induced depressive-like behavior, DNA methylation and DNMT3b mRNA expression in the vHPC. In vitro, selective nNOS inhibition also blocks corticosterone-, NMDA- and L-arginine-induced DNMT3b mRNA expression in hippocampal cell culture. Altogether, our results suggest that glutamate release, leading to NO production during stress may mediate intracellular mechanisms that regulate DNMT3b expression and DNA methylation. This is the first evidence indicating that NO modulates DNA methylation induced by stress.

Keywords: Nitric Oxide, epigenetics, DNA methylation, DNMT, learned helplessness

LISTAS DE FIGURAS e TABELAS

- Figura 1:** Gráficos representativos do efeito do NPA sob expressão do mRNA da enzima DNMT1, DNMT3a, DNMT3b e nNOS em cultura primária de células do hipocampo de ratos desafiadas com NMDA.....Página 60
- Figura 2:** Gráficos representativos do efeito do NPA sob expressão do mRNA para o BDNF em cultura primária de células do hipocampo desafiadas com NMDA.....Página 63
- Figura 3:** Gráficos representativos do efeito do NPA sob expressão do mRNA para o TrkB e NT4 em cultura primária de células do hipocampo desafiadas com NMDA.....Página 64
- Figura 4:** Gráficos representativos do efeito do 5-Aza sob expressão do mRNA da DNMT3b, BDNF, TrkB e NT4 em células primárias do hipocampo desafiadas com NMDA.....Página 66
- Figura 5:** Gráficos representativos do tratamento com dexametasona sob a expressão do mRNA da DNMT1, DNMT3a, DNMT3b e nNOS em células do hipocampo.....Página 68
- Figura 6:** Gráficos representativos do efeito do NPA sob a expressão do mRNA para DNMT3b em cultura primária de hipocampo e HiB5 tratadas com dexametasona.....Página 70
- Figura 7:** Gráficos representativos do efeito do NPA na expressão do mRNA da NOS1 em cultura primária de células do hipocampo desafiadas com dexametasona.....Página 71
- Figura 8:** Gráficos representativos do efeito do NPA sob expressão do mRNA para a DNMT3b em cultura primária de hipocampo desafiadas com L-arginina.....Página 73
- Figura 9:** Gráficos representativos e imagens ilustrativas das membranas de western blotting do efeito do NMDA sob expressão da proteína fosforilada nNOS (S1417) e DNMT3b em cultura primária de células do hipocampo.....Página 75

Figura 10: Gráficos representativos e imagens ilustrativas das membranas de western blotting do efeito da dexametasona sob expressão da nNOS (S1417) fosforilada e DNMT3b em cultura primária de hipocampo.....	Página 77
Figura 11: Gráficos representativos e imagens ilustrativas das membranas de western blotting do efeito da dexametasona sob expressão da nNOS (S1417) fosforilada e DNMT3b em cultura celular de hipocampo HiB5.....	Página 79
Figura 12: Gráficos representativos do efeito do tratamento repetido com aminoguanidina em ratos submetidos ao teste do desamparo aprendido.....	Página 102
Figura 13: Gráficos representativos do efeito do tratamento repetido com 7-nitroindazole em ratos submetidos ao teste do desamparo aprendido.....	Página 105
Figura 14: Gráficos representativos do efeito do tratamento com aminoguanidina sobre os níveis de metilação global do DNA em estruturas encefálicas de ratos submetidos a choques inescapáveis nas patas.....	Página 106
Figura 15: Gráficos representativos do efeito do tratamento com 7-nitroindazole sobre os níveis de metilação global do DNA em estruturas encefálicas de ratos submetidos a choques inescapáveis nas patas.....	Página 108
Figura 16: Gráficos representativos da expressão da enzima DNMT3b no hipocampo de ratos submetidos a choques inescapáveis nas patas.....	Página 110
Figura 17: Gráficos representativos do efeito do tratamento com 7-NI ou AMG na expressão do mRNA para a enzima DNMT3b no hipocampo de ratos submetidos a choques inescapáveis nas patas.....	Página 112
Figura 18: Gráficos representativos do efeito do estresse de choques nas patas sobre a expressão da enzima nNOS e iNOS no cérebro de ratos.....	Página 113
Figura 19: Gráficos representativos do efeito do estresse de choques nas patas sobre a expressão do BDNF (exon 4 e exon 9) no cérebro de ratos.....	Página 115
Tabela 1: Primers.....	Página 54
Tabela 2: Resumo dos principais achados no estudo 1.....	Página 80
Tabela 3: Resumo dos principais achados no estudo 2.....	Página 116

LISTA DE ABREVEATURAS E SIGLAS

5-Aza –	5-azacitidina
5-AzaC –	5-Aza-2'-deoxycytidina
5HT1A –	receptor de serotonina
5-HTT –	transportador de serotonina
5-mC –	5-metilcitosina
7-NI –	7-nitroinzadole
8-OH-DPAT –	8-hydroxyl-DPAT
ACTH –	hormônio adrenocorticotrófico
AMG –	aminoguanidina
AVP –	argenina-vasopressina
BDNF – cérebro)	brain derived neurotrophic factor (fator neurotrófico derivado do
BH4 –	tetrahydrobiopterin
BrdU –	bromodeoxiuridina
BSA –	bovine serum albumin
CA1 –	cornus ammonis 1, região do hipocampo
Ca ²⁺ /CaM –	complexo cálcio-calmodulina
CA3 –	cornus ammonis 3, região do hipocampo
cDNA –	DNA complementar
CE –	choques escapáveis
cGMP –	monofosfato cíclica de guanosina
CI –	choques inescapáveis
CpG –	citossina-fosfato-guanina
CREB –	cyclic-AMP-responsive-element-binding protein
CRH –	hormônio liberador de corticotrofina
CTX –	córtex pré-frontal
DG –	giro dentado do hipocampo
dHPC –	dorsal hipocampo
DM –	depressão maior
DMEM –	Dulbecco's modified Eagle's médium
DNA –	ácido desoxirribonucleico

DNMT –	DNA metiltransferases
DNMTi –	inibidores da DNA metiltransferase
EDRF – endotélio)	endothelium-derived relaxing factor (fator relaxante derivado do
Eixo-HPA –	eixo Hipotalamo-Pituitaria-adrenocortical
ELS –	Early Life Stress
FAD –	flavin adenine dinucleotide
FDA –	Food and Drug Administration
FMN –	flavin adenina mononucleotide
FMR1 –	fragile X mental retardation 1
FST –	forced swimming test
GR –	receptor glicocorticoide
GSH –	glutathione
GTP –	trifosfato de guanosina
<i>H. pylori</i> –	<i>Helicobacter pylori</i>
Hab –	habitudo
HBBS –	Hanks' Balanced Salt Solution
Hcy –	homocisteína
HDAC –	histona deacetilase
HEPES –	ácido hidroxil-etil-piperazina-etano-sulfônico
HMT –	histona metiltransferase
IL-1 β –	interleukin 1 beta
IMAO –	inibidores da degradação de monoamina
LH –	learned helplessness (desamparo aprendido)
L-NAME –	L-N ^G -Nitroarginine Methyl Ester, L-NAME
LPS –	Lipopolissacarídeo
MBD –	methyl binding domain proteins
MR –	Receptor mineralocorticoide
mRNA –	RNA mensageiro
NADPH –	nicotinamide adenine dinucleotide phosphate
NMDA –	N-metil D-aspartato
NO –	nitric oxide (óxido nítrico)

NO ²⁻ –	nitrito
NO ³⁻ –	nitrato
NOS –	nitric oxide synthases (óxido nítrico sintase)
NPA –	N-propyl L-arginina
NT4 –	neurotrofina 4
NTC –	non-template control
OMS –	organização mundial da saúde
PCPA –	para-clorofenilalanina
PDE –	fosfodiesterases de nucleotídeos cíclicos
PKC –	protein Kinase C
PKG –	proteína cinase
PSD-95 –	postsynaptic density protein-95
PT –	pré-teste
PTM –	alterações pós traducionais de proteínas
PTSD –	desordem de estresse pós-traumático
PVDF –	polyvinylidene fluoride.Hybond-P
PVN –	núcleo paraventricular do hipotálamo
RG108 –	n-ftaloil-l-triptofano
RNS –	espécie reativas de nitrogênio
ROS –	espécies reativas de oxigênio
RT-qPCR –	reação de cadeia de polimerase (PCR) em tempo real
SAM –	S-adenosil-metionina
sGC –	guanilato ciclase solúvel
SNC –	sistema nervoso central
SNO –	S-nitrosilação
SNP –	nitroprussiato de sódio
SSRI –	selective serotoninine reuptake inhibitor
T –	teste
TrkB –	tropomyosin-related kinase B
vHPC –	ventral hipocampo

SUMÁRIO

1. Introdução	23
1.1 Estresse	23
1.1.1. Conceitos Gerais	23
1.1.2. Estresse e Depressão	26
1.1.3. Estresse e modelo pré-clínico para o estudo da DM	28
1.1.4. Estresse e as alterações no SNC	30
1.2. NO	33
1.2.1. NO (Conceitos e histórico)	33
1.2.2. Sinalização mediada por NO (fisiológico x patológico)	34
1.2.3. NO e depressão	36
1.2.4. Efeito tipo antidepressivo dos inibidores da NOS	37
1.3. Alterações epigenéticas	40
1.3.1 Conceitos gerais sobre epigenética	40
1.3.2 Metilação do DNA, estresse e depressão	41
1.3.3 NOS/NO e metilação do DNA	44
1.4 Hipótese	45
2. Objetivos	46
2.1. Objetivos Gerais	46
2.2. Objetivos específicos	46
2.2.1. Estudo 1	46
2.2.2. Estudo 2	47
3. Estudo 1	48
3.1. Materiais e Métodos	48
3.1.1. Cultura celular	48
3.1.2. Tratamento farmacológico	49
3.1.3. Extração do RNA total	49
3.1.4. Síntese do DNA complementar (cDNA)	50
3.1.5. Reação de cadeia de polimerase (PCR) em tempo real (RT-qPCR)	51
3.1.6. Tabela 1: Primers	53
3.1.7. Western Blotting	54
3.1.8. Análise estatística	55
3.2. Delineamento experimental	56

3.2.1. Experimento 1: Efeito do pré tratamento com NPA sobre a expressão do mRNA para as enzimas DNMTs, NOS, BDNF, NT4 e TrkB em cultura primária de células do hipocampo de ratos desafiadas com NMDA.	56
3.2.2. Experimento 2: Efeito do pré tratamento com 5-Aza sobre a expressão do mRNA para as enzimas DNMTs, NOS, BDNF, NT4 e TrkB em cultura primária de células do hipocampo de ratos desafiadas com NMDA.	56
3.2.3. Experimento 3: Avaliação da expressão do mRNA para as enzimas DNMTs e nNOS em cultura primária de células do hipocampo ou cultura imortalizada HiB5 de ratos desafiados com dexametasona.	56
3.2.4. Experimento 4: Efeito do pré tratamento com NPA sobre a expressão do mRNA para as enzimas DNMT3b, nNOS e BDNF em cultura primária de células do hipocampo ou cultura imortalizada HiB5 de ratos desafiados com dexametasona. ...	57
3.2.5. Experimento 5: Efeito do pré tratamento com NPA sobre a expressão do mRNA para a enzima DNMT3b em cultura de células primária do hipocampo de ratos desafiados com L-arginina.	57
3.2.6. Experimento 6: Efeito do pré tratamento com NPA sobre os níveis de DNMT3b e nNOS em cultura primária de células do hipocampo ou cultura imortalizada HiB5 de ratos desafiados com dexametasona ou NMDA.	58
3.3. Resultados	59
3.3.1. Efeito do NPA sobre expressão do mRNA da enzima DNMT1, DNMT3a, DNMT3b e nNOS em cultura primária de células do hipocampo de ratos desafiadas com NMDA.	59
3.3.2. Efeito do NPA sobre expressão do mRNA para o BDNF em cultura primária de células do hipocampo desafiadas com NMDA.	60
3.3.3. Efeito do NPA sob expressão do mRNA para o TrkB e NT4 em cultura primária de células do hipocampo desafiadas com NMDA.	63
3.3.4. Efeito do 5-Aza sobre expressão do mRNA para DNMT3b, BDNF, TrkB e NT4 em células primárias do hipocampo desafiadas com NMDA	65
3.3.5. Efeito do tratamento com dexametasona sobre a expressão do mRNA da DNMT1, DNMT3a, DNMT3b e nNOS em células do hipocampo.	67
3.3.6. Efeito do NPA sob a expressão do mRNA para DNMT3b em cultura primária de hipocampo e células HiB5 tratadas com dexametasona.	69
3.3.7. Efeito do NPA sobre a expressão do mRNA da NOS1 em cultura primária de células do hipocampo desafiadas com dexametasona.	70
3.3.8. Efeito do NPA sob expressão do mRNA para a DNMT3b em cultura primária de hipocampo desafiadas com L-arginina.	72
3.3.9. Efeito do tratamento com NMDA sobre os níveis de nNOS fosforilada (S1417) e de DNMT3b, em cultura primária de células do hipocampo.	74
3.3.10. Efeito do tratamento com dexametasona sobre os níveis de nNOS (S1417) fosforilada e de DNMT3b, em cultura primária de hipocampo.	76
3.3.11. Efeito da dexametasona sobre expressão da nNOS (S1417) fosforilada e DNMT3b em cultura celular de hipocampo HiB5.	77

3.3.12. Tabela 2: Resumo dos principais achados no estudo 1	80
3.4. Discussão	81
4. Estudo 2.....	92
4.1 Materiais e Métodos.....	92
4.1.1. Animais.....	92
4.1.2. Tratamento farmacológico	92
4.1.3. Modelo do desamparo aprendido	93
4.1.4. Coleta de tecidos	94
4.1.5. Avaliação da metilação global no córtex frontal, hipocampo dorsal e ventral dos animais	94
4.1.6. Avaliação da expressão do mRNA para DNMT3b, nNOS, iNOS e BDNF no hipocampo de ratos submetidos ao LH	94
4.2. Delineamento experimental	96
4.2.1. Experimento 1: Efeitos da administração sistêmica repetida de inibidor de nNOS (7-nitroindazole – 7NI) ou de iNOS (aminoguanidina – AMG) sobre as alterações comportamentais induzidas pelo estresse de choques inescapáveis.....	96
4.2.2. Experimento 2: Efeitos da administração sistêmica repetida dos inibidores de nNOS (7-nitroindazole – 7NI) ou de iNOS (aminoguanidina – AMG) sobre a metilação global do DNA no córtex pré-frontal, hipocampo dorsal e ventral de ratos submetidos ao pré-teste do desamparo aprendido.....	97
4.2.3. Experimento 3: Avaliação da expressão do mRNA para a enzima DNMT3b, nNOS, iNOS e BDNF no hipocampo dorsal e ventral de ratos submetidos aos choques inescapáveis nas patas.....	97
4.2.4. Experimento 4: Avaliação do tratamento com 7-NI ou AMG sobre a expressão do mRNA para a enzima DNMT3b, 1h e 24h após a sessão de PT, no hipocampo dorsal e ventral de ratos submetidos aos choques inescapáveis.....	97
4.3. Análise estatística	98
4.4. Resultados	99
4.4.1. Efeitos do tratamento repetido com aminoguanidina em ratos submetidos ao teste do desamparo aprendido	99
4.4.2. Efeitos do tratamento repetido com 7-nitroindazole em ratos submetidos ao teste comportamental do desamparo aprendido.	100
4.4.3. Efeitos do tratamento com aminoguanidina sobre os níveis de metilação global do DNA em estruturas encefálicas de ratos submetidos a choques inescapáveis nas patas102	
4.4.4. Efeitos do tratamento com 7-nitroindazole sobre os níveis de metilação global do DNA em estruturas encefálicas de ratos submetidos a choques inescapáveis nas patas.....	105
4.4.5. Expressão da enzima DNMT3b no hipocampo de ratos submetidos ao estresse dos choques inescapáveis nas patas.	107

4.4.6.	Efeito do tratamento com 7-NI ou AMG sobre a expressão do mRNA para a enzima DNMT3b no hipocampo de ratos.....	109
4.4.7.	Efeitos do estresse de choques nas patas sobre a expressão das enzimas nNOS e iNOS no cérebro de ratos	110
4.4.8.	Efeitos do estresse de choques nas patas sobre a expressão do BDNF (exon 4 e exon 9) no cérebro de ratos.....	112
4.4.9.	Tabela 3: Resumo dos principais achados no estudo 2	114
4.5.	Discussão	115
5.	Discussão Geral	126
6.	Conclusão	129
7.	Referências Bibliográficas	130
Anexo 1:	Certificado de aprovação para uso de animais do presente projeto.	148

1. Introdução

1.1 Estresse

O termo estresse surgiu após o trabalho publicado por Hans Selye, em 1936. Originalmente o estresse foi descrito como uma síndrome de adaptação geral (Selye, 1936). Neste estudo original, foi observado que diferentes estímulos, de diferentes naturezas (químicos, físicos ou biológicos), induziam algumas respostas comuns em ratos, representadas por hipertrofia da glândula adrenal, atrofia dos órgãos linfoides e úlceras gástricas (Selye, 1936). Nos anos seguintes, outros estudos publicados por Selye e colaboradores, definiram o estresse como uma resposta inespecífica do organismo a qualquer estímulo (estressor) exercido sobre o mesmo (Selye, 1973). Estressores podem ser reais ou percebidos (valor dados por cada indivíduo), podem ser de curto ou longo prazo e podem variar quanto a intensidade, segundo a percepção de cada indivíduo (Sousa, 2016). Embora a palavra estresse tenha sido estigmatizada como algo deletério, o estresse é essencial para a sobrevivência, adaptação e evolução (Ulrich-Lai and Herman, 2009; Sousa, 2016). Entretanto, se as respostas aos agentes estressores não forem moderadas ou controladas, não se observa uma adaptação, o que leva a uma fase de exaustão e aos efeitos deletérios do estresse (Selye, 1973; Sousa, 2016).

1.1.1. Conceitos Gerais

A percepção e a avaliação individual do estresse dependem da natureza e duração do agente estressor, de experiências prévias (memória), do contexto, da idade, do gênero e das características genéticas do indivíduo. Todos esses fatores irão influenciar a ativação dos mecanismos sensoriais do sistema nervoso central (SNC) em resposta ao estresse (Selye, 1973; Joëls and Baram, 2009; Ulrich-Lai and Herman, 2009; Sousa, 2016). A complexa resposta ao estresse é modulada por diversos mediadores como: neurotransmissores (adrenalina e serotonina), peptídeos (hormônio liberador de corticotrofina [do inglês: corticotropin-releasing hormone; CRH] e vasopressina) e hormônios esteróides (cortisol em humanos e corticosterona

em roedores). Quando o agente estressor é de natureza física, como por exemplo: dor/nocicepção, exposição a citocinas inflamatórias, hipoglicemia ou perda de volume sanguíneo, há uma predominante ativação da sinalização ascendente, que irá ativar núcleos do tronco cerebral, como o núcleo paraventricular do hipotálamo (do inglês: paraventricular nucleus of the hypothalamus; PVN). A ativação deste núcleo irá liberar o hormônio liberador de corticotrofina (CRH) e também arginina-vasopressina (do inglês: arginine-vasopressin; AVP), ambos hormônios irão agir na glândula pituitária anterior e estimular a liberação do hormônio adrenocorticotrófico (do inglês: adrenocorticotrophic hormone; ACTH). O ACTH, através do sistema circulatório, irá agir nas células corticais da glândula adrenal e estimular a síntese e liberação de hormônios corticóides (por exemplo: cortisol em humanos e corticosterona em roedores). Esta sequência de ativação é conhecida como eixo Hipotálamo-Pituitaria-Adrenocortical (eixo HPA) (Selye, 1973; Sousa, 2016). Por outro lado, se o estresse tem um caráter psicogênico (relacionado com experiências prévias, constrangimento social), irá estimular estruturas do sistema límbico como a amígdala, hipocampo e córtex pré-frontal. Além disso, através de uma complexa rede de ativação de outras estruturas límbicas, como núcleo do leito da estria terminal, núcleo do trato solitário, núcleo dorsomedial do hipotálamo e núcleo arqueado, ocorrerá a estimulação do núcleo paraventricular (PVN) e a modulação do eixo HPA (Ulrich-Lai and Herman, 2009; Sousa, 2016). Embora didaticamente a separação destes dois modos de ativação do eixo HPA torna a compreensão mais simples, ambos os estressores (físico e psicogênico) se sobrepõem, modulando a complexa ativação do eixo HPA (Joëls and Baram, 2009).

A ativação do eixo HPA (pelos estressores físico ou psicogênico) é inibida pelo seu principal produto, o glicocorticóide, através da inibição pelo mecanismo de retroalimentação negativa (*negative feedback*), em vários níveis do eixo HPA. Interessantemente, estruturas do sistema límbico, como o córtex pré-frontal medial e o hipocampo, expressam receptores

glicocorticóides (GR) e mineralocorticoides (MR), demonstrando o relevante papel destas estruturas na modulação do eixo HPA (Bremner, 1999; Herman et al., 2003). Ademais, a ativação do GR, principalmente no hipocampo, é responsável pela inibição da hiperativação do eixo HPA induzida por estresse (Bremner, 1999; Nestler et al., 2002; Herman et al., 2003; Ulrich-Lai and Herman, 2009).

A falta de adaptação à exposição a estímulos estressores (agudo ou crônico) está relacionada com as alterações neuroquímicas e morfológicas no sistema límbico e hiperativação do eixo HPA (Magariños and McEwen, 1995; Makino et al., 1995; Ulrich-Lai and Herman, 2009; Treccani et al., 2014; Musazzi et al., 2017; Nava et al., 2017). Alguns estudos demonstraram que em animais submetidos ao estresse crônico por imobilização ou estresse agudo por choques inescapáveis nas patas, apresentaram retração apical das espinha dendríticas e diminuição na densidade de espinha dendríticas em células piramidais (Magariños and McEwen, 1995; Nava et al., 2017). Também foi demonstrado que o estresse diminui a expressão dos GRs no hipocampo e induziu um aumento da expressão do mRNA (RNA mensageiro) para CRH e vasopressina no PVN (Makino et al., 1995; Ulrich-Lai and Herman, 2009). A inibição farmacológica dos receptores NMDA ou do GR, atenuaram as alterações morfológicas no cérebro de animais submetidos ao estresse (Magariños and McEwen, 1995; Mayer et al., 2006; Datson et al., 2012). Ademais, o estresse foi correlacionado com o aumento da liberação do neurotransmissor excitatório glutamato no córtex pré-frontal, induzindo alterações rápidas e também de longo prazo nessa estrutura (Treccani et al., 2014; Musazzi et al., 2017). Assim, alterações comportamentais geradas pela incontrolabilidade dos estímulos estressores foram correlacionadas com a hiperativação do eixo HPA, aumento da liberação do neurotransmissor excitatório glutamato e alterações morfológicas. Essas alterações tem sido relacionadas com déficit cognitivo, prejuízo na memória de extinção, depressão maior, transtorno de ansiedade e

o transtorno de estresse pós-traumático (do inglês: Posttraumatic Stress Disorder, PTSD) (Ulrich-Lai and Herman, 2009; Musazzi et al., 2017).

1.1.2. Estresse e Depressão

A associação entre o estresse (crônico, incontrolável e imprevisível) com características individuais (genéticas, psicobiológicas e comportamentais) irão determinar a resiliência/adaptação do indivíduo ou a suscetibilidade aos efeitos do estresse (McEwen and Gianaros, 2011). A ineficácia de se adaptar ao estresse e retornar a homeostasia está associada com a ocorrências de alterações neuroplásticas, metabólicas e neuroimunológicas que podem levar ao desencadeamento de doenças (McEwen and Gianaros, 2011; Sousa, 2016). Diversos estudos têm apontado que estas alterações precedem o desenvolvimento de doenças neurodegenerativas, neuropsiquiátricas e/ou os transtornos de humor (McEwen and Gianaros, 2011).

Estudos clínicos demonstraram que pacientes vítimas de abuso ou que foram abandonados na infância (termo em inglês Early Life Stress – ELS), bem como o estresse social (relacionado com a perda do emprego, problemas econômicos e problemas familiares) e também indivíduos que foram submetidos algum trauma são mais suscetíveis a desenvolver transtornos neuropsiquiátricos como: transtorno de ansiedade, depressão maior (DM) e PTSD (Davidson et al., 2004; de Kloet et al., 2005; Kendler et al., 2006; Gilman et al., 2013). x

A DM é um sério problema para a saúde pública mundial, com uma prevalência entre 8 a 20 % em diferentes populações, gerando um impacto negativo pessoal e sócio-econômico, relacionado com muitos dias de afastamento do trabalho e elevado gastos com saúde pública (Kessler et al., 2003, 2008; Lepine et al., 2012). Segundo a Organização Mundial da Saúde (OMS), a DM será a segunda doença mais prevalente no mundo em 2030. Pacientes com DM apresentam sintomas como humor deprimido, anedonia, alteração do sono, psicomotora e

alimentar, ansiedade, afastamento social, pensamento de inutilidade e excessiva culpa, pensamento de morte, podendo em alguns casos levar ao suicídio (Wittchen et al., 1994; Murray and Lopez, 1997; Belmaker, 2008; Russo and Nestler, 2013; Wiborg, 2013).

A etiologia da DM é complexa e multifatorial, o desenvolvimento desta patologia está relacionado com a interação dos componentes genéticos e os fatores ambientais, principalmente o estresse em diferentes fase da vida (Post, 1992; Kendler et al., 2006; Lopizzo et al., 2015). O estresse é um dos principais fatores para o desenvolvimento de episódio de DM, sendo que a maioria dos episódios de DM são precedidos por eventos estressores (Post, 1992). Ademais, o componente genético sob a DM tem sido extensivamente investigado e se demonstrado relevante na patofisiologia da DM. Embora nenhum gene específico tenha sido identificado como o fator desencadeante da DM, algumas mutações foram relacionadas com o aumento do risco para o desenvolvimento da DM (Wong and Licinio, 2001; Pezawas et al., 2005, 2008). Indivíduos portadores da mutação do gene 5-HTTLPR alelo S (short), que têm uma diminuição da expressão do transportador de serotonina (5-HTT), são mais suscetíveis a desenvolver DM e ansiedade, desde que apresentem história de estresse na infância, bem como uma diminuição na eficácia terapêutica com antidepressivos inibidores da recaptação de serotonina (SSRI) (Murphy et al., 2004; Pezawas et al., 2005). Também foi observado que o polimorfismo de nucleotídeo único (do inglês: *single nucleotide polymorphism*, SNP), onde a substituição do aminoácido valina no lugar do aminoácido metionina no códon 66 do gene que codifica o fator derivado do cérebro (BDNF, brain-derived neurotrophic fator), mutação conhecida como BDNF val66met, altera os mecanismos intracelulares responsáveis por sua secreção, torna indivíduos mais suscetíveis ao estresse e ao desenvolvimento de depressão (Egan et al., 2003; Pezawas et al., 2008; McEwen and Gianaros, 2011; Hosang et al., 2014). Embora os componentes genéticos sejam relevantes nas alterações neuroquímicas e neuro-morfológicas, o estresse é considerado o componente desencadeador das alterações moleculares relacionadas

com a DM. Isso indica que os fatores genéticos não são determinantes, mas parecem alterar a sensibilidade individual aos efeitos induzidos pelo estresse, como sugerido por Kendler, em 1995 (Kendler et al., 1995). Essa modulação fundamental do meio ambiente na vulnerabilidade ao desenvolvimento da DM pressupõe importante participação de mecanismos epigenéticos na etiologia desse transtorno, conforme será abordado a seguir.

1.1.3. Estresse e modelo pré-clínico para o estudo da DM

Visto a complexidade dos mecanismos fisiopatológicos da DM, juntamente com as dificuldades éticas de se estudar alterações no SNC em humanos, os estudos em animais tornaram-se uma ferramenta importante para a compreensão deste transtorno. As pesquisas desenvolvidas, principalmente em roedores, trouxeram relevantes achados sobre a fisiopatologia da DM e os aspectos neurobiológicos desencadeado pelo estresse (Magariños and McEwen, 1995; Duman and Monteggia, 2006; Yan et al., 2010; Slattery and Cryan, 2017). Devido a relevância do estresse sob as alterações comportamentais relacionadas com a DM, muitos dos modelos animais empregam algum tipo (ou mais de um tipo) de agente estressor para o desencadeamento de alterações comportamentais relacionadas à depressão. Embora não seja possível avaliar os aspectos psicológicos da DM em roedores, o estresse geralmente induz modificações comportamentais, como por exemplo prejuízo no aprendizado, desistência em tentar escapar de uma situação aversiva e perda da preferência por alimentos palatáveis, conhecida como anedonia, aspectos semelhantes a sintomas presentes em indivíduos com DM (Yan et al., 2010; Slattery and Cryan, 2017). Em um modelo animais para o estudo da DM, espera-se que ele compreenda três aspectos: (1) validade de face (inglês: face validity), pressupõe similaridade com as sinais e sintomas encontrados na depressão; (2) validade de construto (do inglês: constructo validity), pressupõe que as alterações comportamentais representadas no modelo tenham a mesma origem (mecanismos fisiopatológicos) que a DM e

(3) validade preditiva (do inglês: predictive validity), onde as alterações comportamentais e fisiopatológicas são sensíveis ao tratamento farmacológico disponíveis na clínica (Athina Markou, 1995).

No presente projeto foi escolhido o modelo do desamparo aprendido (do inglês: *learned helplessness*; LH), descrito por Seligman e colaboradores (Seligman and Maier, 1967; Seligman and Beagley, 1975). No protocolo original cães que foram previamente submetidos a uma sessão de choques inescapáveis, quando reexpostos ao mesmo paradigma, porém com choques facilmente controláveis, esses animais não apresentavam qualquer comportamento (ativo ou passivo) para inibir a apresentação dos choques, recebendo os choques de forma passiva, comportamento que foi denominado “desamparo”. Diferentemente, os animais que não foram expostos a sessão prévia de choques inescapáveis, aprendiam por tentativa e erro, independente da resposta (passiva ou ativa), que podiam interromper os choques (Seligman 1975). Esse comportamento foi observado em outros animais como gato, camundongos e ratos, bem como em humanos (Maier and Seligman, 2016).

O paradigma experimental do LH é baseado na incontrolabilidade da situação de estresse, onde somente ratos que foram submetidos aos choques inescapáveis e incontroláveis, desenvolveram o comportamento de desamparo (Weiss et al., 1981; Maier and Watkins, 2005). O LH apresenta uma relevante validade da face e construto, no qual o estresse incontrolável induz alterações comportamentais e moleculares semelhantes às observadas em paciente com DM, como: desesperança, perda de peso, alteração no sono, alteração da ativação do eixo HPA, diminuição de espinhas dendríticas em células do hipocampo, alteração na neurotransmissão monoaminérgica e ativação do sistema imune (Maier and Watkins, 2005; Hajszan et al., 2009; Yan et al., 2010; Pryce et al., 2011; Nava et al., 2017). Além disso, o LH apresenta validade preditiva, onde as alterações são prevenidas ou atenuadas com o tratamento repetido por antidepressivos de diferentes classes (tricíclicos, antidepressivos atípicos e também por

inibidores da monoaminaoxidase), bem como por eletroconvulsoterapia (Sherman et al., 1982; Joca et al., 2003, 2006; Hajszan et al., 2009; Pryce et al., 2011). Ademais, não foram observados efeitos agudos dos antidepressivos e outras classes de fármacos como: ansiolíticos, neurolépticos, estimulantes (Sherman et al., 1982). Assim, este paradigma experimental é um método muito relevante para o estudo dos mecanismos farmacológicos de substâncias com efeito antidepressiva e dos processos neurobiológicos desencadeados pelo estresse incontrolável relacionados à depressão.

1.1.4. Estresse e as alterações no SNC

Como acima descrito, tanto em humanos como em roedores, o estresse induz hiperatividade do eixo HPA, alterações neuroquímicas e morfológicas em estruturas relacionadas com o sistema límbico. Essas evidências corroboraram com a origem de diferentes hipóteses sobre a fisiopatológica da DM.

Por muito tempo, o estudo da fisiopatologia da DM foi ancorado na hipótese monoaminérgica, por causa da descoberta do efeito antidepressivo dos inibidores da degradação de monoaminas (IMAOs) e dos antidepressivos tricíclicos (inibidores da recaptação de monoaminas) (Axelrod and Inscoc, 1963; Glowinski and Axelrod, 1964; Lapin and Oxenkrug, 1969). Embora seus efeitos sob a neurotransmissão monoaminérgica ocorram imediatamente, na clínica observa-se uma resposta terapêutica após 4 semanas. Além disso, 45% dos pacientes não respondem ao tratamento clássico (Nestler, 1998; Keks et al., 2007; Kiss, 2008; Machado-Vieira et al., 2010). Mesmo com o desenvolvimento de novos antidepressivos e muitos anos de estudo focados na hipótese monoaminérgica, muitas questões a respeito da etiologia e dos mecanismos fisiopatológicos da depressão ainda não foram totalmente esclarecidas. Recentemente, diversos grupos têm demonstrado a participação dos antidepressivos nos processos neuroplásticos e no controle dos níveis de glutamato no SNC (Castrén, 2005;

Krishnan and Nestler, 2008; Popoli et al., 2011; Pehrson and Sanchez, 2014; Castrén and Antila, 2017; Musazzi et al., 2017), ampliando o conhecimento da neurobiologia da DM e a origem de novas hipóteses.

As alterações morfológicas e neuroplásticas estão vastamente descritas em pacientes diagnosticados com depressão maior ou PTSD (Koolschijn et al., 2009; Schmaal et al., 2016). As análises *post-mortem* no cérebro de pacientes com diagnóstico de DM ou PTSD demonstraram uma diminuição nos comprimentos dos espinhos dendríticos e na arborização dos neurônios do córtex e hipocampo (Soetanto et al., 2010; Kang et al., 2012). Dados semelhantes foram observados em roedores submetidos ao estresse crônico ou tratados com glicocorticoides, tais modificações foram correlacionados com as alterações comportamentais (Magariños and McEwen, 1995; Duman and Aghajanian, 2012). Ademais, o estresse agudo é capaz de induzir rapidamente a diminuição do número de espinhos dendríticos em ratos, o qual permaneceu por até 2 semanas após o estresse agudo (Izquierdo et al., 2006; Duman and Aghajanian, 2012; Nava et al., 2017). Esses dados sugerem que as alterações morfológicas ocorrem simultaneamente com modificações moleculares, induzidas pela hiperativação do eixo HPA e aumento da liberação de glutamato e uma diminuição na liberação e atividade do fator neurotrófico BDNF (Duman and Aghajanian, 2012; Nava et al., 2017). Como o tratamento crônico com antidepressivos atenua as alterações na arborização dendríticas induzida pelo estresse (Musazzi et al., 2017; Nava et al., 2017), sugere-se que os efeitos farmacológicos dos antidepressivos estejam relacionados à modulação desses mecanismos neuroplásticos.

O fator neurotrófico derivado do cérebro (BDNF) tem relevante papel nos processos neuroplásticos durante o desenvolvimento, na sobrevivência celular e na plasticidade neuronal (Nestler et al., 2002; Castrén and Antila, 2017). Embora se conheça outros fatores neurotróficos, o BDNF e seu receptor TrkB (tropomyosin-related kinase B) apresentam relevante papel nas alterações plásticas induzida pelo estresse (Nestler et al., 2002; Krishnan and Nestler, 2008).

Segundo a hipótese neurotrófica proposta por Nestler e colaboradores (2002), a etiologia da DM estaria relacionada com a diminuição do BDNF em estruturas límbicas, e os efeitos terapêuticos dos antidepressivos estariam relacionados com a restauração dos níveis desta neurotrofina (Duman et al., 1997). A análise *post-mortem* demonstrou que sujeitos com DM apresentaram uma diminuição nos níveis de BDNF e que paciente tratados com antidepressivo apresentaram um aumento desta neurotrofina (Duman and Monteggia, 2006; Castrén et al., 2007; Thompson Ray et al., 2011; Castrén and Antila, 2017). Em roedores, o estresse induz diminuição dos níveis de BDNF, o que tem sido relacionado com as alterações morfológicas no cérebro e também com o comportamento tipo depressivo observado em animais estressados (Duman and Monteggia, 2006; Hing et al., 2017). Semelhante aos resultados de estudos clínicos, o tratamento com antidepressivos clássicos reverteu a diminuição do BDNF induzida pelo estresse (Duman and Aghajanian, 2012; Castrén and Antila, 2017). Interessantemente, o efeito dos antidepressivos foi inibido em animais mutantes para a expressão do BDNF, sugerindo que a sinalização BDNF-TrkB é necessária para os efeitos farmacológicos dos antidepressivos (Duman and Voleti, 2012; Yu et al., 2012).

Ademais, a expressão do BDNF pode ser modulada por diversos neurotransmissores, hormônios e mecanismos intracelulares (Castrén, 2005; Duman and Monteggia, 2006; Begni et al., 2017). Relevante para o presente estudo, o estresse induz alterações nos níveis de glutamato e alterações epigenéticas (mecanismos descritos abaixo), os quais parecem relacionados com a diminuição da expressão do BDNF observada em estruturas do sistema límbico (Hing et al., 2017).

Glutamato é o principal neurotransmissor excitatório do sistema nervoso central. Através da ativação dos receptores ionotrópicos (NMDA; N-methyl-D-aspartate ou AMPA; α -amino-3-hydroxyl-5-methyl-4-isoxazole-propionic acid) e metabotrópicos (mGluR1 – MgluR8), o glutamato regula a transmissão sináptica e os processos neuroplásticos (Popoli et

al., 2011). Diferentes mecanismos regulam a expressão destes receptores e também a quantidade de glutamato liberado no espaço extracelular (Popoli et al., 2011). O envolvimento do sistema glutamatérgico tem sido bastante relacionado à resposta comportamental ao estresse e à neurobiologia da depressão nas duas últimas décadas (Sanacora et al., 2012). Evidências indicam, por exemplo, que o estresse aumenta os níveis de glutamato no SNC, bem como a expressão de receptores para glutamato do tipo NMDA (Popoli et al., 2011; Chandley et al., 2014). Por outro lado, antidepressivos atenuam os efeitos do estresse sobre a neurotransmissão glutamatérgica (Barbon et al., 2006; Joca et al., 2007; Musazzi et al., 2013; Treccani et al., 2014; Nava et al., 2017). Além disso, antagonistas do receptor NMDA induzem efeitos antidepressivos em humanos e também em animais submetidos a modelos pré-clínicos (Berman et al., 2000; Li et al., 2010). Portanto, tem sido sugerido que o excesso de ativação de receptores NMDA, ou prejuízo na sinalização mediada por AMPA, em estruturas límbicas, estejam associadas ao desenvolvimento de alterações comportamentais em animais e à depressão maior em humanos (Li et al., 2010; Popoli et al., 2011; Treccani et al., 2014; Joca et al., 2015). Importante para o presente estudo, a ativação dos receptores NMDA promove aumento do influxo de íons Ca^{2+} e síntese de óxido nítrico (mecanismos detalhados abaixo), o qual influencia diversos mecanismos intracelulares e neuroplásticos relacionado com a neurobiologia da depressão (Guix et al., 2005; Garthwaite, 2008; Joca et al., 2015; Wegener and Joca, 2016).

1.2. NO

1.2.1. NO (Conceitos e histórico)

O óxido nítrico (NO) foi identificado no ano de 1772, pelo pesquisador Joseph Priestly, como um gás incolor e com tempo de meia vida *in vivo* muito curto (6 -10 segundos). Após dois séculos, estudos realizados pelo pesquisador Ferid Murad demonstrou que

nitrovasodilatadores (nitroglicerina, nitroprussiato de sódio) induziam relaxamento da musculatura lisa (Katsuki et al., 1977; Yetik-Anacak and Catravas, 2006). No ano de 1980, o pesquisador Robert Furchgott relatou um interessante achado, onde a vasodilatação induzida por acetilcolina ocorria somente quando a camada de células epiteliais se encontrava intacta no vaso (sistema de órgão isolado), o que ele atribuiu ao “fator relaxante derivado do endotélio” (do inglês: endothelium-derived relaxing factor; EDRF) (Furchgott and Zawadzki, 1980). Pesquisas realizadas pelo grupo do Dr. Louis Ignarro e também pelo Dr. Salvador Moncada demonstram que o EDRF e o NO se tratavam da mesma molécula (Ignarro et al., 1987; Palmer et al., 1987). Moncada e colaboradores demonstraram que a L-arginina era um precursor da síntese de NO (Palmer et al., 1987). Anteriormente, Murad e colaboradores demonstraram que a vasodilatação mediada por nitrovasodilatadores, estava relacionado com a estimulação intracelular da guanilato ciclase solúvel (sGC) e um aumento da cGMP (Katsuki et al., 1977). Esses achados contribuíram para a caracterização dos mecanismos intracelulares modulados pelo NO (Yetik-Anacak and Catravas, 2006). Garthwaite e colaboradores demonstraram que no SNC a ativação do receptor NMDA e o aumento do influxo de íons Ca^{2+} , induzia o aumento da liberação do EDRF/NO, atuando como sinalizador no cérebro (Garthwaite et al., 1988). Considerando os achados do papel do NO nos processos biológicos, no ano de 1992 a revista Science declarou o NO como molécula do ano e no ano de 1998 Murad, Furchgott e Ignarro foram laureado com o prêmio Nobel da Medicina e Fisiologia por seus significantes achados e contribuição do papel do NO no sistema cardiovascular.

1.2.2. Sinalização mediada por NO (fisiológico x patológico)

Desde sua caracterização na década de 70, milhares de trabalhos científicos foram publicados demonstrando o papel do NO em diferentes processos biológicos.

O NO é produzido fisiologicamente em diversos tecidos e pode ser considerado um mediador de comunicação entre as células. Como descrito acima, o principal precursor da

síntese do NO é a L-arginina, que será substrato para a enzima oxido nítrico sintase (do inglês: nitric oxide synthases; NOS), na presença de outros cofatores como: NADPH (nicotinamide adenine dinucleotide phosphate); BH₄ (tetrahydrobiopterin); FAD (flavin adenine dinucleotide); FMN (flavin adenina mononucleotide) e iron protoporphyrin IX (heme) (Guix et al., 2005). Atualmente, são conhecidas três isoformas da enzima NOS: a isoforma neuronal (nNOS ou NOS1); a induzível (iNOS ou NOS2) e a isoforma endotelial (eNOS ou NOS3). As nomenclaturas estão associadas com os tipos celulares onde foram primariamente identificadas e apresentaram uma maior expressão (Guix et al., 2005). As isoformas nNOS e eNOS são constitutivas e dependentes de cálcio para desencadear suas atividades, através da formação do complexo cálcio-calmodulina (Ca²⁺/CaM), que induz uma alteração conformacional na enzima NOS e sua subsequente ativação. Ademais, a atividade enzimática é rapidamente inibida através do aumento da concentração de íons Ca²⁺; pelo próprio NO e também por fosforilação induzida por PKC (protein Kinase C). Por outro lado, a isoforma iNOS é induzível e, em níveis basais, sua expressão é muito baixa. A expressão da isoforma iNOS está relacionada com estímulos imunológicos e inflamatórios (Amitai, 2010). A atividade da iNOS independe de cálcio, pois apresenta uma ligação constitutiva com a calmodulina, produzindo NO durante todo o tempo de meia vida da enzima (Abu-Soud and Stuehr, 1993; Guix et al., 2005; Amitai, 2010).

O principal alvo intracelular do NO é a enzima guanilato-ciclase solúvel (sGC), que através da interação com o grupo heme dessa enzima, induz à conversão de GTP (trifosfato de guanosina) em cGMP (monofosfato de guanasina cíclico). O cGMP, por sua vez, estimula a atividade da proteína cinase I e II (PKG1 e PKG2) e também da enzima fosfodiesterase de nucleotídeos cíclicos (PDE), mecanismos que estão relacionados com a plasticidade sináptica e também com a neurotransmissão (Zhu and Luo, 1992; Son et al., 1996; Wegener et al., 2000; Mishra et al., 2002; Calabrese et al., 2007; Garthwaite, 2008). Além disso, o NO regula a sinalização proteína cinase B (PKB/Akt) e do fator de transcrição CREB (do inglês: cyclic-

AMP-responsive-element-binding protein), relacionados com sobrevivência celular e neuroproteção (Mishra et al., 2002; Contestabile and Ciani, 2004; Calabrese et al., 2007). O NO também interage diretamente com proteínas, através da S-nitrosilação (SNO-proteína), que é a adição covalente de uma molécula de NO em um resíduo de cisteína. Essa adição resulta em alterações estruturais da proteína, na sua atividade enzimática, interação proteína-proteína e também na localização intracelular (Santos et al., 2015; Montagna et al., 2016; Nakamura and Lipton, 2016a, 2016b). Em processos neuropatológicos, os níveis de NO, assim como seus metabólitos (nitrato, NO_3^- e nitrito, NO_2^-), estão elevados, estando relacionados com modificações no DNA, alterações na sinalização intracelular, aumento de espécie reativas de nitrogênio (RNS) e alterações pós-traducionais (PTM) de proteínas (Santos et al., 2015; Montagna et al., 2016; Nakamura and Lipton, 2016b).

Como acima descrito, o estresse induz um aumento da liberação de glutamato e ativação do receptor NMDA em estruturas do sistema límbico, resultando no aumento da síntese e liberação de NO, através da rápida ativação da enzima nNOS (Garthwaite et al., 1988; Do et al., 2002; Guix et al., 2005). Isso porque a isoforma nNOS é fisicamente acoplada ao receptor NMDA, através da proteína PSD-95 (do inglês: Postsynaptic density protein-95). Assim, a ativação do receptor NMDA em células que expressam a enzima nNOS induz a atividade enzimática da nNOS e a síntese de NO (Christopherson et al., 1999; Wegener and Joca, 2016). Por ter um caráter dual, principalmente no SNC, o NO é considerado uma molécula “Janus Face”, uma alusão ao deus grego Janus que apresenta duas faces (Calabrese et al., 2009b). Embora o envolvimento do NO tenha sido descrito em diversas doenças neuropsiquiátricas (Joca et al., 2015), no presente estudo iremos destacar o papel do NO na DM.

1.2.3. NO e depressão

A primeira evidência clínica do papel do NO na DM foi demonstrada por Naylor e colaboradores em 1987, em um trabalho onde o tratamento com azul de metileno apresentou

um efeito antidepressivo (Naylor et al., 1987). Porém, neste estudo não se relata o efeito do azul de metileno sob a sinalização do NO. Somente anos mais tarde se demonstrou que o azul de metileno inibia a sGC e também a enzima NOS (Mayer et al., 1993). Interessante, os efeitos terapêuticos do azul de metileno só foram observados após o tratamento crônico por 4 semanas, efeito semelhante ao dos antidepressivos clássicos (Naylor et al., 1987). Corroborando com os dados clínicos, o azul de metileno demonstrou efeito tipo antidepressivo no teste do nado forçado (Eroğlu and Cağlayan, 1997). Ademais, pacientes com diagnóstico de DM apresentaram aumentos nos níveis de nitrato no plasma (Suzuki et al., 2001; Xing et al., 2002; Lu et al., 2014) e um aumento na expressão da enzima nNOS na região CA1 do hipocampo (Oliveira et al., 2008). Além disso, foi demonstrado que o polimorfismo (SNP; single nucleotide polymorphism) nos genes que expressão as enzimas nNOS e iNOS estão relacionados com uma maior suscetibilidade para desenvolver DM (Gałecki et al., 2011). Cabe aqui descrever que os antidepressivos clássicos também modulam a expressão do NO e a atividade enzimática da NOS em estudos pré-clínicos (Finkel et al., 1996; Harkin et al., 1999; Suzuki et al., 2001; Wegener et al., 2003), sugerindo que os efeitos antidepressivos estão relacionados com a modulação do NO no SNC. Nos anos de 1990, uma série de inibidores da atividade enzimática da NOS foram sintetizados, contribuindo para o esclarecimento do papel do NO na DM, principalmente em estudos pré-clínicos (Wegener and Volke, 2010; Mukherjee et al., 2014).

1.2.4. Efeito tipo antidepressivo dos inibidores da NOS

Diferentes abordagens farmacológicas demonstraram o efeito agudo ou crônico da inibição da atividade enzimática da NOS sob alterações comportamentais induzidas pelo estresse (Caroline Biojone, 2013; Hiroaki-Sato et al., 2014; Joca et al., 2015; Wegener and Joca, 2016; Stanquini et al., 2017). A inibição farmacológica da atividade da enzima NOS diminuiu o tempo de imobilidade no teste do nado forçado (forced swim test – FST), teste preditivo para

avaliação de fármacos antidepressivos (Porsolt et al., 1978; Montezuma et al., 2012; Hiroaki-Sato et al., 2014). Além disso, o tratamento crônico com inibidores da nNOS (3-bromo-7-nitroindazole) ou da iNOS (1400W) atenuaram as alterações comportamentais (FST e preferência pela sacarose) induzidas pelo estresse crônico variado (CUS; chronic unpredictable stress) em ratos (Peng et al., 2012; Yazir et al., 2012). Semelhantemente ao antidepressivos convencionais, o tratamento repetido, mas não agudo, dos os inibidores da NOS apresentaram um efeito tipo antidepressivo no teste do desamparo aprendido em ratos (Joca et al., 2006; Stanquini et al., 2017). Ademais, animais com deleção gênica da isoforma iNOS apresentaram um fenótipo tipo antidepressivo, avaliado no FST (Montezuma et al., 2012). Em conjunto, essas abordagens farmacológicas demonstram a participação do NO na sinalização central relacionada com o estresse e com a DM, conforme revisado em (Wegener and Volke, 2010).

O NO tem relevante papel na sinalização serotoninérgica no SNC, visto que a isoforma nNOS interage fisicamente com o transportador de serotonina (Chanrion et al., 2007). Ademais, a inibição da síntese de serotonina induzida pelo PCPA (para-clorofenilalanina, (Harkin et al., 1999)) ou o antagonismo do receptor 5HT1A diretamente no hipocampo (Hiroaki-Sato et al., 2014), bloqueia o efeito tipo antidepressivo do inibidor da nNOS. Em cultura de células do hipocampo, o tratamento com serotonina ou o com agonista do receptor serotoninérgico (8-OH-DPAT), diminuiu a expressão da enzima nNOS, ao passo que o antagonismo do receptor 5-HT1A (NAN-190) induziu um aumento na expressão da enzima nNOS (Zhang et al., 2010). Os dados reforçam as evidências acerca dos efeitos terapêuticos dos antidepressivos clássicos na modulação da neurotransmissão nitrérgica, bem como a interação entre os sistemas serotoninérgico e nitrérgico.

A neurogênese, que é o surgimento de novas células neuronais, ocorre principalmente na zona subgranular do hipocampo adulto (Christie and Cameron, 2006; Levone et al., 2015). O estresse tem relevante efeito na diminuição na neurogênese, no qual é revertido pelo

tratamento com antidepressivo clássico (Malberg and Duman, 2003). Suportando a hipótese de que os efeitos terapêuticos dos antidepressivos estão relacionados com a restauração da neurogêneses (Duman et al., 2001; Santarelli et al., 2003; Levone et al., 2015). Também foi observado que células precursoras do giro denteado do hipocampo (DG) expressavam a enzima nNOS, sugerindo o papel do NO na neurogênese (Islam et al., 2003). Corroborando com essas achados, o tratamento farmacológico com 7-nitroindazole (7-NI), que apresenta uma maior seletividade para a isoforma nNOS, bloqueou a diminuição da marcação com BrdU (bromodeoxiuridina, utilizado para a marcação de novas células) no DG de ratos submetidos ao protocolo de estresse crônico variado (Zhu et al., 2006). Igualmente, animais knockout para a isoforma nNOS apresentaram uma maior marcação para BrdU comparado ao controle (Zhou et al., 2007), sugerindo o papel do estresse e do NO nos mecanismos que regulam a neurogêneses.

O óxido nítrico também modula a expressão e a atividade do BDNF. O tratamento com doadores de NO diminuem os níveis de BDNF em cultura de células do hipocampo (Canossa et al., 2002). Além disso, o tratamento farmacológico repetido com inibidores da NOS induziu aumento de BDNF no hipocampo (Pinnock and Herbert, 2008; Stanquini et al., 2017) e atenuou a redução da atividade do receptor TrkB no hipocampo de ratos submetidos ao estresse do desamparo aprendido (Caroline Biojone, 2013). Porém, ainda não está claro por qual mecanismo celular o NO influencia a sinalização BDNF-TrkB em estruturas do sistema límbico.

Recentemente, alguns trabalhos têm demonstrado a participação do NO em processos intracelulares envolvidos com modificações epigenéticas (Campos et al., 2007; Katayama et al., 2009), o que será detalhado abaixo.

1.3. Alterações epigenéticas

1.3.1 Conceitos gerais sobre epigenética

Epigenética é um processo dinâmico que induz alteração na expressão de genes não relacionadas a modificações na sequência de bases do ácido desoxirribonucleico (DNA). O termo epigenética foi usado primeiramente por Conrad Waddington, no ano de 1939, para descrever as alterações na expressão de genes influenciadas por fatores ambientais (Haig, 2004). Esse processo ocorre através da mudança estrutural da cromatina (eucromatina ou heterocromatina), influenciando a expressão gênica (Mahgoub and Monteggia, 2013). Diversos mecanismos epigenéticos estão envolvidos no controle da estrutura da cromatina como: acetilação, metilação, ubiquitinação, SUMOilação, ADP-ribosilação, fosforilação e microRNA, influenciando à expressão gênica (Matrisciano et al., 2016). Esses mecanismos regulam diversos processos durante o desenvolvimento embrionário, diferenciação celular, além de regular a resposta celular frente a estímulos, influenciando a formação, armazenamento e consolidação da memória (Martín-Subero, 2011; Mahgoub and Monteggia, 2013; Matrisciano et al., 2016).

Embora se conheça diversos fatores epigenéticos, a metilação e/ou a acetilação de histonas, bem como a metilação do DNA são os mecanismos mais estudados (Matrisciano et al., 2016). A metilação do DNA, assim como a acetilação ou metilação das histonas são fatores epigenéticos reversíveis que controlam o estado aberto/relaxado ou condensado da cromatina (Bird, 1986; Kim et al., 2009; Mahgoub and Monteggia, 2013). Existe uma variedade de enzimas que controlam tais mecanismos e promovem mudanças de conformação da cromatina e alterações na expressão gênica (Okano et al., 1999; Mahgoub and Monteggia, 2013).

1.3.2 Metilação do DNA, estresse e depressão

Nos últimos anos, a metilação do DNA tornou-se um importante alvo de estudo acerca das alterações na expressão gênica induzidas pelo estresse (Vialou et al., 2013; Fass et al., 2014). Essas modificações ocorrem através da adição covalente de um grupo metil, proveniente do grupo S-adenosil-metionina (SAM), na posição 5' do anel pirimidínico da citosina em dinucleotídeo citosina-fosfato-guanina (CpG), e é mediado pelas enzimas DNA metiltransferases (DNMTs), formando um composto chamado 5-metilcitosina (5-mC). A metilação do DNA favorece a ligação de proteínas específicas (methyl binding domain proteins; MBDs), histona deacetilases (histone deacetylases; HDAC) e histona metiltransferases (histone methyltransferases; HMT) responsáveis pela condensação da cromatina, inibindo a transcrição gênica (Weber and Schübeler, 2007; Kim et al., 2009; Elliott et al., 2010; Mahgoub and Monteggia, 2013). As DNMTs são uma família de enzima representadas por cinco subtipos DNMT1, DNMT2, DNMT3a, DNMT3b e DNMT3L, sendo que três delas (DNMT1, DNMT3a e DNMT3b) são funcionais e amplamente estudadas. O subtipo DNMT1 tem um papel na metilação de manutenção, copiando a metilação pré-existente no DNA parental para o DNA da célula-filha durante a fase de replicação. Já os subtipos da enzima DNMT 3a e 3b (conhecidas como DNMTs *de novo*) são responsáveis por novas metilações em sequências CpG não metiladas, estabelecendo novos padrões de metilação em processos iniciais da neurogênese, assim como no SNC maduro (Okano et al., 1999; Jeltsch, 2006; Feng et al., 2010).

A metilação do DNA tem relevante influencia na atividade do eixo HPA e na DM (Vialou et al., 2013; Nagy et al., 2017). Roedores submetidos ao paradigma experimental de estresse na primeira infância (early life stress) apresentaram um aumento da metilação na região promotora do gene NR3C1 (F1) que codifica o receptor GR, apresentando uma menor expressão deste receptor e uma susceptibilidade ao estresse na vida adulta (Szyf et al., 2007; Nagy et al., 2017). Recentemente foi descrito que o estresse agudo induz uma redução na

expressão receptor mRNA para o GR no DG de ratos submetido ao estresse do nado forçado, no qual foi correlacionado com aumento da metilação do DNA e da expressão da enzima DNMT3a (Mifsud et al., 2017).. Esses dados sustentam os achados clínicos, onde se observou aumento da metilação do gene para GR em pacientes que sofreram abuso durante a infância e também em suicidas (McGowan et al., 2009; Labonte et al., 2012; Nagy et al., 2017). Sugerindo o envolvimento da metilação do DNA a curto e também de longo prazo na regulação do eixo HPA

A redução dos níveis de BDNF tem sido proposto como a causa do desenvolvimento da DM, visto que o tratamento como antidepressivos clássicos induzem aumento desta neurotrofina (Duman et al., 1997; Schmidt and Duman, 2007; Castrén and Rantamäki, 2010). Em pacientes com DM foi observado aumento da metilação do DNA na região promotora do gene BDNF, correlacionado com diminuição na expressão desta neurotrofina (Keller et al., 2010; Fuchikami et al., 2011; Duclot and Kabbaj, 2015). Ademais, pacientes com DM tem uma elevada expressão do mRNA para as enzimas DNMT3b, no qual o efeito terapêutico dos antidepressivos foram correlacionados com a diminuição desta enzima (Higuchi et al., 2011). O comportamento tipo depressivo em roedores expostos ao estresse na primeira infância, foi correlacionado com a diminuição da expressão do BDNF. Esse efeito foi dependente do aumento da metilação do exon 4 para o BDNF e da expressão da enzima DNMTs (Boersma et al., 2014). Também foi demonstrado que camundongos submetidos ao estresse crônico por derrota social apresentaram um aumento da expressão da enzima DNMT3a no núcleo accumbens (LaPlant et al., 2010). Interessante, o aumento da expressão do BDNF por antidepressivo, está relacionado com a diminuição da atividade e/ou expressão da DNMTs (Chen et al., 2011; Zimmermann et al., 2012; Gassen et al., 2015). Zimmerman e colaboradores, demonstraram que a incubação por um período prolongado com antidepressivos em cultura de célula de astrócitos reduz a atividade da enzima DNMT1, modulando indiretamente a metilação

do DNA (Zimmermann et al., 2012). Embora exista uma complexa sinalização sobre a expressão do BDNF, a metilação do DNA parece ter relevante papel na neurobiologia da depressão e também no efeito terapêutico dos antidepressivos sobre a atividade da DNMTs (Feng et al., 2010).

Atualmente, os inibidores das DNMTs (DNMTi) são aprovados pelo órgão regulador do Estados Unidos da América (Food and Drug Administration; FDA) para o tratamento de alguns tipos de câncer (Singh et al., 2013). O mais conhecido é o 5-Aza-2'-deoxycytidina (5-AzaC; decitabine) e seu análogo o 5-azacitidina (5-Aza), os quais são inibidores inespecíficos das enzimas DNMTs. O mecanismo de ação destas moléculas estão relacionados com sua incorporação ao DNA, uma vez que as enzimas DNMTs reconhecem essas moléculas como substrato, e ao se ligarem a elas tornam-se inativas e são degradadas (Christman, 2002; Stresemann et al., 2006). Outro inibidor da DNMT é o n-ftaloil-l-triptofano (RG108), é um inibidor não nucleosídico e apresenta uma menor toxicidade. O mecanismo de ação desta molécula se dá através da inibição no sítio catalítico da enzima DNMT, impedindo que ela reconheça o seu alvo (Stresemann et al., 2006).

Dados publicados pelo nosso grupo demonstraram que a administração sistêmica ou intra-hipocampal do 5-azaD ou do RG108 induziu redução da imobilidade avaliada nos testes do nado forçado e também no teste da suspensão pela cauda, demonstrando pela primeira vez o efeito tipo antidepressivo dos inibidores da DNMT (Sales et al., 2011; Sales and Joca, 2016). Esses efeitos foram acompanhados pela diminuição da metilação global do DNA e um aumento dos níveis de BDNF no hipocampo (Sales et al., 2011), sugerindo que o estresse promova aumento da metilação do gene para BDNF, reduzindo sua expressão, e assim levando a comportamento do tipo-depressivo em modelos animais. Corroborando essas informações animais knockout para a enzima DNMT1 apresentaram um fenótipo tipo antidepressivo avaliado no teste do nado forçado (Morris et al., 2016).

O tratamento crônico com antidepressivo imipramina diminui a expressão da enzima DNMT3b no córtex pré-frontal de ratos submetidos ao paradigma experimental do desamparo aprendido (Sales and Joca, 2018). Sales e colaboradores também demonstraram que doses sub-efetivas de inibidores da DNMT (RG-108 ou 5-AzaD) associadas com doses sub-efetivas de antidepressivos (fluoxetina ou desipramina) apresentaram efeito tipo antidepressivo no teste do nado forçado (Sales and Joca, 2016). Esses dados sugerem um mecanismo comum dos antidepressivos e dos inibidores da DNMTs na modulação nas alterações comportamentais induzidas pelo estresse.

1.3.3 NOS/NO e metilação do DNA

Diversas alterações epigenéticas são desencadeadas pelo envelhecimento, doenças cardiovasculares, pulmonares, câncer, tabagismo e pelo estresse. Interessantemente, estes processos patológicos estão relacionados com um aumento da síntese do NO e espécies reativas de oxigênio (ROS). Com relevância para o presente estudo, foi demonstrado que o estresse oxidativo diminui os níveis de homocisteína (Hcy), um elemento importante no ciclo da metionina (doador universal de metila), assim como um aumento dos níveis de glutathione (GSH) e da expressão das enzimas DNMT1 e DNMT3b em cultura celular de melanócitos (Campos et al., 2007). Corroborando esses achados, foi demonstrado que a infecção induzida por *Helicobacter pylori* ou por *Lipopolissacarídeo* (LPS), em cultura de célula epitelial, induziu aumento na atividade da enzima iNOS e um aumento nos níveis de NO, acompanhados pelo aumento da metilação do gene *runx3* (supressor tumoral), prevenido pelo tratamento com o inibidor seletivo para iNOS (Katayama et al., 2009). Esses dados sugerem o envolvimento do NO e das enzimas NOS nas vias intracelulares que modulam a metilação do DNA. Porém, não há relatos do papel dos inibidores da NOS sob a metilação do DNA em ratos submetidos ao estresse.

Diante dos efeitos dos inibidores da NOS sobre as alterações comportamentais e também moleculares induzidas pelo estresse (Wegener and Joca, 2016) e o envolvimento do NO da atividade e expressão das enzimas DNMTs (Campos et al., 2007; Katayama et al., 2009). Entretanto os dados sobre o papel do NO na metilação do DNA não estão totalmente esclarecidos. Diante desses achados, abrem-se diversas questões a respeito do papel do NO e das enzimas NOS nas vias intracelulares envolvidas na metilação do DNA em genes relacionados com a neurobiologia da depressão.

1.4 Hipótese

Dada a supracitada relação do estresse com a metilação do DNA e com ativação da sinalização NMDA/nNOS/NO no hipocampo de ratos, a hipótese deste trabalho é que o NO poderia influenciar a atividade ou a expressão das DNMTs, induzindo modificações epigenéticas no DNA, através da metilação em regiões promotoras de genes sabidamente relacionados com a resposta ao estresse e à depressão maior.

2. Objetivos

2.1. Objetivos Gerais

Avaliar o envolvimento do NO na modulação da metilação do DNA in vitro (cultura de células de hipocampo desafiadas com mediadores da resposta ao estresse) e in vivo (cérebro de ratos submetidos ao estresse).

2.2. Objetivos específicos

2.2.1. Estudo 1

O objetivo deste estudo foi avaliar o efeito do inibidor da nNOS, em cultura celular de hipocampo desafiadas com NMDA, dexametasona ou L-arginina, sob as alterações intracelulares relacionadas com a metilação do DNA. Os objetivos específicos desse estudo foram:

- (i) Avaliar se a inibição da NOS ou das DNMTs modifica a expressão gênica (DNMTs, nNOS, BDNF, NT4 e TrkB) em cultura células desafiadas com NMDA.
- (ii) Avaliar se a inibição da NOS modifica a expressão gênica (DNMTs, nNOS e BDNF) em cultura células desafiadas com glicocorticóide (dexametasona).
- (iii) Avaliar se administração do precursor da síntese NO, L-arginina, altera a expressão de DNMT3b, na presença e na ausência de inibidor da nNOS.
- (iv) Avaliar os efeitos dos tratamentos com NMDA ou dexametasona sobre os níveis proteicos de DNMT3b e nNOS.

2.2.2. Estudo 2

A segunda parte do estudo teve como objetivo avaliar a participação do NO na metilação do DNA no cérebro de ratos em resposta ao estresse do desamparo aprendido (choques inescapáveis).

- (v) Avaliar o efeito da administração sistêmica e repetida do inibidor da nNOS (7-nitroindazole – 7NI) ou do inibidor da iNOS (aminoguanidina – AMG) sobre as alterações comportamentais induzidas por choques inescapáveis nas patas.
- (vi) Avaliar o efeito da administração sistêmica e repetida do inibidor da nNOS (7-nitroindazole – 7NI) ou do inibidor da iNOS (aminoguanidina – AMG) sobre a metilação global do DNA no córtex pré-frontal, hipocampo dorsal e ventral de ratos submetidos a choques inescapáveis nas patas.
- (vii) Avaliar a expressão do mRNA para a enzima DNMT, nNOS, iNOS e BDNF no hipocampo ventral e dorsal de ratos submetidos aos choques inescapáveis nas patas.
- (viii) Avaliar o efeito do tratamento com 7-NI ou AMG sob a expressão do mRNA para a enzima DNMT3b no hipocampo dorsal e ventral de ratos submetidos aos choques inescapáveis nas patas.

3. Estudo 1

3.1. Materiais e Métodos

3.1.1. Cultura celular

Para cultura primária de hipocampo foram utilizados embriões de ratos Wistar (entre 17-18 dias de gestação). Os hipocampus foram dissecados com auxílio de lupa (Esteriomicroscópio Zeiss Stemi 305) e imediatamente colocados em solução de dissociação celular (contendo: 2,5 mg de papaína, 10 mg de DL-cyteina-HCl, 10 mg BSA, 250 mg glucose em 50 ml PBS; pH 7.2), por 10 min. Com auxílio de uma pipeta tipo *Pasteur* de plástico as células foram trituradas, centrifugadas por 5 minutos à 100 g em temperatura ambiente. O *pellet* contendo as células foram ressuspensos em meio de cultura (contendo 9.8 ml of Ca²⁺/Mg²⁺ livre HBBS, 1 mM sodium pyruvate, 10 mM HEPES (pH 7.2) e 10 µl DNase I e novamente centrifugado (por 5 minutos à 100 g, temperatura ambiente). As células foram ressuspensas com meio de cultivo (Neurobasal: suplementado com 2% de B27, 1% de penicilina/estreptomicina e 1% de glutamina) e plaqueadas em placas de 24 poços revestidas de poly-lysine (Sigma–Aldrich) em uma densidade 250.000 células por poço. As culturas primárias do hipocampo foram mantidas em meio de cultura específico (Neurobasal: suplementado com 2% de B27, 1% de penicilina/estreptomicina e 1% de glutamina) e foram incubadas a 37°C em 5% de CO₂. O meio de cultura foi trocado 3 vezes por semana, conforme protocolo previamente padronizado (Antila et al., 2014). Todos os experimentos com culturas primárias de hipocampo foram realizados após 14 dias de cultivo. Todos os protocolos experimentais foram aprovados pelo comitê de ética local. x

Células imortalizadas de hipocampo conhecidas como HiB5 (célula derivada de hipocampo de embrião de ratos) foram imortalizadas através do antígeno SV40 T e foram mantidas em meio de cultura (DMEM, Dulbecco's modified Eagle's médium) contendo 10% soro fetal bovino (fetal bovine serum - FBS) a 33°C em incubadora com 5% CO₂ (condição de

proliferação). Para os experimentos, as células HiB5 foram mantidas em DEMEM (0.5% de FBS por 5 dias), em incubadora contendo 5% CO₂ a 37° C (Renfranz et al., 1991; Park et al., 2015).

3.1.2. Tratamento farmacológico

As células foram incubadas com NMDA (30 µM, por 5 min, 10 min ou 1h; Sigma–Aldrich), dexametasona (1µM, por 5 min, 10 min, 1h ou 24h, Sigma–Aldrich) ou L-Arginina (0.5 mM, por 1h ou 24h, Sigma–Aldrich). Os tratamentos farmacológicos foram realizados com o inibidor seletivo da enzima nNOS, N-propyl L-arginina (NPA, 100 nM, Sigma–Aldrich) ou o com inibidor não seletivo da enzima DNMTs, 5-Aza-2-deoxycytidine (10 µM, Sigma–Aldrich), 30 min antes das células serem desafiadas com NMDA, dexametasona ou L-arginina. Todas as concentrações e tempo de tratamentos foram realizados conforme descrito em estudos prévios (Sandoval et al., 2011; Anacker et al., 2013; Xiong et al., 2014). As diluições das substâncias foram preparadas com tampão fosfato (PBS 1X), no momento do uso.

3.1.3. Extração do RNA total

Após o termino dos experimentos, o meio de cultura foi removido e acrescentado 500µL de solução tampão fosfato (PBS 1x, temperatura ambiente) e removido em seguida. O RNA total foi extraído usando 500 µL de reagente Trizol® (Life technologies) por poço e incubado por 5 minutos, sob agitação constante. O conteúdo de 2 poços (mesmo grupo experimental) foram transferidos para único tubo plástico de 1,5 mL. O protocolo foi realizado conforme descrito pelo fabricante. Em cada amostra foi adicionado 200 µL de clorofórmio (Merck S/A), seguido de centrifugação 12,000 g por 10 minutos, a 4°C. A fase aquosa (superior transparente, que contém o RNA total) foi transferida para outro tubo plástico (1,5 mL) e acrescentado 480

mL de isopropanol (Merck S/A), seguido de incubação por 10 minutos, em temperatura ambiente, e centrifugação à 12,000 g, por 10 minutos, a 4°C. Neste momento foi possível observar um pequeno *pellet* no fundo de cada tubo. O sobrenadante foi descartado e acrescentado 1 mL de álcool 75% e incubado por 5 minutos, seguido pela centrifugação a 12,000 g, por 5 minutos, a 4°C (este passo foi repetido 2 vezes). Finalmente, foi acrescentado 1 mL em cada tubo de álcool 100%, seguido pela centrifugação a 12,000 g, por 5 minutos, a 4°C. O sobrenadante foi descartado e o *pellet* foi seco à temperatura ambiente, por 20 minutos. O *pellet* foi ressuspensionado com 20 µL de água ultrapura livre de DNAses/RNAses. A quantificação foi realizada em espectrofotômetro (Nanodrop 2000C spectrophotometer, Thermo Scientific), e as amostras utilizadas apresentaram uma densidade ótica (OD) entre 1,85 – 2,0. A integridade do RNA total foi avaliada através do gel de agarose 1% marcado com corante GelRed (10,000X em água, FR/0,5 ml, Biotium-41003), onde as amostras apresentaram duas bandas referentes ao RNA ribossômico (28S/18S). As amostras utilizadas para a síntese do DNA complementar apresentaram pureza (OD = 1,85-2,0) e integridade.

3.1.4. Síntese do DNA complementar (cDNA)

Para a síntese de cDNA foi utilizado 2 µg de RNA total, com o auxílio do kit para síntese de cDNA (kit Maxima first strand cDNA synthesis kit for RT-qPCR with dsDNase; Thermo Scientific), conforme instruções do fabricante, volume final de 20 µL. Em cada tubo de plástico de 1,5 mL foram adicionados os seguintes reagentes: 1 µL de dsDNase buffer; 1 µL de dsDNase; 2 µg do RNA total; e água ultrapura para completar o volume de 10 µL. Os tubos plásticos foram incubados por 2 minutos a 37°C e em seguida foram centrifugados por 30 segundos a 12,000 g, 4°C. Em seguida foram adicionados os seguintes reagentes: 4 µL de 5X reaction mix; 2 µL de Maxima enzyme Mix e 4 µL de água ultrapura. Os tubos foram gentilmente agitados e centrifugados (30 segundos a 12,000 g, 4°C) e incubados por 10 min a

25°C, seguindo pela incubação à 50°C, por 30 minutos. No final da reação, os tubos foram incubados por 5 minutos à 85°C. Como controle foram realizados, (1) reverse transcriptase minus (RT-) negative control, que contém os reagentes para a transcriptase reversa, exceto o Maxima Enzyme Mix, e (2) non-template control (NTC), que contém todos os reagentes para a reação de transcriptase reversa, exceto o RNA total. No final da reação foi acrescentado 380 µL de água ultrapura livre de nuclease. As amostras foram armazenadas no freezer à - 80°C, até o momento do uso.

3.1.5. Reação de cadeia de polimerase (PCR) em tempo real (RT-qPCR).

Os oligonucleotídeos (*primers*) específicos utilizados para a amplificação do cDNA, listados abaixo (tabela 1), foram baseados em estudos anteriores (Karpova et al., 2010) ou desenhados com auxílio da ferramenta on-line PrimerQuest Toll (IDT integrated DNA Technologies). A especificidade dos oligonucleotídeos para *Rattus norvegicus* foram confirmadas por BLAST (Basic Local Alignment Search Tool, NCBI). Todos os pares de *primers* foram obtidos da Sigma-Aldrich. Como controle da PCRs, foram utilizados *primers* para genes endógenos (housekeeping *gene*): *gapdh* (Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase) ou *hprt1* (hypoxanthine phosphoribosyltransferase 1). A RT-qPCR foi realizada com auxílio do reagente SYBR Green qPCR Master Mix (2x), Thermo Scientific. A reação foi realizada no volume de 20 µL (10 µL de SYBR Green Master Mix 2x; 4 µL de água ultrapura, livre de nuclease, 0,5 µL de *primers* (*forward e reverse*, 0,25 µM) e 5 µL de cDNA (25 ng). As concentrações dos primers e do cDNA foram baseadas na eficiência máxima da reação. As reações de amplificações foram realizadas em triplicatas, em placa de 96 poços, com auxílio do termociclador (Bio-Rad C1000TM Thermal Cycle). A RT-qPCR foi realizada nas seguintes condições: 95°C por 10 min (temperatura de desnaturação) e 44 ciclos de 95°C por 15 segundos (desnaturação); 30 segundos (temperatura de anelamento dos primers estão

descritos na tabela 1) e 30 segundos a 72°C (temperatura de extensão). No final da reação, foi incluída a análise de curva de melting (fluorescência analisada entre 65°C a 95°C), em todos os experimentos observou-se somente um único pico, sugerindo que não houve amplificação de outro gene e/ou dimerização dos primers. Em cada corrida foram incluídos todos os grupos experimentais, bem como os controles (NTC e RT-). A partir das curvas de amplificação geradas foram determinados os números de ciclos (*Ct-Cycle threshold*) que passam na fase exponencial da curva sigmoide, no qual todas as amostras foram comparadas. Para a análise da expressão foi utilizado o método $2^{-\Delta\Delta C_t}$ (Livak and Schmittgen, 2001), que avalia a expressão relativa do gene de interesse em relação ao gene endógeno que não teve alteração em todos os grupos experimentais. As seguintes fórmulas foram empregadas: (1) $\Delta C_t = [C_t \text{ do gene alvo} - C_t \text{ do gene endógeno (housekeeping gene)}]$; (2) $\Delta\Delta C_t = [\Delta C_t \text{ gene do grupo experimental} - \Delta C_t \text{ médio do grupo controle}]$ e $2^{-(\Delta\Delta C_t)}$. Os resultados foram expressos como expressão relativa do gene alvo em relação ao gene endógeno (% CTRL). O gene *hprt1* não apresentou variação entre os grupos experimentais, sendo assim escolhido para todos os cálculos.

3.1.6. Tabela 1: Primers

Tabela 1		
Gene	Primers	mT °C
DNMT1	FWD: 5'-TAGAGCGTTCATGGGGCTG-3' REV: 5'-GGTGTTGTCTACCGAGTGGG-3'	60°
DNMT3a	FWD: 5'-ACAGAGAAACCCAACGTCAAC-3' REV: 5'-GGCTCCACATGAGATACAAA-3'	63°
DNMT3b	FWD: 5'-GAACAAACTCAAGGGACCAAAC-3' REV: 5'-GCCAGGAAGACTTAACCCATAA-3'	63°
NOS1	FWD: 5'-TCTACGCCACAGAGACAGGCAAAT-3' REV: 5'-CATGGACATTGCCTTGGCATCGAA-3'	63°
NOS2	FWD: 5'-AGCATCCCAAGTACGAGT-3' REV: 5'-AATCTCGGTGCCCATGTA-3'	63°
NOS3	FWD: 5'-CGGAGAATGGAGAGAGCTTT-3' REV: 5'-GGAGACACTGTTGAAATCGGA-3'	63°
BDNF (exon I)	FWD: 5'-CAAGACACATTACCTTCCTGCATCT-3' REV: 5'-ACCGAAGTAGTATGAAATAACCATAGTAGG-3'	63°
BDNF (exon III)	FWD: 5'-AAGTGTTTATCACCAGGATCTAGCCAC-3' REV: 5'-ACCGAAGTAGTATGAAATAACCATAGTAGG-3'	63°
BDNF (exon IV)	FWD: 5'-TGTTTACTTTGACAAGTAGTGACTGAA-3' REV: 5'-ACCGAAGTAGTATGAAATAACCATAGTAGG-3'	63°
BDNF (exon VI)	FWD: 5'-GAAGCGTGACAACAATGTGACTC-3' REV: 5'-ACCGAAGTAGTATGAAATAACCATAGTAGG-3'	63°
BDNF (exon IX)	FWD: 5'-GAAGGCTGCAGGGGCATAGACAAA-3' REV: 5'-TACACAGGAAGTGTCTATCCTTATG-3'	63°
GAPDH	FWD: 5'-TCCACGACATACTCAGCAC-3' REV: 5'-AACGACCCCTTCATTGAC-3'	60°
Hprt1	FWD: 5'-GCAGACTTTGCTTTCCTTGG-3' REV: 5'-CGAGAGGTCCTTTTCACCAG-3'	60°
TrkB	FWD: 5'-GAAGGGAAGTCTGTGACCATTT-3' REV: 5'-GTGTGTGGCTTGTTTCATTTCAT-3'	63°
NT4	FWD: 5'-GCAAGAGAGACGAGGAAAGAC-3' REV: 5'-TGATACGGTGCTCAGGATAGA-3'	63°

3.1.7. Western Blotting

Após a finalização do experimento, o meio de cultivo foi removido e as células foram lavadas rapidamente com solução tampão fosfato (PBS 1X). Em cada poço foi adicionada solução de lise celular (tampão NP⁺⁺ contendo: 137 mM NaCl, 20 mM Tris, 1% NP-40, 10% glicerol, 48 mM NaF, 2× inibidor de protease (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) e 2 mM Na₃VO₄) e incubado por 1h, 4°C, com constante agitação. O lisado celular foi transferido para um tubo plástico de 1,5 ml e centrifugado (16.000 g por 15 minutos, à 4°C), e o sobrenadante foi coletado. Para a corrida em gel de agarose (NuPAGE® Tris-Acetate Mini Gels (Life Technologies), 15 µL do sobrenadante foi misturado com 5 µL de tampão de Laemmi (4x). A corrida foi realizada com tampão (NuPAGE® Tris-Acetate SDS Running Buffer (20X)) diluído 20X; por 30min à 100V e 1h à 120V. Após o término da corrida, as amostras foram transferidas para uma membrana de PVDF (polyvinylidene fluoride.Hybond-P, GE Healthcare, Buckinghamshire, UK), com tampão de transferência (250 mM de Tris-base; 190 mM glicina e 20% de metanol) à 300 mA, 4°C por 1h. Após a transferência, as membranas foram lavadas com tampão TBS-T (20 mM de Tris-base; 137 NaCl e 1% de Tween® 20, pH = 7,4), por 5 minutos em temperatura ambiente. As membranas foram bloqueadas com tampão (TBS-T contendo 3% de albumina do soro bovino – BSA). Os anticorpos primários para nNOS total (1:1000; NOS1 antibody (A-11): sc-5302, Santa Cruz Biotechnology); nNOS fosforilada (S1417), forma ativada; 1:1000, catalog number ab5583; Abcam, UK) e anti-DNMT3b 1:750, catalog number ab16049; Abcam, UK), foram incubados por 18h, à 4°C. Os tampões com os anticorpos foram removidos e as membranas foram lavadas com tampão TBS-T por 5 minutos, em temperatura ambiente. As membranas foram incubadas por 2h com anticorpos secundários anti-coelho (anti-rabbit, STAR124P, 1:10,000, BioRad) ou anti-cabra (anti-goat, 305005, 1:10,000, BioRad), conjugado com HRP. Em seguida, as membranas foram lavadas 3 vezes com tampão TBS-T por 5 minutos, em temperatura ambiente. As membranas foram reveladas

com o kit de quimioluminescência (Pierce® ECL Plus western blotting substrate, catalog cod: 32134, Thermo Scientific). As imagens de cada membrana foram captadas com auxílio Analisador de imagem luminescente LAS-3000 (FujiFilm Life Science, Termro Medlabs, Vantaa, Finland). Para normalização foi utilizado anticorpo anti- β -3-tubulina (1:1000, catalog number #2146S, Cell Signaling Technology) ou anticorpo anti-GAPDH (1:1000, catalog number sc-32233; Santa Cruz Biotechnology, CA, USA) no mesmo protocolo descrito acima. A análise da intensidade foi analisada com auxílio do software ImageJ (NIH, Bethesda, MD, USA). Os dados foram expressos como porcentagem de expressão em relação ao controle (% CTRL).

3.1.8. Análise estatística

Os resultados foram expressos como a porcentagem média $\pm$ S.E.M. Os dados foram analisados por Teste *t de Student* ou ANOVA de duas vias, sendo os fatores primeiro tratamento (veículo ou NMDA / veículo ou dexametasona / veículo ou L-arginina) e segundo tratamento (veículo ou NPA/5-Aza), seguido pelo teste de múltipla comparação de Bonferroni. Valores de $p < 0,05$ foram considerados estatisticamente significantes. As análises foram realizadas com auxílio do programa estatístico GraphPad Prism (versão 7.0, GraphPad Prism Software, San Diego, CA, EUA).

3.2. Delineamento experimental

3.2.1. Experimento 1: Efeito do pré tratamento com NPA sobre a expressão do mRNA para as enzimas DNMTs, NOS, BDNF, NT4 e TrkB em cultura primária de células do hipocampo de ratos desafiadas com NMDA.

A fim de avaliar a participação do NO na regulação da expressão gênica em resposta à ativação de receptores NMDA, após 14 dias de cultivo, culturas primárias de células do hipocampo foram pré tratadas com inibidor seletivo da enzima nNOS (NPA 100 nM), 30 minutos antes da incubação com NMDA (30 μ M), por 1h. Ao final desse período, as células foram processadas para análise da expressão gênica por RT-qPCR (DNMTs, NOS, BDNF, NT4 e TrkB), conforme descrito anteriormente.

3.2.2. Experimento 2: Efeito do pré tratamento com 5-Aza sobre a expressão do mRNA para as enzimas DNMTs, NOS, BDNF, NT4 e TrkB em cultura primária de células do hipocampo de ratos desafiadas com NMDA.

A fim de investigar a participação da metilação de DNA sobre a expressão gênica induzida pelo desafio com NMDA, após 14 dias de cultivo, culturas primárias de células do hipocampo foram pré-tratadas com inibidor não seletivo para as enzimas DNMTs (5-Aza 10 μ M), 30 minutos antes da incubação com NMDA (30 μ M, por 1h). Ao final desse período, as células foram processadas para análise da expressão gênica por RT-qPCR (DNMTs, NOS, BDNF, NT4 e TrkB), conforme descrito anteriormente.

3.2.3. Experimento 3: Avaliação da expressão do mRNA para as enzimas DNMTs e nNOS em cultura primária de células do hipocampo ou cultura imortalizada HiB5 de ratos desafiados com dexametasona.

A fim de avaliar o efeito da dexametasona na regulação da expressão gênica das enzimas DNMT3b e nNOS, após 14 dias de cultivo, culturas primárias de células do hipocampo

ou 5 dias de cultivos das células imortalizadas HiB5 foram desafiadas com dexametasona (1 μ M, por 24h). Ao final desse período, as células foram processadas para análise da expressão gênica por RT-qPCR (DNMTs, nNOS), conforme descrito anteriormente.

3.2.4. Experimento 4: Efeito do pré tratamento com NPA sobre a expressão do mRNA para as enzimas DNMT3b, nNOS e BDNF em cultura primária de células do hipocampo ou cultura imortalizada HiB5 de ratos desafiados com dexametasona.

A fim de avaliar se o NO estaria envolvido nos efeitos induzidos pela dexametasona, culturas primárias de células do hipocampo (após 14 dias de cultivo), células imortalizadas HiB5 (5 dias de cultivos) foram pré tratadas com inibidor seletivo da enzima nNOS (NPA 100 nM), 30 minutos antes da incubação com dexametasona (1 μ M, por 1h ou 24h). Ao final desse período, as células foram processadas para análise da expressão gênica por RT-qPCR (DNMT3b, nNOS, BDNF), conforme descrito anteriormente.

3.2.5. Experimento 5: Efeito do pré tratamento com NPA sobre a expressão do mRNA para a enzima DNMT3b em cultura de células primária do hipocampo de ratos desafiados com L-arginina.

A fim de avaliar o efeito do precursor da síntese de NO na expressão da enzima DNMT3b, após 14 dias de cultivo, culturas primárias de células do hipocampo, foram pré tratadas com inibidor seletivo da enzima nNOS (NPA 100 nM), 30 minutos antes da incubação com L-arginina (0,5 mM, por 1h ou 24h). Ao final desse período, as células foram processadas para análise da expressão gênica por RT-qPCR (DNMT3b), conforme descrito anteriormente.

3.2.6. Experimento 6: Efeito do pré tratamento com NPA sobre os níveis de DNMT3b e nNOS em cultura primária de células do hipocampo ou cultura imortalizada HiB5 de ratos desafiados com dexametasona ou NMDA.

A fim de avaliar o efeito do desafio com NMDA ou dexametasona sobre a expressão das enzimas DNMT3b e nNOS, culturas primárias de células do hipocampo (após 14 dias de cultivo) ou células imortalizadas HiB5 (5 dias de cultivo) foram pré tratadas com inibidor seletivo da enzima nNOS (NPA 100 nM), 30 minutos antes da incubação com dexametasona (1 μ M, por 5 min; 10 min ou 24h) ou NMDA (30 μ M, por 5 min; 10 min ou 1h). A análise dos níveis de proteínas foi realizada por western blotting conforme descrito anteriormente.

3.3. Resultados

3.3.1. Efeito do NPA sobre expressão do mRNA da enzima DNMT1, DNMT3a, DNMT3b e nNOS em cultura primária de células do hipocampo de ratos desafiadas com NMDA.

O presente experimento foi realizado para avaliar se a ativação específica do receptor NMDA modularia a expressão das enzimas DNMTs e nNOS. Para isso, cultura primária de células do hipocampo foram desafiadas com NMDA (30 μ M), por 1h. Os nossos dados demonstram que o tratamento com NMDA aumentou significativamente a expressão do mRNA para a enzima DNMT3b (fator 1; $F_{1,32} = 4.263$, $p < 0.05$; figura 1C). Interessantemente, o pré-tratamento com inibidor seletivo para a isoforma da enzima nNOS (NPA, 100 nM, 30 min.) foi efetivo em bloquear o aumento da DNMT3b induzido pelo tratamento com NMDA (interação, $F_{1,32} = 4.851$, $p < 0.05$; figure 1C). Ademais, o tratamento com NPA não apresentou efeito *per se* (fator 2; $F_{1,32} = 1.212$, $p > 0.05$; figure 1C). Por outro lado, ambos os tratamentos farmacológicos (NMDA ou NPA) não modificaram a expressão do mRNA para DNMT1, DNMT3a e nNOS (fator 1, $F_{1,20} = 0.2535$, $p > 0.05$; $F_{1,20} = 0.8930$, $p > 0.05$ e $F_{1,20} = 0.7733$, $p > 0.05$; figura 1A, 1B e 1D, respectivamente) e (fator 2; $F_{1,20} = 1.209$, $p > 0.05$; $F_{1,20} = 0.3624$, $p > 0.05$ e $F_{1,20} = 2.590$, $p > 0.05$; 1A, 1B e 1D, respectivamente). Os dados sugerem que o desafio com NMDA modula a expressão de DNMT3b e que esse efeito envolve a participação do NO, uma vez que foi bloqueado pelo pré-tratamento com inibidor da nNOS.

Figura 1: Expressão gênica em cultura primária de célula do hipocampo desafiadas com NMDA: Expressão relativa de mRNA para DNMT1, DNMT3a, DNMT3b e nNOS, após o tratamento com NMDA (30 μ M, por 1h), com e sem pré-tratamento com NPA (100 nM). Cada coluna representa a porcentagem média da expressão relativa $\pm$ SEM. * $p < 0,05$, diferença significativa entre os grupos veículo/veículo *versus* NMDA/veículo; # $p < 0,05$, diferença significativa entre os grupos NMDA/veículo *versus* NMDA/NPA (100 nM). ANOVA de duas vias, seguido pelo teste de múltipla comparação de Bonferroni (N=9-6).

3.3.2. Efeito do NPA sobre expressão do mRNA para o BDNF em cultura primária de células do hipocampo desafiadas com NMDA.

Esse experimento foi realizado para avaliar se o NO estaria envolvido na regulação da expressão do mRNA para o BDNF em cultura primária de células do hipocampo desafiadas com NMDA. Os dados demonstram que o NMDA diminuiu significativamente os níveis do mRNA dos exon 1, exon 4 e exon 9 do BDNF (fator 1; $F_{1,20} = 12.75$, $p < 0.05$; $F_{1,20} = 12.38$, $p < 0.05$ e $F_{1,20} = 44.44$; respectivamente; figure 2A, 2C e 2E). Porém, o pré tratamento com NPA não reverteu esse efeito (interação; $F_{1,20} = 0.01636$, $p > 0.05$; $F_{1,20} = 0.03731$, $p > 0.05$ e $F_{1,20} = 0.7559$, $p > 0.05$; figure 2A, 2C e 2E, respectivamente). No entanto, a análise da expressão do exon 3 e exon 6 não demonstrou alteração significativa após o desafio com NMDA (fator 1;

$F_{1,20} = 0.1771$, $p > 0.05$ e fator 1; $F_{1,20} = 1.434$, $p > 0.05$, exon 3 e exon 6 respectivamente; figura 2B e 2D), bem como após o tratamento com NPA (fator 2; $F_{1,20} = 0.7425$, $p > 0.05$ e fator 2; $F_{1,20} = 0.3344$, $p > 0.05$, exon 3 e exon 6 respectivamente; figura 2B e 2D). A análise estatística demonstrou, ainda, ausência de interação entre os fatores (interação; $F_{1,20} = 3.754$, $p > 0.05$; $F_{1,20} = 3.523$, $p > 0.05$; exon 3 e exon 6, respectivamente; figura 2B e 2D). Portanto, os dados demonstram que o NMDA diminui a expressão do mRNA para o BDNF (exon 1, exon 4 e exon 9), porém esse efeito não deve envolver a participação do NO, uma vez que não foi bloqueado pelo inibidor da nNOS.

Figura 2: Expressão gênica de BDNF em cultura primária de célula do hipocampo desafiadas com NMDA: Expressão relativa do BDNF (exon 1, exon 3, exon 4, exon 6 and exon 9) em resposta ao desafio com NMDA (30 μ M, por 1h), na ausência e na presença de pré-tratamento com NPA (100 nM). Cada coluna representa a porcentagem média da expressão relativa $\pm$ SEM. * $p < 0,05$, diferença significativa entre os grupos veículo/veículo *versus* NMDA/veículo. ANOVA de duas vias, seguido pelo teste de múltipla comparação de Bonferroni (N=9-6).

3.3.3. Efeito do NPA sob expressão do mRNA para o TrkB e NT4 em cultura primária de células do hipocampo desafiadas com NMDA.

O objetivo deste experimento foi avaliar se o tratamento com NMDA ou NPA modularia a expressão de outros genes envolvidos com a neuroplasticidade, como o receptor TrkB (receptor para o BDNF) e de NT4, outro agonista endógeno para o receptor TrkB. Os resultados demonstram que ambos os genes, TrkB e NT4, não foram modificados pelo tratamento com NMDA (fator 1; $F_{1,20} = 0.9680$, $p > 0.05$ e $F_{1,20} = 0.6135$, $p > 0.05$; figura 3A e 3B, respectivamente), assim como o pré tratamento com NPA não demonstrou efeito *per se* (fator 2; $F_{1,20} = 0.07091$, $p > 0.05$ e $F_{1,20} = 0.002163$, $p > 0.05$; TrkB e NT4; figura 3A e 3B, respectivamente).

Figure 3: Expressão gênica em cultura primária de célula do hipocampo desafiadas com NMDA: Expressão relativa de TrkB e NT4 em resposta ao desafio com NMDA (30 μ M, por 1h). Cada coluna representa a porcentagem média da expressão relativa $\pm$ SEM. ANOVA de duas vias, seguido pelo teste de múltipla comparação de Bonferroni (N=9-6).

3.3.4. Efeito do 5-Aza sobre expressão do mRNA para DNMT3b, BDNF, TrkB e NT4 em células primárias do hipocampo desafiadas com NMDA

Para avaliar a participação das enzimas DNMTs nas alterações da expressão gênica induzida pelo NMDA, foi realizado novo experimento em que foi avaliado o efeito do pré-tratamento com o inibidor não seletivo das enzimas DNMTs (5-Aza; 10 nM). Confirmando nossos dados, cultura primária de hipocampo desafiadas com NMDA apresentaram níveis diminuídos do mRNA para o exon 1 e exon 9 do BDNF (fator 1, $F_{1,20} = 31.03$, $p < 0.05$ e $F_{1,20} = 5.672$, $p < 0.05$; exon 1 e exon 9 respectivamente; figura 4A e 4C). Porém, o pré-tratamento com 5-Aza não reverteu o efeito induzido pelo NMDA (interação; $F_{1,20} = 0.1934$, $p > 0.05$ e $F_{1,20} = 0.2545$, $p > 0.05$; exon 1 e exon 9 respectivamente; figura 4A e 4C), indicando que esse efeito não parece envolver a regulação da metilação de DNA. Interessantemente, o tratamento com 5-aza aumentou a expressão do mRNA para o exon 4 (fator 2, $F_{1,20} = 8.171$, $p < 0.05$; figura 4B), demonstrando um efeito *per se*. Novamente, o tratamento com NMDA aumentou a expressão do mRNA para DNMT3b (fator 1; $F_{1,20} = 15.02$, $p < 0.05$; figure 4D), porém o pré tratamento com 5-Aza não inibiu o efeito induzido pelo NMDA (interação $F_{1,20} = 3.90$, $p > 0.05$; figura 4D). O tratamento com NMDA não modificou a expressão do mRNA para TrkB ou NT4 (fator 1; $F_{1,20} = 0.0058$, $p > 0.05$ e $F_{1,20} = 1.489$, $p > 0.05$; TrkB e NT4, respectivamente; figura 4E e 4F), bem como o pré tratamento com 5-Aza (fator 2; $F_{1,20} = 0.09688$, $p > 0.05$ e $F_{1,20} = 1.206$, $p > 0.05$; TrkB e NT4, respectivamente; figura 4E e 4F). Os dados demonstram que as alterações induzidas pelo NMDA são independentes da atividade das enzimas DNMTs em cultura primárias de hipocampo.

Figure 4: Expressão gênica em cultura primária de célula do hipocampo desafiadas com NMDA: Expressão relativa do BDNF (exon 1, exon 4 e exon 9), DNMT3b, TrkB e NT4 em reposta ao desafio com NMDA (30 μ M, por 1h), na ausência e na presença de 5-Aza (10 nM). Cada coluna representa a porcentagem média da expressão relativa $\pm$ SEM. * $p < 0.05$, diferença significativa entre os grupos veículo/veículo *versus* NMDA (30 μ M)/veículo; & $p < 0.05$, diferença significativa entre os grupos veículo/veículo *versus* 5-Aza/veículo. ANOVA de duas vias, seguido pelo teste de múltipla comparação de Bonferroni (N=6).

3.3.5. Efeito do tratamento com dexametasona sobre a expressão do mRNA da DNMT1, DNMT3a, DNMT3b e nNOS em células do hipocampo.

Este experimento foi realizado para investigar se a ativação dos receptores para glicocorticoides regula a expressão do mRNA para DNMTs e nNOS, em cultura primária de células do hipocampo e em cultura de células hipocampais imortalizadas (HiB5). O tratamento com dexametasona (1 μ M, por 24h) induziu um aumento significativo nos níveis do mRNA para a DNMT3b em cultura primária de hipocampo ($t = 3.487$ e $df = 10$, $p < 0.05$; figura 5A). Porém, esse tratamento não modificou a expressão do mRNA das enzimas DNMT1 ($t = 1.122$ e $df = 10$, $p > 0.05$; figura 5B), DNMT3a ($t = 0.5683$ e $df = 10$, $p > 0.05$; figura 5C) e nNOS ($t = 0.8996$ e $df = 10$, $p > 0.05$; figura 5D). A análise das isoformas iNOS e eNOS em cultura primária de hipocampo não foram detectadas (dados não demonstrados).

O tratamento com dexametasona em cultura de células hipocampais imortalizadas (HiB5) induziu um aumento da expressão do mRNA para a enzima DNMT3b ($t = 2.509$ e $df = 10$, $p < 0.05$; figura 5E) e uma diminuição da expressão do mRNA para a enzima nNOS ($t = 20.8$ e $df = 10$; figura 5H). Porém, o tratamento com dexametasona não modificou a expressão do mRNA para as enzimas DNMT1 ($t = 1.873$ e $df = 10$, $p > 0.05$; figura 5F) e DNMT3a ($t = 0.3639$ e $df = 10$, $p > 0.05$; figura 5G). Semelhantemente à cultura primária de hipocampo, na linhagem HiB5 não foi detectada a expressão do mRNA para as enzimas iNOS e eNOS (dados não apresentados).

Em conjunto, os resultados demonstram que, em ambas as linhagens celulares, o tratamento com dexametasona induziu um aumento da expressão do mRNA para a enzima DNMT3b.

Figure 5: Expressão gênica em células do hipocampo desafiadas com dexametasona. Expressão relativa de DNMT1, DNMT3a, DNMT3b e nNOS em cultura primária de hipocampo ou em células HiB5 imortalizadas. Cada coluna representa a porcentagem média da expressão relativa $\pm$ SEM. * $p < 0.05$, diferença significativa entre os grupos veículo *versus* dexametasona (1 μ M, por 24h). Teste *t* de Student (N = 6).

3.3.6. Efeito do NPA sob a expressão do mRNA para DNMT3b em cultura primária de hipocampo e células HiB5 tratadas com dexametasona.

Para avaliar a participação do NO na modulação da expressão de DNMT3b induzida por dexametasona, células HiB5 ou células primárias do hipocampo foram pré tratadas com NPA. O tratamento com dexametasona por 24h aumentou os níveis do mRNA da DNMT3b em cultura primária de hipocampo (fator 1; $F_{1,20} = 4.252$, $p < 0.05$, figura 6A), e o pré-tratamento com NPA não apresentou efeito *per se* (fator 2; $p > 0.05$; figura 6A). Porém, o pré-tratamento com NPA bloqueou o aumento da expressão da enzima DNMT3b induzido pela dexametasona (interação, $F_{1,20} = 21.83$, $p < 0.05$; figura 6A). Semelhantemente, o pré-tratamento com NPA inibiu o aumento do mRNA para DNMT3b em cultura imortalizada HiB5 desafiada com dexametasona por 24h (fator 1, $F_{1,20} = 31.05$, $p < 0.05$ e interação, $F_{1,20} = 4.722$, $p < 0.05$, figura 6B).

Por outro lado, diferente do tratamento por 24h, o tratamento com dexametasona por 1h não induziu alteração na expressão do mRNA da enzima DNMT3b em cultura primária do hipocampo (fator 1; $F_{1,20} = 0.3062$, $p > 0.05$ e interação; $F_{1,20} = 2.666$, $p > 0.05$; figura 6C) ou em cultura HiB5 (fator 1; $F_{1,20} = 0.2273$, $p > 0.05$ e interação; $F_{1,20} = 1.745$, $p > 0.05$; figura 6D). Ademais, o tratamento com dexametasona por 1h ou 24h não modificou a expressão do mRNA para o BDNF (exon 1, exon 4 e exon 9) em cultura primária de hipocampo (dados não apresentados) e cultura HiB5 não expressou níveis quantificáveis de BDNF (dados não apresentados).

Figure 6: Expressão gênica em cultura de células do hipocampo desafiadas com dexametasona por 1h ou 24h: Expressão relativa da DNMT3b após 1h ou 24h de incubação com dexametasona (1 μ M), com e sem pré-tratamento com NPA (100 nM, 30 min antes do tratamento com dexametasona). Cada coluna representa a porcentagem média da expressão relativa $\pm$ SEM. * $p < 0.05$, diferença significativa entre os grupos veículo/veículo *versus* dexa (1 μ M)/veículo; # $p < 0.05$, diferença significativa entre os grupos veículo/dexa *versus* NPA/veículo. ANOVA de duas vias, seguido pelo teste de múltipla comparação de Bonferroni (N=6).

3.3.7. Efeito do NPA sobre a expressão do mRNA da NOS1 em cultura primária de células do hipocampo desafiadas com dexametasona.

O tratamento com dexametasona por 1h induziu um aumento significativo na expressão do mRNA para a enzima NOS1 (fator 1, $F_{1,20} = 54.81$, $p < 0.05$, figura 7A). Por outro lado, o desafio com dexametasona por 24h induziu uma diminuição significativa na expressão do mRNA para NOS1 (fator 1, $F_{1,20} = 31.86$, $p < 0.05$, figura 7B). Interessantemente, o pré tratamento com NPA não reverteu o efeito induzido pela dexametasona em ambos os tempos (interação, $F_{1,20} = 0.000146$, $p > 0.05$ e $F_{1,20} = 0.4359$, $p > 0.05$; 1h e 24h, respectivamente).

Figure 7:

Figure 7: Expressão gênica de NOS1 em cultura primária de célula do hipocampo desafiadas com dexametasona por 1h ou 24h: Expressão relativa da nNOS após 1h ou 24h de incubação com dexametasona (1 μ M), na presença e na ausência de NPA (100 nM, 30 min antes do tratamento com dexametasona). Cada coluna representa a porcentagem média da expressão relativa $\pm$ SEM. * $p < 0.05$, diferença significativa entre os grupos veículo/veículo *versus* dexa (1 μ M)/veículo ou com o grupo dexa (1 μ M)/NPA. ANOVA de duas vias, seguido pelo teste de múltipla comparação de Bonferroni (N=6).

3.3.8. Efeito do NPA sob expressão do mRNA para a DNMT3b em cultura primária de hipocampo desafiadas com L-arginina

Com o objetivo de verificar se a facilitação da síntese de NO em cultura primária de hipocampo teria efeito sobre a expressão do mRNA para a enzima DNMT3b, as células foram desafiadas com L-arginina. O tratamento com L-arginina por 1h induziu um aumento significativo nos níveis do mRNA para a enzima DNMT3b (fator 1; $F_{1,20} = 18.47$, $p < 0.05$), um efeito atenuado pelo pré-tratamento com NPA (interação, $F_{1,20} = 13.35$, $p < 0.05$; figure 8A). Por outro lado, o desafio com L-arginina ou o pré tratamento com NPA não alterou a expressão do mRNA para DNMT3b após 24h (fator 1; $F_{1,20} = 1.010$, $p > 0.05$ e interação; $F_{1,20} = 0.2246$, $p > 0.05$; figura 8B). Os dados sugerem que o aumento da síntese de NO facilita a expressão de DNMT3b em cultura primária de hipocampo.

Figure 8:

Figure 8: Expressão de DNMT3b em cultura primária de célula do hipocampo desafiada com L-arginina por 1h ou 24h: Expressão relativa da DNMT3b após 1h ou 24h de incubação com L-arginina (0,5 mM), com e sem pré-tratamento com NPA (100 nM, 30 min antes do tratamento com L-arginina). Cada coluna representa a porcentagem média da expressão relativa $\pm$ SEM. * $p < 0,05$, diferença significativa entre os grupos veículo/veículo *versus* L-arginina (0,5 mM)/veículo; # $p < 0,05$, diferença significativa entre os grupos veículo/L-arginina *versus* NPA/L-arginina. ANOVA de duas vias, seguido pelo teste de múltipla comparação de Bonferroni (N=6).

3.3.9. Efeito do tratamento com NMDA sobre os níveis de nNOS fosforilada (S1417) e de DNMT3b, em cultura primária de células do hipocampo.

Esse experimento foi realizado para avaliar o efeito do NMDA sobre os níveis da enzima nNOS ativa. Para isso foi analisado o resíduo (S1417) da nNOS, que está diretamente relacionada com a ativação desta enzima e com a produção de NO (Rameau et al., 2007). Além disso, foram avaliados os níveis proteicos da enzima DNMT3b, em cultura primária do hipocampo desafiada com NMDA. O tratamento com NMDA induziu diminuição significativa da pnNOS (S1417) após 5 min (fator 1, $F_{1,20} = 5.382$, $p < 0.05$, figura 9A) e uma tendência no tempo de 1h (fator 1, $F_{1,8} = 4.182$, $p = 0.0751$; figura 9C). O pré tratamento com NPA não reverteu o efeito induzido pelo NMDA (interação, $F_{1,20} = 0.03813$, $p > 0.05$ e $F_{1,8} = 1,133$, $p > 0.05$; 5 min e 1h, respectivamente; figura 9A e 9C). Em todos os tempos avaliados, o tratamento com NMDA não alterou os níveis da enzima nNOS total (dados não demonstrados). Por outro lado, os tratamentos com NMDA e com NPA não modificaram os níveis de pnNOS (S1417) no tempo de 10 min (fator 1; $F_{1,8} = 2,02$, $p > 0.05$ e interação; $F_{1,8} = 0,0027$, $p > 0.05$; 9B).

A análise da expressão da enzima DNMT3b também não alterou com o tratamento com NMDA (fator 1; $F_{1,20} = 0.1086$, $p > 0.05$; $F_{1,20} = 0.02365$, $p > 0.05$ e $F_{1,20} = 0.009467$, $p > 0.05$; 5min, 10min e 1h, respectivamente), bem como o tratamento com NPA (fator 2; $F_{1,20} = 0.02052$, $p > 0.05$, $F_{1,20} = 0.2922$, $p > 0.05$ e $F_{1,20} = 0.01391$, $p > 0.05$; 5 min, 10min e 1h, respectivamente), figura 9D-9F.

Figure 9: Expressão de nNOS (S1417) e DNMT3b em cultura primária de hipocampo de ratos tratados com NMDA. Cada coluna representa a porcentagem média $\pm$ SEM da expressão proteica, normalizada por nNOS total ou β -3 tubulina. * $p < 0.05$, diferença significativa entre os grupos veículo/veículo *versus* NMDA/veículo ou NPA/NMDA. ANOVA de duas vias, seguido pelo teste de múltipla comparação de Bonferroni (N=3-6).

3.3.10. Efeito do tratamento com dexametasona sobre os níveis de nNOS (S1417) fosforilada e de DNMT3b, em cultura primária de hipocampo

Esse experimento foi realizado para verificar se as alterações na expressão genica induzidas pela dexametasona poderiam alterar a atividade de enzima nNOS. Os níveis da nNOS (S1417) fosforilada não foram alterados quando tratado com dexametasona, após 5min, 10 min ou 24h (fator 1; $F_{1,8} = 0.3618$, $p > 0.05$; fator 1; $F_{1,20} = 0.5120$, $p > 0.05$ e $F_{1,8} = 1.721$, $p > 0.05$; 5min, 10 min e 24h respectivamente, Figura 10A, 10B e 10C). Em todos os tempos avaliados, o tratamento com dexametasona não alterou os níveis proteicos da enzima nNOS total (dados não demonstrados). A análise da expressão da enzima DNMT3b não foi alterado pelo tratamento com dexametasona (fator 1; $F_{1,8} = 1.180$, $p > 0.05$, $F_{1,20} = 0.09325$, $p > 0.05$ e $F_{1,8} = 0.1456$, $p > 0.05$; 5min, 10min e 24h respectivamente) e NPA (fator 2; $F_{1,8} = 0.06577$, $p > 0.05$, $F_{1,20} = 0.003031$, $p > 0.05$ e $F_{1,8} = 0.009551$, $p > 0.05$; 5 min, 10 min. e 24h respectivamente), figure 10D-10F.

Figure 10: Níveis de nNOS (S1417) e DNMT3b em cultura primária de hipocampo de ratos tratadas com dexametasona. Cada coluna representa a porcentagem média $\pm$ SEM da expressão proteica, normalizada por nNOS total ou β-3 tubulina. ANOVA de duas vias, seguido pelo teste de múltipla comparação de Bonferroni (N=3-6).

3.3.11. Efeito da dexametasona sobre expressão da nNOS (S1417) fosforilada e DNMT3b em cultura celular de hipocampo HiB5.

Esse experimento foi realizado para avaliar o efeito da dexametasona sob a expressão das enzimas nNOS e DNMT3b em cultura de células imortalizada HiB5. Como demonstrado acima, em cultura HiB5, o tratamento com dexametasona aumentou os níveis do mRNA para DNMT3b, o que foi revertido pelo pré tratamento com NPA. Em células HiB5, o tratamento com dexametasona não alterou a expressão da nNOS (S1417) fosforilada (fator 1; $F_{1,20} = 0.1814$, $p > 0.05$, $F_{1,20} = 0.07157$, $p > 0.05$ e $F_{1,20} = 0.2425$, $p > 0.05$; 5 min, 10 min e 24h, respectivamente; figura 11A, 11B e 11C), bem como o tratamento com NPA (fator 2, $F_{1,30} = 0.6062$, $p > 0.05$, $F_{1,30} = 0.07157$, $p > 0.05$ e $F_{1,30} = 0.2425$, $p > 0.05$; 5 min, 10 min e 24h, respectivamente; figuras 11A, 11B e 11C). Em todos os tempos avaliados, o tratamento com

dexametasona não alterou os níveis proteicos da enzima nNOS total (dados não demonstrados). O tratamento com dexametasona por 24h induziu um aumento significativo da enzima DNMT3b (fator 1; $F_{1,30} = 5.567$, $p < 0.05$; figura 11F), o qual foi atenuado pelo pré tratamento com NPA (interação, $F_{1,30} = 11.28$, $p < 0.05$; figura 11F). Porém, não foi observado nenhum efeito com o tratamento com dexametasona após 5 min e 10 min (fator 1; $F_{1,20} = 0.05680$, $p > 0.05$ e $F_{1,20} = 1.490$, $p > 0.05$; 5 min e 10min , respectivamente, figura 11D e 11E) e com o pré tratamento com NPA (fator 2; $F_{1,20} = 0.6326$, $p > 0.05$ e $F_{1,20} = 0.05552$, $p > 0.05$; 5min e 10 min, respectivamente) sobre a expressão da enzima DNMT3b; Figura 11D e 11E).

Figure 11: Expressão de nNOS (S1417) e DNMT3b em cultura imortalizada HiB5 tratada com dexametasona. Efeito do pré tratamento com NPA (100 nM, 30 min antes do tratamento com dexametasona) e/ou dexametasona sobre os níveis de pnNOS e DNMT3b. Cada coluna representa a porcentagem média $\pm$ SEM da expressão proteica, normalizada por nNOS total ou GAPDH. ANOVA de duas vias, seguido pelo teste de múltipla comparação de Bonferroni (N=6-9).

X

3.3.12. Tabela 2: Resumo dos principais achados no estudo 1

Cultura primária de hipocampo			
Tratamento Farmacológico			
Genes	NMDA 30 μM, 1h	Tratamento com NMDA 30 μM, 1h + pré-tratamento com NPA 100 nM, 30 min	Tratamento com NMDA 30 μM, 1h + pré-tratamento com 5-Aza 10 μM, 30 min
DNMT1	Sem alteração	Sem alteração	Sem alteração
DNMT3a	Sem alteração	Sem alteração	Sem alteração
DNMT3b	Aumento significativo*	Inibição do aumento#	Não houve inibição do efeito induzido pelo NMDA
bdnf exon 1	Diminuição significativa*	Não houve inibição do efeito induzido pelo NMDA	Não houve inibição do efeito induzido pelo NMDA
bdnf exon 3	Sem alteração	Sem alteração	Sem alteração
bdnf exon 4	Diminuição significativa*	Não houve inibição do efeito induzido pelo NMDA	Não houve inibição do efeito induzido pelo NMDA
bdnf exon 6	Sem alteração	Sem alteração	Sem alteração
bdnf exon 9	Diminuição significativa*	Não houve inibição do efeito induzido pelo NMDA	Não houve inibição do efeito induzido pelo NMDA
nNOS	Sem alteração	Sem alteração	Sem alteração
NT4	Sem alteração	Sem alteração	Sem alteração
TrkB	Sem alteração	Sem alteração	Sem alteração
Tratamento Farmacológico			
	dexametasona 1μM, 24h	dexametasona 1μM, 24h + pré-tratamento com NPA 100 nM, 30 min	
DNMT3b	Aumento significativo*	Inibição do aumento#	
Tratamento Farmacológico			
	L-arginina 0,5 mM, 1h	L-arginina 0,5mM, 1h + pré-tratamento com NPA 100 nM, 30 min	
DNMT3b	Aumento significativo*	Inibição do aumento#	
Cultura imortalizada de células do hipocampo HiB5			
Tratamento Farmacológico			
	dexametasona 1μM, 24h	dexametasona 1μM, 24h + pré-tratamento com NPA 100 nM, 30 min	
Gene			
DNMT3b	Aumento significativo*	Inibição do aumento#	
Proteína			
DNMT3b	Aumento significativo*	Inibição do aumento#	

Legend of table 2: * $p < 0,05$; diferença significativa entre os grupos veículo/veículo *versus* NMDA/veículo ou dexametasona/veículo; # $p < 0,05$; diferença significativa entre os grupos veículo/NMDA or veículo/dexametasona *versus* NPA/NMDA ou NPA/dexametasona.

3.4. Discussão

Os resultados obtidos no estudo 1 demonstraram: (1) que o tratamento com NMDA (30 μ M, 1h), L-arginina (0,5 mM, 1h) ou dexametasona (1 μ M, 24h), em cultura primária de células do hipocampo, aumentou a expressão do mRNA para a enzima DNMT3b, efeitos bloqueados pelo pré-tratamento com inibidor seletivo da enzima nNOS (NPA 100 nM), indicando a participação do NO nesses efeitos; (2) O tratamento com NMDA em cultura primária de hipocampo diminuiu a expressão do mRNA para o BDNF (exon 1 exon 4 e exon 9), porém o pré-tratamento com NPA não reverteu esse efeito, sugerindo que o NO não participa desse efeito; (3) O pré tratamento com o inibidor não seletivo de DNMTs (5-Aza, 10 μ M) não inibiu os efeitos induzidos pelo NMDA, sugerindo que a diminuição da expressão do BDNF induzida pelo NMDA é independente da metilação do DNA nesse protocolo experimental; (4) Em cultura imortalizada de células do hipocampo (HiB5), o tratamento com dexametasona (1 μ M, 24h) aumentou a expressão do mRNA, bem como os níveis da expressão da proteína DNMT3b, o qual foi atenuado pelo pré tratamento com NPA. O corpo de resultados sugere que a inibição da atividade da enzima nNOS bloqueia o aumento da expressão da enzima DNMT3b induzida por NMDA, L-arginina e por dexametasona em cultura de células do hipocampo. Em outras palavras, o NO parece modular a expressão da enzima DNMT3b no hipocampo, em resposta a ativação de NMDA ou de receptores glicocorticóides.

O estresse é um dos principais fatores ambientais desencadeante das alterações comportamentais nos transtornos de humor (Bishop and Anderson, 2005; Calabrese et al., 2007). A nível celular, o estresse induz ativação do eixo hipotálamo-pituitária-adrenal (HPA), com consequente aumento nos níveis de glicocorticóides, bem como um aumento na liberação de glutamato no sistema nervoso central (Calabrese et al., 2009a; Musazzi et al., 2017). Os receptores para glicocorticóides (mineralocorticoide/glicocorticoide: MR/GR) são expressos em diversas regiões no cérebro, como o córtex pré-frontal, hipocampo, hipotálamo e amígdala

(Morimoto et al., 1996). A ativação destes receptores está diretamente relacionada com as alterações neuroquímicas, metabólicas e comportamentais induzida pelo estresse (Nestler et al., 2002; Calabrese et al., 2009a). Em estudos prévios, foi demonstrado que glicocorticoides, incluindo dexametasona, controlam a liberação rápida do neurotransmissor excitatório glutamato em sinaptossoma de hipocampo de ratos (Wang and Wang, 2009). Ademais, o aumento da liberação rápida de glutamato por glicocorticoides está relacionada com a ativação dos receptores MR e/ou GR de membranas (efeito não genômico) e um aumento do transporte de vesícula pré-sinápticas mediada pela proteína sinapsina 1 (Treccani et al., 2014).

A ativação dos receptores NMDA e/ou de GR/MR em células do hipocampo está relacionada com a ativação de vias intracelulares que modulam a liberação de outros neurotransmissores, como o NO (Moghaddam, 2002; Skolnick, 2002; Takahashi et al., 2002; Guix et al., 2005; Garthwaite, 2008; Skolnick et al., 2009; Duman and Aghajanian, 2014; Joca et al., 2015). Relevante para o presente estudo, o aumento da liberação de glutamato mediado por glicocorticoides parece estar relacionado com a metilação do DNA genômico e a diminuição na expressão da neurotrofina BDNF (Wang and Wang, 2009; Lee et al., 2010; Suri and Vaidya, 2013; Treccani et al., 2014; Chen et al., 2017). O tratamento com dexametasona em células do hipocampo diminuiu significativamente a expressão do mRNA para o exon 1 e o exon 4 do BDNF, no qual foi prevenido pelo antagonista do receptor GR (RU 486) (Chen et al., 2017). Além disso, em cultura de células hipotalâmicas (IVB de ratos) tratadas com dexametasona, observou-se um aumento da interação da enzima DNMT3b com o GR, o qual influencia a atividade da enzima DNMT3b e o aumento da metilação do DNA (Sharma et al., 2013). Os dados acima descritos, sugerem uma possível interação da sinalização induzida pelo GR e a liberação de glutamato no hipocampo. A ativação do NMDAr no hipocampo induz diretamente a síntese e liberação de NO, porém, o envolvimento do GR e da sinalização NMDAr/nNOS/NO na metilação do DNA não está totalmente elucidado. Assim, primeiramente

nós investigamos o papel do tratamento com dexametasona (1 μ M) ou com o NMDA (30 μ M) sobre a expressão do mRNA para as enzimas DNMTs, nNOS e BDNF em cultura de célula do hipocampo.

O tratamento com NMDA aumentou a expressão do mRNA para a enzima DNMT3b e diminuiu a expressão do mRNA para o BDNF (exon 1, exon 4 e exon 9). Interessantemente, o pré-tratamento com inibidor seletivo para isoforma nNOS (NPA) atenuou o aumento da expressão da DNMT3b, sugerindo a participação do NO na regulação da expressão da DNMT3b em resposta à ativação de NMDA. Nossos resultados corroboram com estudos anteriores, onde o estresse oxidativo/nitrosativo induziu um aumento da enzima DNMT3b em cultura celular, bem como em animais submetidos a hipóxia global (Campos et al., 2007; Biswal et al., 2016). Além disso, cultura de células epiteliais gástricas submetidas ao tratamento com lipopolissacarídeo (LPS) ou *Helicobacter pylori* (*H. pylori*) apresentam um aumento nos níveis de NO e um aumento da metilação na região promotora do gene *runx3* (Katayama et al., 2009). A diminuição da expressão do gene *runx3* está relacionado com processos carcinogênicos (Katayama et al., 2009). Ademais, foi demonstrado que o tratamento com o inibidor não seletivo da NOS (L-N^G-Nitroarginine Methyl Ester, L-NAME) bloqueou o aumento dos níveis de DNMT1 e DNMT3b em cultura celular sob estresse celular (Campos et al., 2007). Em outro estudo, o tratamento com IL-1 β , capaz de induzir aumento da síntese da enzima NOS e de NO, bem como o tratamento com doador de NO (nitroprussiato de sódio, SNP) em cultura celular (RIN e Jurkat T cell), induziu aumento da metilação do DNA do gene *FMR1* (Hmadcha et al., 1999). O gene *FMR1* (fragile X mental retardation 1) está relacionada com a síndrome do X frágil, caracterizada pela diminuição da expressão da proteína *FMR1* e alguns transtornos mentais (Lozano et al., 2014). Interessantemente, o aumento da metilação do gene *FMR1* induzido por IL-1 β ou pelo doador de NO foi correlacionado com o aumento da atividade enzimática da enzima DNMT e prevenido pelo pré-tratamento com 5AzaCt (inibidor da

atividade enzimática da DNMT), sugerindo a participação do NO na regulação da atividade desta enzima (Hmadcha et al., 1999). Além disso, os autores descrevem a participação do NO sobre a deacetilação de histona, outro mecanismo epigenético, que corrobora com o recrutamento de proteínas responsáveis pela condensação da cromatina, que impede a ação dos fatores de transcrição (Hmadcha et al., 1999; Vasudevan et al., 2016; Socco et al., 2017) (). Os dados apresentados acima sugerem o relevante papel da sinalização NOS/NO na regulação da expressão das enzimas DNMTs.

Porém, ao contrário do que esperávamos, embora o tratamento com NMDA tenha diminuído a expressão de BDNF (exon 1, exon 4 e exon 9), esse efeito não foi bloqueado pelo pré-tratamento com NPA, indicando um possível mecanismo independente de NO. Além disso, o tratamento com NMDA ou NPA não modificou a expressão dos exons 3 e exon 6 para o BDNF, bem como a expressão do mRNA para o TrkB e NT4, genes envolvidos com processos neuroplásticos, indicando que nesse protocolo experimental o NMDA e o NO não estão envolvidos nos processos celulares da expressão destes genes. Por outro lado, a inibição da atividade da NOS induz uma elevação da secreção de BDNF em cultura de células do hipocampo (Canossa et al., 2002) e um aumento da expressão do BDNF no hipocampo de ratos submetidos ao estresse do desamparo aprendido (Stanquini et al., 2017). Ademais, Sandoval e colaboradores demonstraram que a neurotoxicidade induzida por NMDA (30 μ M) em cultura de células do hipocampo foi atenuada pelo tratamento com inibidor da NOS (L-NNA, 2 μ M) e também pelo BDNF (Sandoval et al., 2011). Sugerindo a interação dos sistemas NOS-BDNF na sinalização induzida pela ativação do receptor NMDA no hipocampo. Porém, os estudos citados acima, não investigaram a expressão do mRNA do BDNF sobre o tratamento com inibidores da NOS. Assim, falta evidências dos efeitos dos inibidores da NOS na expressão do mRNA para o BDNF. A complexa sinalização NMDA-NOS-BDNF não está totalmente esclarecida, novos estudos são necessários para compreender esse sistema.

A estrutura gênica do BDNF é extremamente complexa, apresentado nove regiões promotoras (exon 1 – exon 9) que irá resultar em diferentes transcritos para o BDNF (Aid et al., 2007). O exon 9 está presente em todos os transcritos e é responsável pela codificação do BDNF maduro (Aid et al., 2007). Diferentes fatores influenciam a ativação destes transcritos, através da ligação e ativação das diferentes regiões promotoras (exons) do BDNF, porém todos os transcritos codificam a expressão da mesma proteína (BDNF). Está complexa ativação é responsável pela localização, estabilidade e transdução do BDNF na célula (Aid et al., 2007; Autry and Monteggia, 2012). Os diferentes transcritos parecem influenciar a expressão do BDNF em diferentes regiões do cérebro. Foi observado que a deleção gênica da região promotora do exon 4 e do exon 6 do BDNF resultou na diminuição significativa do BDNF no hipocampo e também no córtex pré-frontal (Maynard et al., 2016). Por outro lado, a deleção gênica das regiões promotoras dos exons 1 e 3, reduziu significativamente a expressão do BDNF no hipotálamo (Maynard et al., 2016). Interessante, a deleção do exon 4 em camundongo induziu um fenótipo tipo depressivo. Esses animais apresentaram uma diminuição da preferência pela sacarose (anedonia), aumento no tempo de imobilidade no nado forçado e aumento na latência para fugir dos choques no LH (Sakata et al., 2010). Além disso, esses animais apresentaram alteração na expressão de genes do sistema monoaminérgico (Sakata and Duke, 2014). Estes dados demonstram a influência dos diferentes exons na expressão do BDNF em estruturas centrais relacionadas com as alterações comportamentais e também moleculares envolvida com o estresse e a DM (Sakata et al., 2010; Sakata and Duke, 2014; Maynard et al., 2016). Entretanto, papel do NO/NOS e do glutamato na modulação da expressão dos diferentes exons do BDNF não estão totalmente esclarecidos. x

O estresse agudo ou crônico, frequentemente relacionado a ativação exacerbada dos receptores NMDA e/ou dos receptores para glicocorticoides (Popoli et al., 2011; Musazzi et al., 2017), estão relacionados com processos neurotóxicos mediado pelo glutamato e também com

a diminuição da expressão do BDNF (Suri and Vaidya, 2013; Treccani et al., 2014). A metilação das regiões promotora dos exons 1 e 4 do BDNF é influenciada pelo estresse, diminuindo a expressão desta proteína no hipocampo e no córtex (Aid et al., 2007; Autry and Monteggia, 2012; Mitchelmore and Gede, 2014; Zheleznyakova et al., 2016). Na clínica, pacientes com diagnóstico de PTSD apresentam níveis elevados de glutamato no hipocampo, o que pode influenciar a diminuição do BDNF (Rosso et al., 2017). Além disso, animais submetidos ao paradigma experimental de estresse pós-traumático (PTSD) apresentaram um aumento metilação do DNA na região promotora do exon 4 do BDNF e uma diminuição da expressão deste gene no hipocampo (Roth et al., 2011). Estes dados sustentam a hipótese de que o estresse influencia a metilação das regiões promotoras dos diferentes exons do BDNF, mecanismo dependente da atividade das enzimas DNMTs. Suportando esta hipótese, estudos pré-clínicos demonstraram que animais submetidos a diferentes estressores apresentaram um aumento da expressão das DNMTs no córtex pré-frontal e/ou no hipocampo (Boersma et al., 2014; Benoit et al., 2015; Sales and Joca, 2018). Corroborando com os achados do presente estudo, onde o agonista NMDA induziu um aumento da expressão da enzima DNMT3b em cultura primária de células do hipocampo de ratos. Estes dados sugerem a direta influência da ativação do receptor NMDA no aumento da metilação do DNA mediada pela DNMT3b em células do hipocampo. O que pode influenciar a metilação das regiões promotoras do BDNF. Porém, os dados do presente estudo demonstraram que o pré-tratamento com o inibidor não seletivo da enzima DNMTs (5-Aza) não bloqueou a diminuição da expressão do BDNF (exon 1, exon 4 e exon 9) induzido pelo desafio com NMDA em cultura primária de hipocampo de ratos. Esses resultados sugerem que a rápida diminuição dos exons 1, 4 e 9 para a neurotrofina BDNF é independente da atividade da DNMT no protocolo experimental do presente estudo. Por outro lado, o pré-tratamento com 5-Aza induziu um aumento da expressão do exon 4 para o BDNF em células primárias do hipocampo, confirmando o papel da metilação do DNA na

regulação da expressão basal do BDNF, conforme demonstrado em estudos anteriores (Aid et al., 2007; Sales et al., 2011). Além disso, a inibição farmacológica da atividade das DNMTs ou a deleção gênica da expressão da enzima DNMT1, induz um efeito tipo antidepressivo em roedores submetidos ao estresse (Sales et al., 2011; Morris et al., 2016), indicando que a inibição da atividade das DNMTs modula as alterações comportamentais induzidas pelo estresse. Assim, mais estudos são necessários para melhor caracterizar a complexa interação entre os receptores NMDA e as enzimas DNMTs na metilação e expressão do BDNF.

Considerando que, *in vivo*, a ativação do receptor GR controla a liberação de glutamato e subsequente ativação de NMDA, nós avaliamos os efeitos do tratamento com dexametasona sobre a expressão dos mesmos genes. O tratamento com dexametasona, por 24h, induziu um aumento significativo na expressão da enzima DNMT3b em cultura primária de hipocampo e também em cultura imortalizada de hipocampo (HiB5), em ambas linhagens o pré-tratamento com inibidor seletivo para nNOS (NPA) reverteu esse efeito. Nossos dados estão de acordo com estudos anteriores, onde o tratamento com dexametasona em cultura celular (rat hypothalamic IVB cells) induziu um aumento da metilação na região promotora do gene do *crh*, através da formação do complexo do receptor GR com a enzima DNMT3b (Sharma et al., 2013). Ademais, nesse mesmo estudo, foi descrito que o tratamento com dexametasona induz a formação de outros complexos proteicos, como GR-HDAC1-MeCP2, auxiliando a metilação do DNA na região promotora do gene do *crh* (Sharma et al., 2013). Estes dados demonstram a complexa modulação da sinalização intracelular mediada pela dexametasona.

Por outro lado, o tratamento com dexametasona por 1h não modificou a expressão da enzima DNMT3b, mas induziu um aumento significativo na expressão do mRNA para isoforma da enzima nNOS. Esses resultados sugerem uma possível cinética de expressão, onde o desafio com dexametasona, que induz um aumento na liberação de glutamato em células do hipocampo (Wang and Wang, 2009; Treccani et al., 2014), aumentaria a expressão da nNOS, levando a um

aumento da atividade da sinalização nNOS/NO em 1h. Assim, o aumento do NO intracelular, induziria um aumento da expressão da enzima DNMT3b, observável em 24h. Embora alguns estudos demonstrem que os glicocorticoides podem modular a atividade intracelular rapidamente pela ativação de receptores de membrana (efeito não genômico) (Treccani et al., 2014) e promover aumento da liberação de glutamato no hipocampo de roedores e ativação da sinalização da enzima nNOS (Garthwaite, 2008; Wang and Wang, 2009), essa possível ativação rápida mediada pela dexametasona não induziu aumento expressão da enzima DNMT3b (em 1h), em nosso protocolo. No entanto, neste trabalho não foi avaliado o efeito da dexametasona sobre a atividade do receptor NMDA em cultura de células do hipocampo de ratos. Assim, não nos permitindo concluir se houve ativação desses receptores, nesse momento, em resposta à administração de dexametasona. Mesmo assim, os dados demonstram que a administração de dexametasona e provável ativação dos receptores para glicocorticoide no hipocampo é capaz de modular a expressão da enzima DNMT3b após 24h e que esse efeito é mediado pela sinalização nNOS/NO.

Embora alguns estudos têm demonstrado a diminuição do BDNF (exon 4 e exon 9) no hipocampo de ratos tratado com corticosterina (Dwivedi et al., 2006) e também em cultura primária de células do hipocampo desafiadas com dexametasona (Chen et al., 2017). No presente estudo, o tratamento com dexametasona (1 μ M por 1h ou 24h) não modificou a expressão do BDNF (exon 1, exon 4 e exon 9) em cultura primária de células do hipocampo (dados não apresentados).

Como contraprova da participação do NO na regulação da expressão de DNMT3b, avaliamos os efeitos induzidos pela facilitação da sinalização nNOS/NO, por meio da administração de precursor da síntese de NO (L-arginina; 0.5 mM, por 1h), uma vez que foi previamente demonstrando que esse tratamento induz aumento do NO em cultura de células endoteliais (Xiong et al., 2014). Os resultados demonstraram que houve aumento da expressão

do mRNA da DNMT3b, em cultura primária do hipocampo, e que esse efeito foi atenuado pelo pré-tratamento com NPA. Por outro lado, o tratamento prolongado com L-arginina (0.5 mM, 24h) não alterou a expressão da DNMT3b. Os dados até aqui apresentados sugerem que a ativação da sinalização nNOS/NO pelo NMDA ou pela L-arginina modularia a expressão da DNMT3b de forma rápida em cultura de células do hipocampo. Diante disso, é possível que o efeito observado na expressão da DNMT3b em resposta ao tratamento com dexametasona esteja relacionado com efeitos tardios sobre a liberação de glutamato e subsequente o aumento da expressão e/ou atividade da enzima nNOS. Ademais, outros trabalhos tem demonstrado o papel do NO na modula da histona acetiltransferase (HAT), histona deacetilase (HDAC) e histona metiltransferase (KMT) sugerindo o complexo papel do NO nos mecanismos epigenéticos responsáveis pelo controle da expressão gênica (ver revisão: Vasudevan et al., 2016; Socco et al., 2017). P

Previamente, foi demonstrando que o tratamento com NMDA (30 μ M por 5min) em cultura primária de hipocampo, induziu um aumento dos níveis de NO, acompanhado por uma aumento da expressão da enzima fosforilada nNOS (forma ativada) (Rameau et al., 2007; Ferreira et al., 2011). A enzima nNOS apresenta uma ativação bifásica, apresentando um aumento da sua atividade entre 5-15min, no qual está diretamente relacionada com a síntese de NO, e um aumento da expressão da nNOS fosforilada (S847), forma inativa desta enzima, após 30-60 min (Rameau et al., 2007; Ferreira et al., 2011). No presente estudo, o tratamento com NMDA significativamente diminuiu a expressão da pnNOS (S1417) pós 5 min, e teve um perfil semelhante após 10 min e 1h do tratamento com o agonista NMDA. Como previamente descrito, a ativação e inativação da sinalização nNOS/NO é muito rápida (Rameau et al., 2007). Assim, é possível especular que, em nossas condições experimentais, o aumento da expressão da forma ativada da enzima pnNOS (S1417), ocorreria imediatamente (segundos ou no primeiro minuto) após o tratamento com NMDA, o que explicaria a diferença de resultado encontrado

em nosso estudo. Além disso, em nosso protocolo experimental poderia haver um aumento da expressão da forma inativa da enzima nNOS, o que justificaria uma diminuição da enzima na forma ativada, porém no presente estudo não foi realizado esse experimento.

Cabe aqui descrever que outros protocolos foram realizados para quantificar os níveis de NO em cultura primária de hipocampo tratadas com NMDA (Gries assay e DAF-2-FM, dados não demonstrados). Porém, os protocolos não apresentaram sensibilidade para detectar diferença entre os grupos experimentais, o que pode estar relacionado com a pequena quantidade da produção do NO e a rápida degradação desta molécula em nosso sistema experimental (Wegener and Joca, 2016). Embora no presente estudo não conseguimos demonstrar alterações quantificáveis nos níveis de NO em cultura primária de hipocampo desafiadas com NMDA, os nossos dados sugerem que pequenas quantidades de NO, induzido pelo NMDA ou pelo precursor da síntese de NO (L-arginina), modulam a expressão da enzima DNMT3b, importante mediador intracelular relacionadas com a metilação do DNA e a expressão gênica. Além disso, o tratamento com dexametasona por 1h em cultura primária de hipocampo, bem como em cultura imortalizada HiB5 não alterou a expressão da proteína nNOS (S1417). Ademais, cultura imortalizada HiB5 não responde ao tratamento com NMDA, por isso no presente estudo somente o papel da dexametasona foi avaliada nesta linhagem celular.

Por outro lado, o tratamento com dexametasona por 24h em cultura de células HiB5, demonstrou um aumento da expressão proteica da enzima DNMT3b, confirmando os resultados encontrados na RT-qPCR nesse estudo. Embora não foi observado aumento na expressão proteica da enzima DNMT3b nas células primárias de hipocampo tratadas com dexametasona ou NMDA, esses dados podem estar relacionados com pequeno N experimental e também com o tempo analisado no protocolo experimental.

Os resultados do estudo 1 trazem novas evidências do papel do NO sobre os mecanismos intracelulares que modulam a metilação do DNA genômico. A ativação dos receptores NMDA

e glicocorticoides em cultura de células do hipocampo de ratos aumenta a expressão da enzima DNMT3b, o que foi bloqueado pelo pré-tratamento com inibidor seletivo da enzima nNOS. A novidade do presente estudo reforça o papel do glutamato e dos glicocorticoides nas alterações celulares induzidas pelo estresse, principalmente sob a metilação do DNA. Ademais, os nossos dados possibilitam explicar o possível mecanismo anti-estresse dos inibidores das NOS observado em estudos comportamentais (Joca et al., 2006; Montezuma et al., 2012; Caroline Biojone, 2013; Liebenberg et al., 2015; Stanquini et al., 2017), sugerindo que o efeito anti-estresse dos inibidores da NOS poderiam estar relacionados com a inibição da expressão das enzimas DNMTs no hipocampo de ratos.

4. Estudo 2

4.1 Materiais e Métodos

4.1.1. Animais

Foram utilizados ratos machos Wistar, com 8 semanas de idade, pesando entre 270-300g, provenientes do Biotério Central do Campus da USP-RP. Os animais foram mantidos por 7 dias no biotério do Departamento de Farmacologia da FCFRP-USP, em condições controladas: temperatura ($24^{\circ} + 1^{\circ}\text{C}$), luz (12h de luz, com ciclo claro iniciando às 06h00), com acesso livre a água e alimento. Antes de iniciar os experimentos, os animais foram mantidos agrupados, 4 ratos por caixas (41 x 34 x 16 cm). Após a sessão de pré-teste, os animais foram alojados isoladamente (1 rato/caixa) em gaiolas de acrílico (30 x 20 x 13 cm). Os procedimentos foram conduzidos de acordo com as diretrizes do Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), dispostas na lei Arouca (11.794/08). Todos os procedimentos experimentais foram aprovados pelo CEUA local sob o protocolo 15.1.285.60.5.

4.1.2. Tratamento farmacológico

As seguintes drogas foram utilizadas: 7-nitroindazole (Sigma; inibidor preferencial da nNOS), na dose 60 mg/Kg; aminoguanidina (Sigma; inibidor preferencial de iNOS), na dose 30 mg/Kg. O grupo controle foi tratado com veículo (NaCl 0,9% estéril ou solução de NaCl 0,9% estéril e Polietilenoglicol – 1:1). Os animais foram tratados por via intraperitoneal imediatamente após a sessão de pré-teste, e receberam uma injeção diária de droga (tratamento repetido, 7 dias) ou veículo nos próximos seis dias, sendo que a última injeção foi administrada 1h antes do teste. Aminoguanidina foi diluída em solução NaCl 0,9% e 7-nitroindazole foi diluído em solução 1:1 de NaCl 0,9% e polietilenoglicol. As doses e as concentrações, assim como os tempos de tratamentos, foram selecionadas com base em estudos prévios e também

padronização feita no laboratório (Joca and Guimarães, 2006; Katayama et al., 2009; Montezuma et al., 2012; Tramontina et al., 2012; Valadas et al., 2012; Caroline Biojone, 2013; Chatterjee and Sikdar, 2014)

4.1.3. Modelo do desamparo aprendido

Os experimentos foram realizados em caixas de acrílico automatizadas de esquiva ativa para ratos (307 x 333 x 540 mm; modelo EP 11, Insight Equipamentos Científicos), com dois compartimentos de igual tamanho, separados por uma parede com uma porta central aberta (comunicando os dois compartimentos) e equipada com um piso de grade de aço inoxidável através do qual os choques foram aplicados nas patas dos animais.

Cada experimento teve duração de sete dias. No primeiro dia, os animais foram expostos a uma sessão de pré-teste (PT), nas quais receberam choques inescapáveis nas patas (CI, grupo estressado, 40 choques, 0.4 mA, 10 s de duração, com intervalos entre 30-90s), enquanto um grupo independente foi apenas exposto ao aparelho pelo mesmo período (30 min), sem receber choques (controle habituado, Hab). Após seis dias, os animais foram submetidos à sessão de teste (T, 30 choques escapáveis - CE, 0.4 mA, 10 s de duração - precedidos por 5s de estímulo sonoro, 60 dB, 670 Hz). Na sessão de teste, os choques eram interrompidos quando os animais atravessavam para o outro lado da caixa durante o estímulo sonoro e/ou durante os choques. Durante o teste, foram avaliados os seguintes parâmetros comportamentais: latência para fuga/esquiva, número de fugas, número de falhas e intervalo de cruzamento (*intertrial crossing*) (Geoffroy and Christensen, 1993; Joca et al., 2003; Stanquini et al., 2017). Os animais utilizados para coleta de tecidos foram submetidos ao mesmo protocolo experimental descrito acima e sacrificados no momento do teste, portanto 1h após a última administração de droga. Para a análise do mRNA, os animais foram sacrificados 1h, 24h ou 7 dias após a sessão de pré-teste.

4.1.4. Coleta de tecidos

Os animais foram profundamente anestesiados com hidrato de cloral 5% (10 ml/Kg), seguido por decapitação. As estruturas encefálicas (córtex frontal, hipocampo dorsal e ventral) foram dissecadas e imediatamente armazenadas a -80 °C até o momento do uso.

4.1.5. Avaliação da metilação global no córtex frontal, hipocampo dorsal e ventral dos animais

O DNA genômico foi extraído usando o kit AxyPrep Blood Genomic DNA Miniprep (AP-MN-BL-GDNA-50; Axygen Biosciences, USA), de acordo com instruções do fabricante e previamente padronizado em nosso laboratório (Sales and Joca, 2016). O DNA purificado foi digerido com a enzima Nuclease P1 (#P2640, Sigma-Aldrich; 2 U/μg de DNA) por 4 h à 65°C em tampão acetato 20 mM pH 5,3, seguido pela adição da enzima fosfatase alcalina (#N7640, Sigma-Aldrich; 0,3 U/μg de DNA) por 2 h a 65°C em Tris-HCl 20 mM pH 7,5. O DNA foi precipitado com etanol 100% e NaCl 5 M à -20°C, por 48 h e centrifugado a 4°C, 10.000 g por 15 min. O pellet foi ressuscitado em água ultrapura. Em seguida, foi realizada a leitura da quantidade de DNA total pelo leitor de placas SpectraMax 190 (versão 6.2.1, Molecular Devices, Sunnyvale, CA; absorvância de 280/260 nm) e as amostras foram armazenadas a -20°C até o momento do uso. A metilação global foi realizada usando o kit DNA Methylation EIA (Cayman Chemical # No. 589324), de acordo com instruções do fabricante e os resultados foram expressos da seguinte forma: 5-metil-2-deoxicitidina/DNA total (pg/ng em % de controle).

4.1.6. Avaliação da expressão do mRNA para DNMT3b, nNOS, iNOS e BDNF no hipocampo de ratos submetidos ao LH

As amostras do hipocampo ventral e dorsal foram maceradas com 400 μ L de tampão de lise celular (contendo: 20 mM de Tris-HCl; 137 mM de NaCl; 10% glicerol; inibidor de protease; inibidor de fosfatase e Ortovanadato de Sódio). Para a extração do mRNA total 200 μ L do macerado foi adicionado em um tubo plástico contendo 1 mL de Tri Reagent® (Sigma–Aldrich), o protocolo de extração foi realizado conforme instruções do fabricante e como detalhado na sessão de materiais e métodos do estudo 1. Para a síntese de cDNA foram utilizados 2 μ g de mRNA total com auxílio do kit High-Capacity cDNA Reverse Transcription kit (Thermo Scientific, catalog number: 4368814), e como controle da reação foi utilizado todos os reagentes da reação exceto mRNA total (NTC, non-templete control). O protocolo foi realizado conforme instruções do fabricante. Os primers utilizados para a amplificação específica do cDNA estão descritos na tabela 1 (estudo 1). *gapdh* e *hprt1* foram utilizados como controle interno da PCR (housekeeping gene). A PCR quantitativa foi realizada com auxílio do kit Power SYBR™ Green PCR Master Mix (Thermo Scientific, catalog number: A25776). A reação foi realizada em um volume final de 10 μ l (5 μ l Power SYBR Green; 1,8 μ l água-nuclease free; 0,6 μ l de primers (forward and reverser, concentração final de 0,3 μ M) e 2 μ l de cDNA). As concentrações dos primers e do cDNA foram baseadas na eficiência máxima da reação. As reações de amplificações foram realizadas em duplicatas em placa de 96 poços. A reação de amplificação foi realizada no StepOnePlus™ Real-Time PCR System (Thermo Scientific, catalog number: 4376600). A RT-qPCR foi realizada nas seguintes condições: 95°C por 10 min. (temperatura de desnaturação) e 44 ciclos de 95°C por 15 segundos (desnaturação); 30 segundos (temperatura de anelamento dos primers estão descritos na tabela 1) e 30 segundos a 72°C (temperatura de extensão). No final da reação foi incluída a análise de curva de melting (fluorescência analisada entre 65°C a 95°C), em todos os experimentos observou somente um único pico, sugerindo que não houve amplificação de outro gene e/ou dimerização dos primers. Em cada corrida foram incluídos todos os grupos experimentais, bem como o controle (NTC).

A partir das curvas de amplificação geradas foram determinados os números de ciclos (*Ct-Cycle threshold*) que passam na fase exponencial da curva sigmoide, no qual todas as amostras foram comparadas. Para a análise da expressão foi utilizado o métodos $2^{-\Delta\Delta Ct}$ (Livak and Schmittgen, 2001), onde avalia a expressão relativa do gene de interesse em relação ao gene endógeno que não teve alteração em todos os grupos experimentais. As seguintes fórmulas foram empregas: (1) $\Delta Ct = [Ct \text{ do gene alvo} - Ct \text{ do gene endógeno (housekeeping gene)}]$; (2) $\Delta\Delta Ct = [\Delta Ct \text{ gene alvo} - \Delta Ct \text{ médio do grupo controle}]$ e $2^{-(\Delta\Delta Ct)}$. Os resultados foram expressos como expressão relativa do gene alvo em relação ao gene endógeno (% CTRL). O gene *hprt1* não apresentou variação entre os grupos experimentais, sendo assim escolhido para todos os cálculos.

4.2. Delineamento experimental

4.2.1. Experimento 1: Efeitos da administração sistêmica repetida de inibidor de nNOS (7-nitroindazole – 7NI) ou de iNOS (aminoguanidina – AMG) sobre as alterações comportamentais induzidas pelo estresse de choques inescapáveis.

Os animais foram submetidos a sessão do pré-teste (PT) e submetidos ao tratamento repetido com 7-NI, AMG ou veículo (controle negativo), conforme o protocolo de tratamento previamente descrito. No dia do teste foram avaliados os seguintes parâmetros comportamentais: número de falhas, número de fugas, tempo de latência para esquiva/fuga e intervalo de cruzamento (*intertrial crossing*).

4.2.2. Experimento 2: Efeitos da administração sistêmica repetida dos inibidores de nNOS (7-nitroindazole – 7NI) ou de iNOS (aminoguanidina – AMG) sobre a metilação global do DNA no córtex pré-frontal, hipocampo dorsal e ventral de ratos submetidos ao pré-teste do desamparo aprendido.

Esse grupo experimental foi submetido ao PT seguido de tratamento repetido com 7-NI, AMG ou salina, conforme o protocolo de tratamento descrito acima. Esses animais foram sacrificados 1h após a última administração dos inibidores, sem passar pela sessão de teste. Um grupo independente de animais foi sacrificado sem passar por qualquer manipulação (grupo controle: *naive*). Todos os animais foram submetidos à dissecação das estruturas encefálicas (hipocampo dorsal, ventral e córtex pré-frontal), as quais foram congeladas à –80 °C para posterior análise da metilação global do DNA.

4.2.3. Experimento 3: Avaliação da expressão do mRNA para a enzima DNMT3b, nNOS, iNOS e BDNF no hipocampo dorsal e ventral de ratos submetidos aos choques inescapáveis nas patas.

Neste bloco experimental, grupos independentes de ratos foram submetidos a sessão de PT e sacrificados 1h, 24h ou 7dias depois, e suas estruturas cerebrais foram dissecadas e processadas para a realização da RT-qPCR. Animais não submetidos a nenhum procedimento foram utilizados como controle (grupo *naive*).

4.2.4. Experimento 4: Avaliação do tratamento com 7-NI ou AMG sobre a expressão do mRNA para a enzima DNMT3b, 1h e 24h após a sessão de PT, no hipocampo dorsal e ventral de ratos submetidos aos choques inescapáveis.

Nesse bloco experimental, os animais foram submetidos a sessão de PT e tratados com inibidores da enzima NOS. O grupo 1h, foram tratados com uma única injeção imediatamente após a sessão de PT e as estruturas centrais foram dissecadas após 1h. Os animais do grupo 24h

receberam duas injeções: 1 administração imediatamente após a sessão de PT e a segunda administração em 23h após a sessão de PT. As estruturas centrais foram coletadas após 1h da última injeção (completando o tempo de 24h após a sessão de PT). Animais não submetidos a nenhum procedimento foram utilizados como controle (grupo naive).

4.3. Análise estatística

Os resultados do teste comportamental do LH (números de falhas, números de fugas e *intertrail crossing number*) foram analisados pelo teste de Kruskal-Wallis, seguido pelo pós-teste de Dunn, uma vez que os dados não apresentam uma distribuição contínua. ANOVA de duas vias foi utilizada para a análise dos dados de latência para fuga/esquiva.

Para a análise dos dados moleculares, os valores foram expressos como a média $\pm$ erro padrão da média (EPM). As análises estatísticas foram realizadas por ANOVA de uma via seguido por múltiplas comparações pelo teste Newman-Keuls ou ANOVA de duas vias (fator 1: condição (estressado e habituado) e fator 2: tratamento (veículo, 7-NI ou AMG)), seguido por múltiplas comparações pelo teste de Bonferroni.

Valores de P menores do que 0,05 foram considerados estatisticamente significativos.

4.4. Resultados

4.4.1. Efeitos do tratamento repetido com aminoguanidina em ratos submetidos ao teste do desamparo aprendido

O tratamento repetido com AMG foi capaz de atenuar de forma significativa o aumento do número de falhas induzido pelo estresse dos choques inescapáveis ($H = 25.64$; $p < 0.05$; $N = 11-13$, figura 12 A). Dados complementares demonstraram que a diminuição no número de fugas em animais estressados foi atenuada de forma significativa com o tratamento repetido com a AMG ($H = 25.64$; $p < 0.05$; $N = 11-13$, figura 12B), assim como o tempo de latência para fuga/esquiva (interação ($F_{1,42}=4.27$; $p < 0,05$, figura 12C). A análise do fator condição (habitado x estressado) revelou um aumento significativo na latência para a fuga/esquiva nos animais estressados (fator 1: $t = 4.7$, $df = 21$; $p < 0,05$, figura 12C) e o tratamento com AMG foi capaz de inibir esta resposta (fator 2: $t = 4.8$, $df = 23$; $p < 0.05$, figura 12C). Cabe destacar que o tratamento farmacológico, bem como o estresse comportamental não modificaram a atividade locomotora dos animais, avaliado através do número de cruzamento entre os intervalos dos choques escapáveis na sessão de teste ($H = 1.664$; $p > 0.05$; $N = 11-13$, Figura 1D).

Figura 12: Tratamento com AMG atenuou as alterações comportamentais induzidas pelos choques inescapáveis nas patas. Os animais submetidos aos choques inescapáveis (grupo estressado) ou habituados no pré-teste, receberam administração i.p. de veículo (salina) ou AMG (30mg/kg) durante 7 dias. Uma hora após a última injeção, os animais foram submetidos a sessão de teste. Os dados representam a média $\pm$ EPM. * $p < 0,05$, diferença significativa entre os grupos estressado/veículo *versus* habituado/veículo; # $p < 0,05$, diferença significativa entre os grupos estressado/veículo *versus* estressado/AMG. Teste de Kruskal-Wallis, seguido pelo teste de múltipla comparação de Dunn ou ANOVA de duas vias, seguido pelo teste de múltipla comparação de Bonferroni; (N=10-13).

4.4.2. Efeitos do tratamento repetido com 7-nitroindazole em ratos submetidos ao teste comportamental do desamparo aprendido.

O tratamento com 7-NI apresentou resultados semelhantes àqueles obtidos com o tratamento com o AMG. Análise estatística dos dados demonstrou que o tratamento com 7-NI diminuiu o número de falhas na sessão de teste do LH ($H = 15.65$; $p < 0.05$; $N = 11-13$, figura 13A). Dados complementares demonstraram que a diminuição no número de fugas em animais estressados foi revertida de forma significativa com o tratamento repetido com a 7-NI ($H =$

17.92; $p < 0.05$; $N = 11-13$, figura 13B), assim como o tempo de latência para fuga/esquiva (interação ($F_{1,42}=10,47$; $p < 0,05$, figura 13C). A análise do fator condição (habituação x estressado) revelou um aumento significativo na latência para a fuga/esquiva nos animais estressados (fator 1: $t = 3.7$, $df = 24$; $p < 0,05$, figura 13C) e o tratamento com 7-NI foi capaz de inibir esta resposta (fator 2: $t = 3.2$, $df = 23$; $p < 0.05$, figura 13C). Nem o tratamento farmacológico, nem o estresse comportamental modificaram a atividade locomotora dos animais, avaliado através do número de cruzamento entre os intervalos dos choques escapáveis na sessão de teste ($H = 2.731$; $p > 0.05$; $N = 11-13$, figura 13D).

Figura 13: Tratamento com 7-NI atenuou as alterações comportamentais induzidas pelos choques inescapáveis nas patas. Os animais submetidos aos choques inescapáveis (grupo estressado) ou habituados no pré-teste receberam administração i.p. de veículo (salina) ou 7-NI (60mg/kg), durante 7 dias. Uma hora após a última injeção, os animais foram submetidos a sessão de teste. Os dados representam a média $\pm$ EPM. * $p < 0,05$, diferença significativa entre os grupos estressado/veículo *versus* habituado/veículo; # $p < 0,05$, diferença significativa entre os grupos estressado/veículo *versus* estressado/7-NI. Teste de Kruskal-Wallis, seguido pelo teste de múltipla comparação de Dunn ou ANOVA de duas vias, seguido pelo teste de múltipla comparação de Bonferroni; (N=10-13).

4.4.3. Efeitos do tratamento com aminoguanidina sobre os níveis de metilação global do DNA em estruturas encefálicas de ratos submetidos a choques inescapáveis nas patas

O objetivo deste experimento foi avaliar se a exposição a choques inescapáveis nas patas que induziu alterações comportamentais promoveria também alterações nos níveis de metilação global do DNA no cérebro de ratos. Nossos dados demonstram que a exposição aos choques inescapáveis induziu aumento significativo nos níveis de metilação global no hipocampo

ventral dos animais (fator 1: $F_{1,26} = 20,05$; $p < 0,05$; figura 14A), o qual foi revertido pelo tratamento repetido com AMG (interação: $F_{1,26} = 6,564$; $p < 0,05$; figura 14A). Entretanto, as avaliações dos níveis de metilação global no hipocampo dorsal (fator 1; $F_{1,26} = 2,395$; $p > 0,05$ e interação; $F_{1,26} = 0,1239$; $p > 0,05$; figura 14B) e no córtex frontal (fator 1; $F_{1,26} = 1,894$; $p > 0,05$ e interação; $F_{1,26} = 0,8411$; $p > 0,05$; figura 14C) não tiveram alterações significativas entre os grupos avaliados. Cabe ressaltar que o tratamento com o inibidor preferencial da iNOS AMG, não apresentou efeito *per se* nos níveis de metilação global em todas as estruturas avaliadas.

Figura 14: Efeitos do tratamento com AMG sobre a metilação global do DNA no hipocampo ventral (vHPC), hipocampo dorsal (dHPC) e córtex frontal (CTX) de ratos submetidos a choques inescapáveis. Os animais submetidos aos choques inescapáveis (grupo estressado) ou habituados no pré-teste receberam administração i.p. de veículo (salina) ou AMG (30mg/kg) por 7 dias. Uma hora após a última injeção, os animais foram sacrificados e suas estruturas encefálicas processadas para análise da metilação global. Os dados representam a porcentagem média $\pm$ EPM. * $p < 0,05$, diferença significativa entre os grupos estressado/veículo *versus* habituado/veículo; # $p < 0,05$, diferença significativa entre o grupo estressado/veículo *versus* grupo estressado/AMG. ANOVA de duas vias, seguido pelo teste de múltipla comparação de Bonferroni (N=8).

4.4.4. Efeitos do tratamento com 7-nitroindazole sobre os níveis de metilação global do DNA em estruturas encefálicas de ratos submetidos a choques inescapáveis nas patas.

Semelhante aos dados descritos acima, a exposição aos choques nas patas induziu um aumento significativo na metilação global do DNA genômico no hipocampo ventral de ratos (fator 1; $F_{1,28} = 2,91$; $p = 0,05$; figura 15A) o qual foi significativamente revertido pelo tratamento repetido com 7-NI (interação; $F_{1,28} = 6,132$; $p < 0,05$; figura 15A). Avaliação dos níveis de metilação global no córtex frontal (fator 1; $F_{1,28} = 1,441$; $p > 0,05$ e interação; $F_{1,28} = 1,105$; $p > 0,05$; figura 14C) e no hipocampo dorsal (fator 1; $F_{1,28} = 2,395$; $p > 0,05$ e interação; $F_{1,28} = 0,1239$; $p > 0,05$; figura 14B) não demonstrou alterações significativas. Cabe ressaltar que o tratamento com o inibidor preferencial da nNOS 7-NI, não apresentou efeito *per se* nos níveis de metilação global em todas as estruturas avaliadas.

Figura 15: Efeitos do tratamento com 7NI sobre a metilação global do DNA no hipocampo ventral (vHPC), hipocampo dorsal (dHPC) e córtex frontal (CTX) de ratos submetidos a choques inescapáveis. Os animais submetidos aos choques inescapáveis (grupo estressado) ou habituados no pré-teste receberam administração i.p. de veículo (salina) ou 7-NI (60mg/kg) por 7 dias. Uma hora após a última injeção, os animais foram sacrificados e suas estruturas encefálicas dissecadas. Os dados representam a porcentagem média $\pm$ EPM. * $p < 0,05$, diferença significativa entre os grupos estressado/veículo *versus* habituado/veículo; # $p < 0,05$, diferença significativa entre o grupo estressado/veículo *versus* grupo estressado/7-NI. ANOVA de duas vias, seguido pelo teste de múltipla comparação de Bonferroni (N=8).

4.4.5. Expressão da enzima DNMT3b no hipocampo de ratos submetidos ao estresse dos choques inescapáveis nas patas.

Com base nos resultados encontrados nos estudos *in vitro* (estudo 1), em que culturas de células do hipocampo desafiadas com NMDA ou L-arginina por 1h, bem como por dexametasona por 24h, apresentaram aumento da expressão do mRNA da enzima DNMT3b, avaliamos se a exposição a choques inescapáveis promoveria aumento na expressão dessa enzima. Corroborando os resultados *in vitro*, animais submetidos ao estresse dos choques inescapáveis tiveram um aumento significativo na expressão do mRNA para a enzima DNMT3b hipocampo ventral após 1h e 24h ($F_{3,28} = 8,096$; $p < 0,05$; figura 16A) e no hipocampo dorsal após 1h e 24h ($F_{3,28} = 8,19$; $p < 0,05$; figura 16B). Interessantemente, em ambas as estruturas não houve diferença na expressão após 7 dias. Esses dados sugerem que o estresse dos choques inescapáveis da sessão de pré-teste modifica a expressão do mRNA para a enzima DNMT3b.

Figura 16: Efeito da exposição a choques inescapáveis nas patas sobre a expressão da enzima DNMT3b no hipocampo de ratos. Avaliação da expressão do mRNA para a enzima DNMT3b em animais submetidos aos choques inescapáveis após 1h, 24h ou 7 dias da sessão de pré-teste. Os dados representam a média $\pm$ EPM. * $p < 0,05$, diferença significativa comparada com o grupo *naive*. ANOVA de uma via seguido pelo teste de múltipla comparação Newman-Keuls; N=8.

4.4.6. Efeito do tratamento com 7-NI ou AMG sobre a expressão do mRNA para a enzima DNMT3b no hipocampo de ratos

Como acima demonstrado, a exposição a choques nas patas induziu um aumento significativo na expressão do mRNA para a enzima DNMT3b no hipocampo. No vHPC, após 1h do estresse dos choques inescapáveis, houve um aumento significativo na expressão do mRNA para a DNMT3b ($F_{3,20} = 3,978$; $p < 0.05$; Figura 17A), porém o tratamento com 7-NI ou com AMG não bloqueou esse efeito (ANOVA de uma via seguido pelo teste de múltipla comparação *Newman-Keuls*; $p > 0.05$; figura 17A). Diferentemente, 24h após a sessão de PT, o tratamento com AMG atenuou o aumento da expressão do mRNA para a DNMT3b ($q = 3,822$ e $df = 20$, $p < 0,05$; figura 17C). O tratamento com 7-NI, por sua vez, demonstra uma tendência em atenuar o aumento da expressão da DNMT3b em animais estressados, porém os dados não são estatisticamente significativos ($q = 1,981$ e $df = 20$, $p > 0,05$; figura 17C). Por outro lado, no dHPC, o aumento da expressão da DNMT3b foi atenuada pelo tratamento com ambos os fármacos em 1h ($q = 3,028$ e $df = 20$, $p < 0,05$ e $q = 4,098$ e $df = 20$, $p < 0,05$; 7-NI e AMG respectivamente; figura 17B) e em 24h ($q = 4,112$ e $df = 20$, $p < 0,05$ e $q = 3,139$ e $df = 20$, $p < 0,05$; 7-NI e AMG, respectivamente; figura 17D).

Figura 17: Efeito da exposição a choques inescapáveis nas patas sobre a expressão da enzima DNMT3b no hipocampo de ratos. Avaliação do efeito do tratamento com 7-NI ou AMG sobre a expressão do mRNA para a enzima DNMT3b, em animais submetidos aos choques inescapáveis, 1h (gráficos A e B) e 24h (gráficos C e D) após a sessão de pré-teste. Os dados representam a média $\pm$ EPM. * $p < 0,05$, diferença significativa comparada com o grupo Naive. ANOVA de uma via seguido pelo teste de múltipla comparação Newman-Keuls; N=6.

4.4.7. Efeitos do estresse de choques nas patas sobre a expressão das enzimas nNOS e iNOS no cérebro de ratos

O estresse dos choques inescapáveis induziu um aumento da expressão do mRNA para a enzima nNOS e iNOS no hipocampo de ratos. No dHPC, houve aumento significativo da expressão do mRNA para a isoforma nNOS, 24h após a sessão de PT ($F = 3,28 = 3,183$; $p < 0,05$; figura 18A). Embora haja uma tendência para aumento da expressão em 1h e 7d, a diferença não é estatisticamente significativa (ANOVA de uma via; $p > 0,05$; figura 18A). No vHPC, há

uma tendência para aumento da expressão da nNOS, mas a diferença não é estatisticamente significativa (ANOVA de uma via; $p > 0,05$; figura 18B).

Para a iNOS, o estresse induziu também um aumento significativo na sua expressão no vHPC em 24h, mas não em 1h ou 7d após o estresse ($F = 3,28 = 3,921$; $p < 0,05$; figura 18C). A análise no dHPC demonstrou uma tendência na diminuição da expressão do mRNA para a isoforma iNOS em 1h e 7d, porém os dados não são estatisticamente significantes (ANOVA de uma via; $p > 0,05$; figura 18D).

Figura 18: Efeito da exposição a choques inescapáveis nas patas sobre a expressão das enzimas nNOS e iNOS no hipocampo de ratos. Avaliação da expressão do mRNA para as enzimas nNOS (gráfico A e B) e iNOS (gráfico C e D) em animais submetidos aos choques inescapáveis após 1h, 24h ou 7 dias da sessão de pré-teste. Os dados representam a média $\pm$ EPM. * $p < 0,05$, diferença significativa comparada com o grupo *naive*. ANOVA de uma via seguido pelo teste de múltipla comparação Newman-Keuls; $N=8$.

4.4.8. Efeitos do estresse de choques nas patas sobre a expressão do BDNF (exon 4 e exon 9) no cérebro de ratos

A análise estatística da expressão do mRNA para o BDNF (exon 4) demonstrou uma tendência para aumento da expressão no dHPC em 1h, porém os dados não são estatisticamente significantes ($F =_{3,28} = 2,39$; $p > 0,05$; figura 19B), ademais não houve diferença nos tempos de 24h e 7d (ANOVA de uma via, $p > 0,05$; figura 19B). A análise estatística da expressão do exon 4 no vHPC não demonstrou diferença em todos os tempos avaliados ($F =_{3,28} = 0,6917$; $p > 0,05$; figura 19A). Em ambas as estruturas, a expressão do exon 9 não foi estatisticamente alterada pelo estresse nos tempos avaliados ($F =_{3,28} = 3,775$; $p > 0,05$ e $F =_{3,28} = 2,379$; $p > 0,05$; figura 19C e 19D, vHPC e dHPC; respectivamente).

Figura 19: Efeito da exposição a choques nas patas sobre a expressão de BDNF (exon 4 e exon 9) no hipocampo de ratos. Avaliação da expressão do mRNA para o exon 4 (gráfico A e B) e exon 9 (gráfico C e D) em animais submetidos aos choques inescapáveis após 1h, 24h ou 7 dias da sessão de pré-teste. Os dados representam a média $\pm$ EPM. * $p < 0,05$, diferença significativa comparada com o grupo *naive*. ANOVA de uma via seguido pelo teste de múltipla comparação Newman-Keuls; N=8.

4.4.9. Tabela 3: Resumo dos principais achados no estudo 2

Estudo <i>in vivo</i>			
Experimentos	Estressado + controle	Estressado + Aminoguanidina 30 mg/kg	Estressado + 7-nitroindazole 60 mg/kg
Número de falhas -LH	- Aumento no número de falhas *	- Diminuição do número de falhas #	- Diminuição do número de falhas #
Metilação global do DNA	- Aumento nos níveis de metilação global do DNA no vHPC *	- Diminuição nos níveis de metilação global do DNA no vHPC #	- Diminuição nos níveis de metilação global do DNA no vHPC #
DNMT3b	- Aumento da expressão em 1h e 24h após a sessão de PT no vHPC e dHPC *	- Diminuição da expressão no dHPC em 1h # - <i>Sem alteração no vHPC em 1h</i> - Diminuição da expressão no vHPC em 24h # - Diminuição da expressão no dHPC em 24h #	- Diminuição da expressão no dHPC 1h # - <i>Sem alteração no vHPC em 1h</i> - <i>Sem alteração no vHPC em 24h</i> - Diminuição da expressão no dHPC em 24h #
nNOS	- Aumento da expressão em 24h vHPC *	-	-
iNOS	- Aumento da expressão em 24h vHPC *	-	-
BDNF exon 4	- <i>Sem alteração nos tempos de 1h, 24h e 7d</i>	-	-
BDNF exon 9	- <i>Sem alteração nos tempos de 1h, 24h e 7d</i>	-	-

Legenda tabela 3: * $p < 0,05$; diferença significativa entre os grupos habituado/veículo *versus* estressado/veículo; ou *naïve* *versus* estressado 1h ou 24h; # $p < 0,05$; diferença significativa entre os grupos estressado/veículo *versus* estressado/AMG ou estressado/7-NI; ou estressado/veículo *versus* estressado/AMG (1h ou 24h) ou estressado/7-NI (1h ou 24h)

4.5. Discussão

O conjunto de resultados obtidos no estudo 2 demonstraram: (1) ratos que receberam choques inescapáveis nas patas apresentaram um comportamento característico de desamparo aprendido (aumento no número de falhas, diminuição no número de esquivas e aumento na latência para fuga/esquiva), características que parecem refletir prejuízos na adaptação ao estresse, frequentemente relacionado ao sentimento de desamparo/desesperança observado em humanos deprimidos (Seligman and Beagley, 1975; Willner, 1986); (2) o tratamento repetido com inibidor preferencial da iNOS (aminoguanidina, 30 mg/kg) ou da nNOS (7-nitroindazole, 60 mg/kg) atenuou de forma significativa as alterações comportamentais descritas acima, demonstrando um efeito tipo-antidepressivo, efeitos que foram observados em outros modelos animais (Joca and Guimarães, 2006; Montezuma et al., 2012; Caroline Biojone, 2013); (3) a exposição a choques nas patas aumentou a metilação global de DNA e a expressão de DNMT3b, de maneira tempo-dependente, efeitos esses bloqueados pelo tratamento com inibidores da NOS (AMG ou 7-NI); (5) o estresse dos choques inescapáveis nas patas aumentou expressão das enzimas nNOS e iNOS no hipocampo de ratos, porém não modificou a expressão do BDNF (exon-4 e exon-9) nessa mesma estrutura.

Os resultados acima descritos corroboram com os dados encontrados *in vitro* (estudo 1), sugerindo que o aumento da sinalização NOS/NO induzida pelo estresse regula a expressão de DNMT3b, o que induziria aumento da metilação global do DNA no hipocampo de ratos. Nesse contexto, o efeito tipo-antidepressivo dos inibidores da NOS no LH podem estar relacionados com uma atenuação dos efeitos do estresse sobre a metilação de DNA e subsequente expressão na gênica.

Em roedores, o estresse é um dos principais indutores das alterações comportamentais e também moleculares, as quais são comparadas com as alterações dos transtornos de humor

observada em humanos (Maier and Watkins, 2005; Duman and Monteggia, 2006; Hajszan et al., 2009; Pryce et al., 2011; Musazzi et al., 2017). No presente estudo, foi utilizado o modelo experimental do desamparo aprendido, que é considerado um modelo animal com alta validade preditiva e validade de face (Sherman et al., 1982; Joca et al., 2003; Maier and Watkins, 2005; Hajszan et al., 2009; Pryce et al., 2011). Os animais expostos ao choques inescapáveis desenvolvem um comportamento conhecido como desamparo aprendido, que é caracterizado pelo aumento do número de falhas para escapar dos choques na sessão de teste (Seligman and Beagley, 1975; Willner, 1986; Joca et al., 2003; Pryce et al., 2011; Caroline Biojone, 2013). Esse comportamento é correlacionado com os sintomas de desesperança e prejuízo na adaptação ao estresse observado em paciente diagnosticados com depressão maior (Pryce et al., 2011). As alterações comportamentais características do desamparo podem ser atenuadas após o tratamento repetido (sete dias), mas não com o tratamento agudo com antidepressivos efetivos na clínica (Sherman et al., 1982; Joca et al., 2003). Em conjunto com a alta validade de face do paradigma experimental correlacionadas com as alterações comportamentais (desamparo/desesperança; perda de peso e alteração e comprometimento no padrão de sono) e também moleculares (alteração na função do eixo HPA, diminuição das espinhas sinápticas no hipocampo, alterações monoaminérgicas e ativação da resposta imunológica) da DM, X o modelo do LH tem sido considerado uma excelente ferramenta experimental para a avaliação de novas moléculas com potencial efeito antidepressivo/anti-estresse e também para o estudo da neurobiologia do estresse e da depressão (Seligman and Beagley, 1975; Pryce et al., 2011; Maier and Seligman, 2016).

Relevantemente para presente estudo, o nosso grupo de pesquisa demonstrou anteriormente que inibidores da enzima NOS reduzem o número de falhas em fugir/escapar dos choques no LH, considerado um efeito tipo-antidepressivo nesse modelo (Caroline Biojone, 2013; Stanquini et al., 2017). Nesses trabalhos, foi demonstrado que tanto a administração de

AMG (30 mg/kg, i.p.) quanto de 7-NI (60 mg/kg, i.p.) reduziam o número de falhas no LH, após tratamento repetido (7 dias), mas não após administração única (Caroline Biojone, 2013; Sato, 2015; Stanquini et al., 2017). Sendo assim, para o presente projeto não foram testadas várias doses desses fármacos, com objetivo de reduzir o número de animais utilizados no presente estudo. Confirmando os dados acima citados, os resultados do presente estudo demonstraram que ambos os inibidores foram efetivos em atenuar o comportamento do desamparo aprendido, pois o tratamento repedido por sete dias com AMG (30 mg/kg, i.p.) ou com 7-NI (60 mg/kg, i.p.) diminuiu o número de falhas, e o aumento da latência para fuga/esquiva nos animais estressados. Além disso, ambos os tratamentos não modificaram o número de cruzamentos (*intertrial crossing*) dos animais, uma variável representativa da atividade locomotora, demonstrando que o efeito de ambas as drogas não estão relacionadas com as alterações na atividade locomotora dos animais (Geoffroy and Christensen, 1993; Stanquini et al., 2017). Nossos dados estão de acordo com estudos anteriores, onde o efeito dos inibidores da enzima NOS não modificaram a resposta locomotora dos animais no LH e também no teste do campo aberto (Geoffroy and Christensen, 1993; Lipton et al., 1993; Joca and Guimarães, 2006; Montezuma et al., 2012; Tramontina et al., 2012; Sato, 2015; Stanquini et al., 2017).

Os efeitos farmacológicos dos inibidores das enzimas NOS sobre as alterações comportamentais induzidas pelo estresse estão vastamente descritos na literatura (Wegener and Volke, 2010; Wegener and Joca, 2016). Nesse sentido, os inibidores da nNOS demonstraram efeitos em diferentes modelos pré-clínicos, tais como: o teste do nado forçado em ratos/camundongos (Ferreira et al., 2012; Montezuma et al., 2012; Sales et al., 2017), o teste do estresse crônico variado (Yazir et al., 2012, 2012), e no teste do desamparo aprendido (Sato, 2015; Stanquini et al., 2017).

Tanto a nNOS quanto a iNOS parecem ser importantes na regulação da síntese de NO durante o estresse, uma vez que animais geneticamente modificados para a isoforma iNOS, assim como animais tratados com inibidores dessa enzima, apresentam efeito tipo-antidepressivo em modelos pré-clínicos (Joca and Guimarães, 2006; Wegener and Volke, 2010; Montezuma et al., 2012; Caroline Biojone, 2013; Hiroaki-Sato et al., 2014). Além disso, animais submetidos à diferentes tipos de estresse apresentam um aumento da expressão do NOS no PVN e também no hipocampo (Sánchez et al., 1999; Zhou et al., 2007).

Ademais, foi demonstrado que o efeito dos antidepressivos sob as alterações comportamentais induzidas pelo estresse estão relacionadas com controle da expressão e da atividade das enzimas nNOS e iNOS (Dhir and Kulkarni, 2007, 2011; Joca et al., 2015). Na clínica o tratamento com o antidepressivo paroxetina diminui os níveis de nitrato em pacientes com DM (Finkel et al., 1996). Em estudos pré-clínicos, o tratamento com o antidepressivo imipramina diminui os níveis de NO e o antidepressivo paroxetina inibiu a atividade da enzima NOS (Finkel et al., 1996; Krass et al., 2011). Também foi demonstrado que o precursor da síntese de NO (L-arginina) inibe o efeito comportamental do antidepressivo imipramina, bem como do recente descoberto efeito tipo antidepressivo do anestésico ketamina sobre as alterações comportamentais induzidas pelo estresse (Harkin et al., 2003; Liebenberg et al., 2015). Esses dados sustentam o papel dos inibidores da NOS no comportamento tipo depressivo em rato.

O efeito tipo antidepressivo dos inibidores da NOS não são completamente compreendidos. Existem evidências de que o tratamento repetido com essas drogas aumentam a expressão do BDNF no hipocampo, o que pode estar relacionado ao efeito comportamental dessas drogas (Biojone et al., 2015; Stanquini et al., 2017). Isso sugere que o NO regule negativamente a expressão de BDNF durante o estresse, tornando animais mais vulneráveis às

alterações neuroplásticas relacionadas à depressão. Porém, pouco se sabe a respeito dos mecanismos envolvidos nesse efeito.

A sinalização NMDA/nNOS/NO em células do sistema nervoso central, induzida pelo estresse, pode modular alterações intracelulares relacionadas com o desenvolvimento de consequências comportamentais do estresse (Musazzi et al., 2017). Além da ativação da guanilato ciclase solúvel (sGC), o NO pode modular mecanismos intracelulares que regulam a expressão gênica, como as alterações epigenéticas (Campos et al., 2007; Nott and Riccio, 2009; Zimmermann et al., 2012; Nott et al., 2013). Neste estudo, foi demonstrado pela primeira vez que o tratamento repetido com inibidores da enzima NOS (AMG ou 7-NI) atenuaram o aumento da metilação global do DNA no hipocampo ventral de ratos submetidos ao LH. Porém, não foram observadas alterações no hipocampo dorsal e no córtex pré-frontal. Isso sugere que o aumento da metilação de DNA induzido pelo estresse no vHPC esteja sobre controle do NO.

Corroborando com esses dados, o estresse dos choques inescapáveis aumentou a expressão do mRNA para as enzimas nNOS e iNOS no vHPC, após 24h. Embora, não tenham sido observadas diferenças significativas nos tempos de 1h e 7 dias após a sessão de PT, os dados demonstram uma tendência ao aumento da expressão da nNOS. Um perfil semelhante foi observado no dHPC, entretanto os dados não são estatisticamente significativamente. Esses resultados estão de acordo com dados previamente publicados, onde animais geneticamente sensíveis ao estresse (Flinders sensitive line – FSL), demonstram um aumento da expressão e atividade da enzima nNOS no hipocampo (Wegener et al., 2010), bem como ratos submetidos ao estresse do nado forçado apresentaram um aumento da atividade das enzimas nNOS e iNOS no hipocampo dorsal (Sales et al., 2017). Corroborando diretamente com os achados do presente estudos, foi demonstrando que o inibidor preferencial da iNOS (AMG) inibiu o aumento do NO no vHPC em ratos submetidos ao LH (Caroline Biojone, 2013). Assim, os dados sugerem que o aumento da expressão das enzimas nNOS e/ou iNOS no vHPC de ratos estaria envolvido no

aumento da síntese de NO e da metilação global do DNA no vHPC de ratos no sétimo dia após à sessão de PT do desamparo aprendido.

Por outro lado, há evidências de que antidepressivos diminuem os níveis de NO (NOx), bem como a expressão de proteínas intracelulares que participam dos processos reguladores da metilação do DNA (Dhir and Kulkarni, 2007; Joca et al., 2007; Sales et al., 2011; Roenker et al., 2012; Zimmermann et al., 2012; Hiroaki-Sato et al., 2014), sugerindo um possível mecanismo comum entre os inibidores da NOS e os antidepressivos sobre os mecanismo que controlam a metilação do DNA. Interessantemente, o aumento do NO em cultura de células desafiadas com lipopolissacarídeo (LPS), IL-1 β ou *Helicobacter pilory* foram acompanhadas por um aumento nos níveis de DNMT3b e DNMT1 e da atividade enzimática (Campos et al., 2007; Huang et al., 2012). O tratamento com inibidor não seletivo da enzima NOS (L-NAME) atenuou o aumento da expressão da enzima DNMT em cultura de células de melanoma (melan-a cell line) submetidas ao estresse celular (Campos et al., 2007). Estes estudos suportam nossos resultados, e sugerem que a inibição do NO modula a metilação do DNA no hipocampo de ratos submetidos ao estresse. Porém, poucos estudos têm avaliado o efeito do estresse sob a expressão e a atividade das enzimas DNMT em animais submetidos ao estresse. Também não se sabe se o NO estaria envolvido na regulação da expressão e/ou atividade dessas enzimas, como observamos *in vitro* (estudo 1).

A expressão das enzimas DNMTs estão elevadas quando há uma aumento nos níveis de NO intracelular (Campos et al., 2007; Huang et al., 2012). Confirmando os resultados encontrados *in vitro* (estudo 1), nós demonstramos que o estresse induzido pelos choques inescapáveis nas patas dos ratos, foi acompanhado por um aumento significativo na expressão do mRNA da enzima DNMT3b no hipocampo após 1h e 24h da sessão de pré-teste. Entretanto, após sete dias da sessão de pré-teste, os níveis de mRNA para a enzima DNMT3b foram semelhantes aos do grupo *naive*. Interessantemente, o tratamento com ambos os inibidores da

enzima NOS (AMG e 7-NI) atenuaram o aumento da expressão da DNMT3b induzida pelo estresse. Assim, é possível especular que a sessão de PT do LH induziria um aumento da sinalização NOS/NO no hipocampo, o qual levaria a um aumento da expressão e possivelmente da atividade enzimática da DNMT3b, gerando um aumento da metilação global do DNA no vHPC de ratos.

Alguns estudos demonstraram o efeito do estresse na expressão e também na atividade enzimas DNMTs (Boersma et al., 2014; Benoit et al., 2015). Animais submetidos ao estresse durante a fase gestacional, na fase adulta apresentaram um déficit de memória observado no teste do labirinto aquático de Morris e também no reconhecimento de objetos (Maur et al., 2012; Benoit et al., 2015). As alterações comportamentais foram correlacionadas com o aumento da expressão da enzima DNMT3a no hipocampo e também na amígdala, induzindo uma elevação na metilação na região promotora do exon 4 do BDNF (Boersma et al., 2014). Também foi observado que o aumento nos níveis de corticosterona plasmática, induziu a expressão da enzima DNMT1 no hipocampo dorsal de rato (Benoit et al., 2015). Corroborando com os dados do presente projeto, animais submetidos ao estresse durante a fase gestacional, apresentaram um aumento da atividade da enzima nNOS no cerebelo (Maur et al., 2012). Sugerindo participação do NO na metilação do DNA induzido pelo estresse durante a gestacional e o desenvolvimento de transtornos comportamentais na fase adulta.

Sales e colaboradores demonstraram que o tratamento repetido com o antidepressivo imipramina, atenuou aumento da expressão das enzimas DNMT3b e DNMT3a, bem como o aumento da metilação global do DNA no córtex pré-frontal de ratos submetidos ao LH (Sales and Joca, 2018). Também foi observado um aumento da metilação global do DNA no hipocampo dorsal, mas não no hipocampo ventral de ratos submetidos ao estresse do LH (Sales and Joca, 2018). Esses dados corroboram com o nosso estudo, onde o estresse do LH induziu um aumento da expressão da DNMT3b. Porém, nossos dados demonstram um aumento da

metilação global do DNA somente no vHPC. Embora o protocolo experimental tenha sido o mesmo, esta diferença de resultado pode estar relacionada com o não especificidade do método utilizado para quantificar a metilação global do DNA. Porém, os resultados de ambos os estudos se complementam, confirmando o papel do estresse do LH nas alterações comportamentais e também moleculares envolvidas na metilação do DNA no cérebro de ratos. Assim, outros métodos mais específicos são necessários para melhor caracterizar o papel do estresse e do NO da metilação do DNA no cérebro de ratos.

Considerando que o efeito comportamental dos antidepressivos parece depender principalmente dos níveis de BDNF no hipocampo (Duman and Monteggia, 2006; Castrén and Rantamäki, 2010; Autry and Monteggia, 2012), o próximo passo deste estudo foi investigar a expressão do BDNF nos animais submetidos ao LH. Contudo, neste estudo, não foi observada nenhuma alteração significativa na expressão do BDNF (exon 4 e exon 9) no hipocampo de ratos submetidos ao estresse do LH. O efeito do estresse sobre a expressão do BDNF no cérebro de roedores é divergente (Rasmusson et al., 2002; Duman and Monteggia, 2006; Bland et al., 2007; Roth et al., 2009, 2011; Shi et al., 2010). Muitos trabalhos demonstraram o efeito de diferentes estressores na regulação negativa do BDNF, bem como o aumento da metilação na região promotora do exon 4 do BDNF (Rasmusson et al., 2002; Duman and Monteggia, 2006). Por outro lado, alguns estudos descrevem que o estresse agudo não modifica a expressão do BDNF ou pode induzir o aumento da sua expressão (Bland et al., 2007; Shi et al., 2010). Foi demonstrado que ratos submetidos ao estresse agudo do nado forçado, a uma temperatura de 4 °C, apresentaram um aumento da expressão proteica e do mRNA para o BDNF no hipocampo após 15 e 60 min da sessão de estresse (Shi et al., 2010). Bland e colaboradores, demonstraram que o estresse agudo de choques controláveis ou incontroláveis não modificaram a expressão do BDNF nas regiões CA1 e CA2 do hipocampo, porém houve uma diminuição significativa na expressão do BDNF no giro denteado do hipocampo duas horas após a sessão de estresse

(Bland et al., 2007). Além disso, o estresse agudo induz um aumento da expressão do BDNF em outras regiões do cérebro relacionadas com o comportamento tipo depressivo induzido pelo estresse, como o córtex e amígdala (Lee et al., 2006; Bland et al., 2007; Fanous et al., 2010). Os diferentes resultados encontrados acerca da expressão do BDNF modulado pelo estresse, estão relacionados com o tipo de estresse, tempo de avaliação, linhagem animal e metodologia molecular aplicada para quantificar o BDNF. Ademais, diversos fatores intracelulares podem modificar a expressão e a atividade do BDNF, corroborando com os diferentes resultados publicados sobre a expressão do BDNF e o estresse.

Este é o primeiro estudo que demonstrou o papel dos inibidores da NOS na metilação global do DNA em ratos submetidos ao estresse do LH. Interessante, o aumento da expressão da DNMT3b foi observado nos tempos de 1h e 24h após a sessão de PT (choques inescapáveis), mas não no sétimo dia, momento que se observou um aumento da metilação global do DNA. Esses dados sugerem que o aumento rápido da expressão da enzima DNMT3b irá induzir modificações moleculares ao longo prazo, que estão relacionados ao comportamento tipo depressivo observado no LH. Suportando isso, animais submetidos ao estresse durante a fase gestacional, apresentaram alterações comportamentais e um aumento da metilação do DNA na vida adulta (Boersma et al., 2014; Benoit et al., 2015). A inibição farmacológica da NOS atenuou a expressão da enzima DNMT3b, o que corrobora com os efeitos dos inibidores da NOS sobre o comportamento tipo depressivo e a metilação global do DNA no vHPC de ratos no sétimo dia. Assim, é possível especular o estresse induz um aumento do NO e também a expressão da DNMT3b, no qual irá influenciar a expressão genes relacionado com o comportamento tipo depressivo.

Corroborando com o papel da metilação do DNA sobre as alterações comportamentais induzida pelo estresse, recentemente nosso grupo de pesquisa demonstrou o efeito tipo antidepressivo dos inibidores da enzima DNMT (Sales et al., 2011; Sales and Joca, 2016).

Roedores tratados de forma aguda (administração sistêmica ou diretamente no hipocampo) com inibidor não seletivo 5-AzaD ou com o inibidor não nucleosídeo RG-108 demonstraram uma diminuição no tempo de imobilidade nos testes comportamentais do nado forçado (FST), bem como no teste da suspensão pela cauda (TST), efeito considerado tipo antidepressivo (Sales et al., 2011). Nesse mesmo estudo, foi demonstrado que o inibidor não seletivo da enzima DNMT (5-AzaD) diminuiu os níveis de metilação global e aumentou a expressão proteica do BDNF no hipocampo de ratos submetido ao estresse do nado forçado (Sales et al., 2011). Ademais, a associação de doses subefetivas dos inibidores da DNMT (RG-108 ou 5-AzaD) com doses subefetivas dos fármacos antidepressivos (fluoxetina ou desipramina) demonstraram um efeito tipo antidepressivo no teste do nado forçado em camundongos (Sales and Joca, 2016). Isso sugere que a associação entre as duas substâncias em doses subefetivas gera um sinergismo farmacológico que atenua a resposta comportamental gerada pelo estresse do nado forçado. Além disso, Sales e colaboradores demonstraram que os antidepressivos e os inibidores das DNMTs, reverteram as alterações na metilação global do DNA no hipocampo e no córtex pré-frontal de camundongos submetidos ao nado forçado (Sales and Joca, 2016) e também em ratos submetidos ao LH (dados não publicados). Os dados acima descritos propõem que o efeito anti-estresse dos inibidores da DNMTs e também dos antidepressivos estão relacionados com modulação de mecanismos intracelulares semelhantes.

Outros estudos também demonstraram o papel dos antidepressivos na modulação do mecanismo intracelulares relacionados com a metilação do DNA (Zimmermann et al., 2012; Gassen et al., 2015; Ignácio et al., 2017). Em cultura celular de astrócitos, o tratamento por 72h com antidepressivos paroxetina, imipramina ou amitriptilina, diminuíram a atividade da enzima DNMT1, mecanismo relacionado com a diminuição da expressão da proteína histona lisina metil transferase G9a, que forma um complexo proteico com a DNMT1 e induz metilação do DNA (Zimmermann et al., 2012). Outro estudo demonstrou que o tratamento com paroxetina

diminui a formação do complexo proteico formado por DNMT1/CDK5/FKBP52, assim diminuindo a fosforilação da enzima DNMT1 e sua atividade. Esse efeito foi relacionado com a diminuição da metilação e um aumento da expressão do BDNF em cultura de astrócitos (Gassen et al., 2015). Ademais, o tratamento com o antipsicótico atípico quetiapina, que é efetivo no tratamento em paciente resistente a terapia com antidepressivos (Daly, 2008), foi efetivo em inibir o comportamento tipo depressivo e atenuou a atividade da enzima DNMT1 em ratos submetidos ao estresse da separação materna (Ignácio et al., 2017).

Como descrito acima, neste estudo foi demonstrando que os inibidores da NOS (AMG ou 7-NI), diminui a expressão da enzima DNMT3b e o aumento da metilação global do DNA no vHPC de ratos submetido ao estresse do LH. Assim, os resultados do presente projeto e os dados acima citados, sugerem um mecanismo comum entre os inibidores das enzimas NOS, os inibidores das enzimas DNMTs e os antidepressivos sobre as alterações centrais desencadeadas pelo estresse, principalmente sobre a metilação do DNA. No presente estudo foi demonstrado pela primeira vez o efeito dos inibidores da enzima NOS sob o aumento da metilação global do DNA no hipocampo ventral de ratos submetidos ao estresse do LH. Juntamente com dados previamente publicados, é possível especular o relevante papel da sinalização NOS/NO na modulação de mecanismos epigenéticos envolvidos na metilação do DNA e que o efeito anti-estresse dos inibidores da NOS estão relacionados com o controle da expressão da enzima DNMT3b no hipocampo de ratos em nosso protocolo experimental.

5. Discussão Geral

Em resumo, os dados encontrados no presente projeto sustentam a nossa hipótese inicial de que o NO regula mecanismos intracelulares que modulam a metilação do DNA durante o estresse. Em ambas as abordagens experimentais, *in vitro* e também *in vivo*, os dados demonstram que a inibição farmacológica da atividade da enzima NOS atenua o aumento da expressão da enzima DNMT3b e a metilação global do DNA no hipocampo de ratos.

Os mecanismos intracelulares que induzem alterações na expressão gênica, principalmente os mecanismos epigenéticos, trazem um novo caminho para se entender a complexa interação entre gene e o ambiente, bem como os mecanismos de fármacos com efeito antidepressivo. Como já descrito na presente tese, o estresse é um dos principais fatores de risco para o desenvolvimento dos transtornos neuropsiquiátricos, principalmente alterações neurobiológicas e comportamentais relacionadas com a DM (Selye, 1973; Willner, 1986; Ulrich-Lai and Herman, 2009; Sousa, 2016; Musazzi et al., 2017). Porém, a terapia farmacológica empregada atualmente não é completamente efetiva para o tratamento da DM, sendo necessário o desenvolvimento de novos alvos e terapias farmacológicas para o tratamento deste transtorno neuropsiquiátrico.

Embora tenha sido extensivamente demonstrado os efeitos farmacológicos tipo antidepressivos dos inibidores da NOS em modelos pré-clínicos (Joca et al., 2015; Wegener and Joca, 2016), o uso destes inibidores na clínica é limitado, principalmente pela relação com os efeitos adversos renais e cardiovasculares (Wong and Lerner, 2015). Entretanto, os inibidores da NOS contribuíram com a elucidação de diversos mecanismos intracelulares modificados pelo estresse sobre a fisiopatologia da DM (Joca et al., 2015; Wegener and Joca, 2016). Nesse sentido, nossos dados apontam um novo papel farmacológico para NO nas alterações centrais induzidas pelo estresse.

O efeito anti-estresse dos inibidores da NOS, foram acompanhados por uma diminuição da metilação global do DNA no vHPC de ratos submetidos ao LH. Em ambos os estudos, a inibição farmacológica da NOS atenuou a expressão da enzima DNMT3b. Sugerindo que o estresse, induz modificações moleculares que irão desencadear o aumento da expressão e possivelmente a atividade da DNMT3b dependente de NO, induzindo o aumento da metilação do DNA e a repressão gênica. Nossos dados corroboram com estudos anteriores, onde foram demonstrado o efeitos do NO na expressão e também na atividade das DNMTs (Hmadcha et al., 1999; Campos et al., 2007; Huang et al., 2012).

Ademais, no presente projeto não foram avaliadas outras isoformas da enzima DNMT (por exemplo a DNMT1 e DNMT3a) em animais submetidos ao estresse. Embora nos experimentos *in vitro*, não se observou alterações nas expressões das isoformas DNMT3a e DNMT1 quando desafiadas com NMDA ou dexametasona, não podemos descartar que *in vivo* o estresse possa modular a expressão de ambas as enzimas (DNMT1 e/ou DNMT3a). Entretanto, com o objetivo de correlacionar os dados de ambos os estudos, nós investigamos somente a isoforma DNMT3b *in vivo*. Cabe também ressaltar que há uma grande diferença dos materiais avaliados. Em cultura primária de células do hipocampo, há um predomínio de um tipo celular. Por outro lado, nas estruturas avaliadas (vHPC e dHPC), há uma complexa rede de células formadas por neurônios e células da glia, apresentando diferenças quanto a suas características funcionais e também moleculares. Assim, cabe a investigação das outras isoformas da DNMTs bem com a atividade destas enzimas nas diferentes células presente no hipocampo.

Estudos anteriores demonstraram que o tratamento com inibidores da NOS induziram um aumento da expressão do BDNF (Stanquini et al., 2017) e também um aumento da atividade do TrkB (Caroline Biojone, 2013) no hipocampo de ratos submetidos ao estresse do LH. Além disso, a inibição da atividade da enzima NOS, pelo inibidor não seletivo L-NAME (L(G)-nitro-

L-arginine methyl ester) aumentou a expressão do mRNA para o BDNF e também a sua liberação em cultura celular (Pinnock and Herbert, 2008; Sandoval et al., 2011). Porém, no presente projeto o pré-tratamento com inibidor da nNOS (NPA), não reverteu a diminuição da expressão do BDNF (exon 1, exon 4 e exon 9) em cultura primária de hipocampo desafiada com NMDA, sugerindo um mecanismo independente da atividade da NOS. Ademais, ratos submetidos ao estresse dos choques inescapáveis não demonstraram alteração na expressão do mRNA para o BDNF (exon 4 e exon 9). Esses resultados corroboram com o complexo papel do estresse sob a expressão do BDNF no hipocampo. Roth e colaboradores descreveram que ratos submetidos ao modelo experimental de PTSD apresentaram uma diminuição da expressão do mRNA para o BDNF (exon 4) na região CA3 do hipocampo, porém foi observado um aumento da expressão do BDNF (exon 4) nas regiões CA1 e DG (Roth et al., 2011). Ademais, não se observou alteração na expressão deste gene no córtex pré-frontal e na amígdala (Roth et al., 2011). Esses dados sugerem que regiões do hipocampo e diferentes tipos celulares apresentam características particulares sobre a expressão do BDNF em animais submetidos ao estresse. Assim, torna-se necessário a investigação de outros genes envolvidos nas alterações comportamentais e moleculares do estresse.

6. Conclusão

Os dados do presente projeto sugerem que:

In vitro:

A ativação dos receptores GR e NMDA em cultura de hipocampo poderá induzir metilação do DNA através do aumento da expressão da enzima DNMT3b.

A inibição da atividade da enzima nNOS em células do hipocampo atenua a expressão da enzima DNMT3b, sugerindo o papel do NO na metilação do DNA.

A diminuição da expressão do BDNF induzida pela ativação do receptor NMDA é independente da atividade da enzima NOS e também da enzima DNMT em cultura primária de hipocampo.

In vivo:

Os efeitos tipo antidepressivos dos inibidores da NOS (AMG ou 7-NI) observados no teste do desamparo aprendido estão relacionados com a diminuição da metilação do global do DNA no vHPC.

O aumento da expressão da enzima DNMT3b no hipocampo de ratos submetidos ao estresse dos choques inescapáveis do LH induz metilação do DNA no hipocampo de ratos, mecanismo dependente de NO/NOS.

7. Referências Bibliográficas

- Abu-Soud, H.M., and Stuehr, D.J. (1993). Nitric oxide synthases reveal a role for calmodulin in controlling electron transfer. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 90: 10769–10772.
- Aid, T., Kazantseva, A., Piirsoo, M., Palm, K., and Timmusk, T. (2007). Mouse and rat BDNF gene structure and expression revisited. *J. Neurosci. Res.* 85: 525–535.
- Amitai, Y. (2010). Physiologic role for ‘inducible’ nitric oxide synthase: a new form of astrocytic-neuronal interface. *Glia* 58: 1775–1781.
- Anacker, C., Cattaneo, A., Luoni, A., Musaelyan, K., Zunszain, P.A., Milanese, E., et al. (2013). Glucocorticoid-related molecular signaling pathways regulating hippocampal neurogenesis. *Neuropsychopharmacol. Off. Publ. Am. Coll. Neuropsychopharmacol.* 38: 872–883.
- Antila, H., Autio, H., Turunen, L., Harju, K., Tammela, P., Wennerberg, K., et al. (2014). Utilization of in situ ELISA method for examining Trk receptor phosphorylation in cultured cells. *J. Neurosci. Methods* 222: 142–146.
- Athina Markou, M.A.G. (1995). Animal Models of Psychiatric Disorders. In *Neuropsychopharmacology: The Fifth Generation of Progress*, p.
- Autry, A.E., and Monteggia, L.M. (2012). Brain-derived neurotrophic factor and neuropsychiatric disorders. *Pharmacol. Rev.* 64: 238–258.
- Axelrod, J., and Inscoc, J.K. (1963). THE UPTAKE AND BINDING OF CIRCULATING SEROTONIN AND THE EFFECT OF DRUGS. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 141: 161–165.
- Barbon, A., Popoli, M., La Via, L., Moraschi, S., Vallini, I., Tardito, D., et al. (2006). Regulation of editing and expression of glutamate alpha-amino-propionic-acid (AMPA)/kainate receptors by antidepressant drugs. *Biol. Psychiatry* 59: 713–720.
- Begni, V., Riva, M.A., and Cattaneo, A. (2017). Cellular and molecular mechanisms of the brain-derived neurotrophic factor in physiological and pathological conditions. *Clin. Sci. Lond. Engl.* 1979 131: 123–138.
- Belmaker, R.H. (2008). The future of depression psychopharmacology. *CNS Spectr.* 13: 682–687.
- Benoit, J.D., Rakic, P., and Frick, K.M. (2015). Prenatal stress induces spatial memory deficits and epigenetic changes in the hippocampus indicative of heterochromatin formation and reduced gene expression. *Behav. Brain Res.* 281: 1–8.
- Berman, R.M., Cappiello, A., Anand, A., Oren, D.A., Heninger, G.R., Charney, D.S., et al. (2000). Antidepressant effects of ketamine in depressed patients. *Biol. Psychiatry* 47: 351–354.
- Biojone, C., Casarotto, P.C., Joca, S.R., and Castrén, E. (2015). Interplay Between Nitric Oxide and Brain-Derived Neurotrophic Factor in Neuronal Plasticity. *CNS Neurol. Disord. Drug Targets* 14: 979–987.

- Bird, A.P. (1986). CpG-rich islands and the function of DNA methylation. *Nature* 321: 209–213.
- Bishop, A., and Anderson, J. (2005). NO signaling in the CNS: from the physiological to the pathological. *Toxicology* 208: 193–205.
- Biswal, S., Das, D., Barhwal, K., Kumar, A., Nag, T.C., Thakur, M.K., et al. (2016). Epigenetic Regulation of SNAP25 Prevents Progressive Glutamate Excitotoxicity in Hypoxic CA3 Neurons. *Mol. Neurobiol.*
- Bland, S.T., Tamlyn, J.P., Barrientos, R.M., Greenwood, B.N., Watkins, L.R., Campeau, S., et al. (2007). Expression of fibroblast growth factor-2 and brain-derived neurotrophic factor mRNA in the medial prefrontal cortex and hippocampus after uncontrollable or controllable stress. *Neuroscience* 144: 1219–1228.
- Boersma, G.J., Lee, R.S., Cordner, Z.A., Ewald, E.R., Purcell, R.H., Moghadam, A.A., et al. (2014). Prenatal stress decreases Bdnf expression and increases methylation of Bdnf exon IV in rats. *Epigenetics* 9: 437–447.
- Bremner, J.D. (1999). Does stress damage the brain? *Biol. Psychiatry* 45: 797–805.
- Calabrese, F., Molteni, R., Racagni, G., and Riva, M.A. (2009a). Neuronal plasticity: a link between stress and mood disorders. *Psychoneuroendocrinology* 34 Suppl 1: S208–216.
- Calabrese, V., Cornelius, C., Rizzarelli, E., Owen, J.B., Dinkova-Kostova, A.T., and Butterfield, D.A. (2009b). Nitric oxide in cell survival: a janus molecule. *Antioxid. Redox Signal.* 11: 2717–2739.
- Calabrese, V., Mancuso, C., Calvani, M., Rizzarelli, E., Butterfield, D.A., and Giuffrida Stella, A.M. (2007). Nitric oxide in the central nervous system: neuroprotection versus neurotoxicity. *Nat. Rev. Neurosci.* 8: 766–775.
- Campos, A.C.E., Molognoni, F., Melo, F.H.M., Galdieri, L.C., Carneiro, C.R.W., D’Almeida, V., et al. (2007). Oxidative stress modulates DNA methylation during melanocyte anchorage blockade associated with malignant transformation. *Neoplasia N. Y.* 9: 1111–1121.
- Canossa, M., Giordano, E., Cappello, S., Guarnieri, C., and 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.
- Caroline Biojone (2013). Participação da sinalização BDNF-TrkB hipocampal no efeito tipo-antidepressivo induzido pela inibição da produção de NO.
- Castrén, E. (2005). Is mood chemistry? *Nat. Rev. Neurosci.* 6: 241–246.
- Castrén, E., and Antila, H. (2017). Neuronal plasticity and neurotrophic factors in drug responses. *Mol. Psychiatry* 22: 1085–1095.
- Castrén, E., and Rantamäki, T. (2010). The role of BDNF and its receptors in depression and antidepressant drug action: Reactivation of developmental plasticity. *Dev. Neurobiol.* 70: 289–297.

- Castrén, E., Võikar, V., and Rantamäki, T. (2007). Role of neurotrophic factors in depression. *Curr. Opin. Pharmacol.* 7: 18–21.
- Chandley, M.J., Szebeni, A., Szebeni, K., Crawford, J.D., Stockmeier, C.A., Turecki, G., et al. (2014). Elevated gene expression of glutamate receptors in noradrenergic neurons from the locus coeruleus in major depression. *Int. J. Neuropsychopharmacol. Off. Sci. J. Coll. Int. Neuropsychopharmacol. CINP* 17: 1569–1578.
- Chanrion, B., Mannoury la Cour, C., Bertaso, F., Lerner-Natoli, M., Freissmuth, M., Millan, M.J., et al. (2007). Physical interaction between the serotonin transporter and neuronal nitric oxide synthase underlies reciprocal modulation of their activity. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 104: 8119–8124.
- Chatterjee, S., and Sikdar, S.K. (2014). Corticosterone targets distinct steps of synaptic transmission via concentration specific activation of mineralocorticoid and glucocorticoid receptors. *J. Neurochem.* 128: 476–490.
- Chen, E.S., Ernst, C., and Turecki, G. (2011). The epigenetic effects of antidepressant treatment on human prefrontal cortex BDNF expression. *Int. J. Neuropsychopharmacol.* 14: 427–429.
- Chen, H., Lombès, M., and Le Menuet, D. (2017). Glucocorticoid receptor represses brain-derived neurotrophic factor expression in neuron-like cells. *Mol. Brain* 10: 12.
- Christie, B.R., and Cameron, H.A. (2006). Neurogenesis in the adult hippocampus. *Hippocampus* 16: 199–207.
- Christman, J.K. (2002). 5-Azacytidine and 5-aza-2'-deoxycytidine as inhibitors of DNA methylation: mechanistic studies and their implications for cancer therapy. *Oncogene* 21: 5483–5495.
- Christopherson, K.S., Hillier, B.J., Lim, W.A., and Brecht, D.S. (1999). PSD-95 assembles a ternary complex with the N-methyl-D-aspartic acid receptor and a bivalent neuronal NO synthase PDZ domain. *J. Biol. Chem.* 274: 27467–27473.
- Contestabile, A., and Ciani, E. (2004). Role of nitric oxide in the regulation of neuronal proliferation, survival and differentiation. *Neurochem. Int.* 45: 903–914.
- Daly, E. (2008). A review of quetiapine in combination with antidepressant therapy in patients with depression. *Neuropsychiatr. Dis. Treat. Volume 3*: 855–867.
- Datson, N.A., Speksnijder, N., Mayer, J.L., Steenbergen, P.J., Korobko, O., Goeman, J., et al. (2012). The transcriptional response to chronic stress and glucocorticoid receptor blockade in the hippocampal dentate gyrus. *Hippocampus* 22: 359–371.
- Davidson, J.R.T., Stein, D.J., Shalev, A.Y., and Yehuda, R. (2004). Posttraumatic stress disorder: acquisition, recognition, course, and treatment. *J. Neuropsychiatry Clin. Neurosci.* 16: 135–147.
- Dhir, A., and Kulkarni, S.K. (2007). Involvement of nitric oxide (NO) signaling pathway in the antidepressant action of bupropion, a dopamine reuptake inhibitor. *Eur. J. Pharmacol.* 568: 177–185.

- Dhir, A., and Kulkarni, S.K. (2011). Nitric oxide and major depression. *Nitric Oxide Biol. Chem. Off. J. Nitric Oxide Soc.* 24: 125–131.
- Do, K.Q., Grima, G., Benz, B., and Salt, T.E. (2002). Glial-neuronal transfer of arginine and S-nitrosothiols in nitric oxide transmission. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 962: 81–92.
- Duclot, F., and Kabbaj, M. (2015). Epigenetic mechanisms underlying the role of brain-derived neurotrophic factor in depression and response to antidepressants. *J. Exp. Biol.* 218: 21–31.
- Duman, R.S., and Aghajanian, G.K. (2012). Synaptic dysfunction in depression: potential therapeutic targets. *Science* 338: 68–72.
- Duman, R.S., and Aghajanian, G.K. (2014). Neurobiology of rapid acting antidepressants: role of BDNF and GSK-3 β . *Neuropsychopharmacol. Off. Publ. Am. Coll. Neuropsychopharmacol.* 39: 233.
- Duman, R.S., Heninger, G.R., and Nestler, E.J. (1997). A molecular and cellular theory of depression. *Arch. Gen. Psychiatry* 54: 597–606.
- Duman, R.S., and Monteggia, L.M. (2006). A neurotrophic model for stress-related mood disorders. *Biol. Psychiatry* 59: 1116–1127.
- Duman, R.S., Nakagawa, S., and Malberg, J. (2001). Regulation of adult neurogenesis by antidepressant treatment. *Neuropsychopharmacol. Off. Publ. Am. Coll. Neuropsychopharmacol.* 25: 836–844.
- Duman, R.S., and Voleti, B. (2012). Signaling pathways underlying the pathophysiology and treatment of depression: novel mechanisms for rapid-acting agents. *Trends Neurosci.* 35: 47–56.
- Dwivedi, Y., Rizavi, H.S., and Pandey, G.N. (2006). Antidepressants reverse corticosterone-mediated decrease in brain-derived neurotrophic factor expression: differential regulation of specific exons by antidepressants and corticosterone. *Neuroscience* 139: 1017–1029.
- Egan, M.F., Kojima, M., Callicott, J.H., Goldberg, T.E., Kolachana, B.S., Bertolino, A., et al. (2003). The BDNF val66met polymorphism affects activity-dependent secretion of BDNF and human memory and hippocampal function. *Cell* 112: 257–269.
- Elliott, E., Ezra-Nevo, G., Regev, L., Neufeld-Cohen, A., and Chen, A. (2010). Resilience to social stress coincides with functional DNA methylation of the Crf gene in adult mice. *Nat. Neurosci.* 13: 1351–1353.
- Eroğlu, L., and Cağlayan, B. (1997). Anxiolytic and antidepressant properties of methylene blue in animal models. *Pharmacol. Res.* 36: 381–385.
- Fanous, S., Hammer, R.P., and Nikulina, E.M. (2010). Short- and long-term effects of intermittent social defeat stress on brain-derived neurotrophic factor expression in mesocorticolimbic brain regions. *Neuroscience* 167: 598–607.
- Fass, D.M., Schroeder, F.A., Perlis, R.H., and Haggarty, S.J. (2014). Epigenetic mechanisms in mood disorders: Targeting neuroplasticity. *Neuroscience* 264: 112–130.

- Feng, J., Zhou, Y., Campbell, S.L., Le, T., Li, E., Sweatt, J.D., et al. (2010). Dnmt1 and Dnmt3a maintain DNA methylation and regulate synaptic function in adult forebrain neurons. *Nat. Neurosci.* 13: 423–430.
- Ferreira, F.R., Oliveira, A.M., Dinarte, A.R., Pinheiro, D.G., Greene, L.J., Silva, W.A., et al. (2012). Changes in hippocampal gene expression by 7-nitroindazole in rats submitted to forced swimming stress. *Genes Brain Behav.* 11: 303–313.
- Ferreira, J.M., Burnett, A.L., and Rameau, G.A. (2011). Activity-dependent regulation of surface glucose transporter-3. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* 31: 1991–1999.
- Finkel, M.S., Laghrissi-Thode, F., Pollock, B.G., and Rong, J. (1996). Paroxetine is a novel nitric oxide synthase inhibitor. *Psychopharmacol. Bull.* 32: 653–658.
- Fuchikami, M., Morinobu, S., Segawa, M., Okamoto, Y., Yamawaki, S., Ozaki, N., et al. (2011). DNA methylation profiles of the brain-derived neurotrophic factor (BDNF) gene as a potent diagnostic biomarker in major depression. *PloS One* 6: e23881.
- Furchgott, R.F., and Zawadzki, J.V. (1980). The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine. *Nature* 288: 373–376.
- Gałecki, P., Maes, M., Florkowski, A., Lewiński, A., Gałecka, E., Bieńkiewicz, M., et al. (2011). Association between inducible and neuronal nitric oxide synthase polymorphisms and recurrent depressive disorder. *J. Affect. Disord.* 129: 175–182.
- Garthwaite, J. (2008). Concepts of neural nitric oxide-mediated transmission. *Eur. J. Neurosci.* 27: 2783–2802.
- Garthwaite, J., Charles, S.L., and 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.
- Gassen, N.C., Fries, G.R., Zannas, A.S., Hartmann, J., Zschocke, J., Hafner, K., et al. (2015). Chaperoning epigenetics: FKBP51 decreases the activity of DNMT1 and mediates epigenetic effects of the antidepressant paroxetine. *Sci. Signal.* 8: ra119.
- Geoffroy, M., and Christensen, A.V. (1993). Psychomotor stimulants versus antidepressants in the learned helplessness model of depression. *Drug Dev. Res.* 29: 48–55.
- Gilman, S.E., Trinh, N.-H., Smoller, J.W., Fava, M., Murphy, J.M., and Breslau, J. (2013). Psychosocial stressors and the prognosis of major depression: a test of Axis IV. *Psychol. Med.* 43: 303–316.
- Glowinski, J., and Axelrod, J. (1964). INHIBITION OF UPTAKE OF TRITIATED-NORADRENALINE IN THE INTACT RAT BRAIN BY IMIPRAMINE AND STRUCTURALLY RELATED COMPOUNDS. *Nature* 204: 1318–1319.
- Guix, F.X., Uribealago, I., Coma, M., and Muñoz, F.J. (2005). The physiology and pathophysiology of nitric oxide in the brain. *Prog. Neurobiol.* 76: 126–152.
- Haig, D. (2004). The (dual) origin of epigenetics. *Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol.* 69: 67–70.

- Hajszan, T., Dow, A., Warner-Schmidt, J.L., Szigeti-Buck, K., Sallam, N.L., Parducz, A., et al. (2009). Remodeling of hippocampal spine synapses in the rat learned helplessness model of depression. *Biol. Psychiatry* 65: 392–400.
- Harkin, A., Connor, T.J., Walsh, M., St John, N., and Kelly, J.P. (2003). Serotonergic mediation of the antidepressant-like effects of nitric oxide synthase inhibitors. *Neuropharmacology* 44: 616–623.
- Harkin, A.J., Bruce, K.H., Craft, B., and Paul, I.A. (1999). Nitric oxide synthase inhibitors have antidepressant-like properties in mice. 1. Acute treatments are active in the forced swim test. *Eur. J. Pharmacol.* 372: 207–213.
- Herman, J.P., Figueiredo, H., Mueller, N.K., Ulrich-Lai, Y., Ostrander, M.M., Choi, D.C., et al. (2003). Central mechanisms of stress integration: hierarchical circuitry controlling hypothalamo-pituitary-adrenocortical responsiveness. *Front. Neuroendocrinol.* 24: 151–180.
- Higuchi, F., Uchida, S., Yamagata, H., Otsuki, K., Hobara, T., Abe, N., et al. (2011). State-dependent changes in the expression of DNA methyltransferases in mood disorder patients. *J. Psychiatr. Res.* 45: 1295–1300.
- Hing, B., Sathyaputri, L., and Potash, J.B. (2017). A comprehensive review of genetic and epigenetic mechanisms that regulate BDNF expression and function with relevance to major depressive disorder. *Am. J. Med. Genet. Part B Neuropsychiatr. Genet. Off. Publ. Int. Soc. Psychiatr. Genet.*
- Hiroaki-Sato, V.A., Sales, A.J., Biojone, C., and Joca, S.R.L. (2014). Hippocampal nNOS inhibition induces an antidepressant-like effect: involvement of 5HT1A receptors. *Behav. Pharmacol.* 25: 187–196.
- Hmadcha, A., Bedoya, F.J., Sobrino, F., and Pintado, E. (1999). Methylation-dependent gene silencing induced by interleukin 1beta via nitric oxide production. *J. Exp. Med.* 190: 1595–1604.
- Hosang, G.M., Shiles, C., Tansey, K.E., McGuffin, P., and Uher, R. (2014). Interaction between stress and the BDNF Val66Met polymorphism in depression: a systematic review and meta-analysis. *BMC Med.* 12: 7.
- Huang, F.-Y., Chan, A.O.-O., Rashid, A., Wong, D.K.-H., Cho, C.-H., and Yuen, M.-F. (2012). *Helicobacter pylori* induces promoter methylation of E-cadherin via interleukin-1 β activation of nitric oxide production in gastric cancer cells. *Cancer* 118: 4969–4980.
- Ignácio, Z.M., Réus, G.Z., Abelaira, H.M., Maciel, A.L., Moura, A.B. de, Matos, D., et al. (2017). Quetiapine treatment reverses depressive-like behavior and reduces DNA methyltransferase activity induced by maternal deprivation. *Behav. Brain Res.* 320: 225–232.
- Ignarro, L.J., Buga, G.M., Wood, K.S., Byrns, R.E., and Chaudhuri, G. (1987). Endothelium-derived relaxing factor produced and released from artery and vein is nitric oxide. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 84: 9265–9269.
- Islam, A.T.M.S., Kuraoka, A., and Kawabuchi, M. (2003). Morphological basis of nitric oxide production and its correlation with the polysialylated precursor cells in the dentate gyrus of the adult guinea pig hippocampus. *Anat. Sci. Int.* 78: 98–103.

- Izquierdo, A., Wellman, C.L., and Holmes, A. (2006). Brief uncontrollable stress causes dendritic retraction in infralimbic cortex and resistance to fear extinction in mice. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* 26: 5733–5738.
- Jeltsch, A. (2006). Molecular enzymology of mammalian DNA methyltransferases. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 301: 203–225.
- Joca, S.R., Moreira, F.A., and Wegener, G. (2015). Atypical Neurotransmitters and the Neurobiology of Depression. *CNS Neurol. Disord. Drug Targets* 14: 1001–1011.
- Joca, S.R.L., Ferreira, F.R., and Guimarães, F.S. (2007). Modulation of stress consequences by hippocampal monoaminergic, glutamatergic and nitrgic neurotransmitter systems. *Stress Amst. Neth.* 10: 227–249.
- Joca, S.R.L., and Guimarães, F.S. (2006). Inhibition of neuronal nitric oxide synthase in the rat hippocampus induces antidepressant-like effects. *Psychopharmacology (Berl.)* 185: 298–305.
- Joca, S.R.L., Padovan, C.M., and Guimarães, F.S. (2003). Activation of post-synaptic 5-HT(1A) receptors in the dorsal hippocampus prevents learned helplessness development. *Brain Res.* 978: 177–184.
- Joca, S.R.L., Zanelati, T., and Guimarães, F.S. (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.
- Joëls, M., and Baram, T.Z. (2009). The neuro-symphony of stress. *Nat. Rev. Neurosci.* 10: 459–466.
- Kang, H.J., Voleti, B., Hajszan, T., Rajkowska, G., Stockmeier, C.A., Licznarski, P., et al. (2012). Decreased expression of synapse-related genes and loss of synapses in major depressive disorder. *Nat. Med.* 18: 1413–1417.
- Karpova, N.N., Rantamäki, T., Di Lieto, A., Lindemann, L., Hoener, M.C., and Castrén, E. (2010). Darkness Reduces BDNF Expression in the Visual Cortex and Induces Repressive Chromatin Remodeling at the BDNF Gene in Both Hippocampus and Visual Cortex. *Cell. Mol. Neurobiol.* 30: 1117–1123.
- Katayama, Y., Takahashi, M., and Kuwayama, H. (2009). *Helicobacter pylori* causes runx3 gene methylation and its loss of expression in gastric epithelial cells, which is mediated by nitric oxide produced by macrophages. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 388: 496–500.
- Katsuki, S., Arnold, W., Mittal, C., and Murad, F. (1977). Stimulation of guanylate cyclase by sodium nitroprusside, nitroglycerin and nitric oxide in various tissue preparations and comparison to the effects of sodium azide and hydroxylamine. *J. Cyclic Nucleotide Res.* 3: 23–35.
- Keks, N.A., Burrows, G.D., Copolov, D.L., Newton, R., Paoletti, N., Schweitzer, I., et al. (2007). Beyond the evidence: is there a place for antidepressant combinations in the pharmacotherapy of depression? *Med. J. Aust.* 186: 142–144.

- Keller, S., Sarchiapone, M., Zarrilli, F., Videtic, A., Ferraro, A., Carli, V., et al. (2010). Increased BDNF promoter methylation in the Wernicke area of suicide subjects. *Arch. Gen. Psychiatry* 67: 258–267.
- Kendler, K.S., Gardner, C.O., and Prescott, C.A. (2006). Toward a comprehensive developmental model for major depression in men. *Am. J. Psychiatry* 163: 115–124.
- Kendler, K.S., Kessler, R.C., Walters, E.E., MacLean, C., Neale, M.C., Heath, A.C., et al. (1995). Stressful life events, genetic liability, and onset of an episode of major depression in women. *Am. J. Psychiatry* 152: 833–842.
- Kessler, R.C., Berglund, P., Demler, O., Jin, R., Koretz, D., Merikangas, K.R., et al. (2003). The epidemiology of major depressive disorder: results from the National Comorbidity Survey Replication (NCS-R). *JAMA* 289: 3095–3105.
- Kessler, R.C., Gruber, M., Hettema, J.M., Hwang, I., Sampson, N., and Yonkers, K.A. (2008). Co-morbid major depression and generalized anxiety disorders in the National Comorbidity Survey follow-up. *Psychol. Med.* 38: 365–374.
- Kim, J.K., Samaranayake, M., and Pradhan, S. (2009). Epigenetic mechanisms in mammals. *Cell. Mol. Life Sci. CMLS* 66: 596–612.
- Kiss, J.P. (2008). Theory of active antidepressants: a nonsynaptic approach to the treatment of depression. *Neurochem. Int.* 52: 34–39.
- Kloet, E.R. de, Joëls, M., and Holsboer, F. (2005). Stress and the brain: from adaptation to disease. *Nat. Rev. Neurosci.* 6: 463–475.
- Koolschijn, P.C.M.P., Haren, N.E.M. van, Lensvelt-Mulders, G.J.L.M., Hulshoff Pol, H.E., and Kahn, R.S. (2009). Brain volume abnormalities in major depressive disorder: a meta-analysis of magnetic resonance imaging studies. *Hum. Brain Mapp.* 30: 3719–3735.
- Krass, M., Wegener, G., Vasar, E., and Volke, V. (2011). The antidepressant action of imipramine and venlafaxine involves suppression of nitric oxide synthesis. *Behav. Brain Res.* 218: 57–63.
- Krishnan, V., and Nestler, E.J. (2008). The molecular neurobiology of depression. *Nature* 455: 894–902.
- Labonte, B., Yerko, V., Gross, J., Mechawar, N., Meaney, M.J., Szyf, M., et al. (2012). Differential glucocorticoid receptor exon 1(B), 1(C), and 1(H) expression and methylation in suicide completers with a history of childhood abuse. *Biol. Psychiatry* 72: 41–48.
- Lapin, I.P., and Oxenkrug, G.F. (1969). Intensification of the central serotonergic processes as a possible determinant of the thymoleptic effect. *Lancet Lond. Engl.* 1: 132–136.
- LaPlant, Q., Vialou, V., Covington, H.E., Dumitriu, D., Feng, J., Warren, B.L., et al. (2010). Dnmt3a regulates emotional behavior and spine plasticity in the nucleus accumbens. *Nat. Neurosci.* 13: 1137–1143.

- Lee, R.S., Tamashiro, K.L.K., Yang, X., Purcell, R.H., Harvey, A., Willour, V.L., et al. (2010). Chronic corticosterone exposure increases expression and decreases deoxyribonucleic acid methylation of Fkbp5 in mice. *Endocrinology* 151: 4332–4343.
- Lee, Y., Duman, R.S., and Marek, G.J. (2006). The mGlu2/3 receptor agonist LY354740 suppresses immobilization stress-induced increase in rat prefrontal cortical BDNF mRNA expression. *Neurosci. Lett.* 398: 328–332.
- Lepine, B.A., Moreno, R.A., Campos, R.N., and Couttolenc, B.F. (2012). Treatment-resistant depression increases health costs and resource utilization. *Rev. Bras. Psiquiatr. São Paulo Braz.* 1999 34: 379–388.
- Levone, B.R., Cryan, J.F., and O’Leary, O.F. (2015). Role of adult hippocampal neurogenesis in stress resilience. *Neurobiol. Stress* 1: 147–155.
- Li, N., Lee, B., Liu, R.-J., Banasr, M., Dwyer, J.M., Iwata, M., et al. (2010). mTOR-dependent synapse formation underlies the rapid antidepressant effects of NMDA antagonists. *Science* 329: 959–964.
- Liebenberg, N., Joca, S., and Wegener, G. (2015). Nitric oxide involvement in the antidepressant-like effect of ketamine in the Flinders sensitive line rat model of depression. *Acta Neuropsychiatr.* 27: 90–96.
- Lipton, S.A., Choi, Y.B., Pan, Z.H., Lei, S.Z., Chen, H.S., Sucher, N.J., et al. (1993). A redox-based mechanism for the neuroprotective and neurodestructive effects of nitric oxide and related nitroso-compounds. *Nature* 364: 626–632.
- Livak, K.J., and Schmittgen, T.D. (2001). Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods San Diego Calif* 25: 402–408.
- Lopizzo, N., Bocchio Chiavetto, L., Cattane, N., Plazzotta, G., Tarazi, F.I., Pariante, C.M., et al. (2015). Gene-environment interaction in major depression: focus on experience-dependent biological systems. *Front. Psychiatry* 6: 68.
- Lozano, R., Rosero, C.A., and Hagerman, R.J. (2014). Fragile X spectrum disorders. *Intractable Rare Dis. Res.* 3: 134–146.
- Lu, Y.-R., Fu, X.-Y., Shi, L.-G., Jiang, Y., Wu, J.-L., Weng, X.-J., et al. (2014). Decreased plasma neuroactive amino acids and increased nitric oxide levels in melancholic major depressive disorder. *BMC Psychiatry* 14: 123.
- Machado-Vieira, R., Baumann, J., Wheeler-Castillo, C., Latov, D., Henter, I.D., Salvatore, G., et al. (2010). The Timing of Antidepressant Effects: A Comparison of Diverse Pharmacological and Somatic Treatments. *Pharm. Basel Switz.* 3: 19–41.
- Magariños, A.M., and McEwen, B.S. (1995). Stress-induced atrophy of apical dendrites of hippocampal CA3c neurons: involvement of glucocorticoid secretion and excitatory amino acid receptors. *Neuroscience* 69: 89–98.
- Mahgoub, M., and Monteggia, L.M. (2013). Epigenetics and psychiatry. *Neurother. J. Am. Soc. Exp. Neurother.* 10: 734–741.

- Maier, S.F., and Seligman, M.E.P. (2016). Learned helplessness at fifty: Insights from neuroscience. *Psychol. Rev.* 123: 349–367.
- Maier, S.F., and Watkins, L.R. (2005). Stressor controllability and learned helplessness: the roles of the dorsal raphe nucleus, serotonin, and corticotropin-releasing factor. *Neurosci. Biobehav. Rev.* 29: 829–841.
- Makino, S., Smith, M.A., and Gold, P.W. (1995). Increased expression of corticotropin-releasing hormone and vasopressin messenger ribonucleic acid (mRNA) in the hypothalamic paraventricular nucleus during repeated stress: association with reduction in glucocorticoid receptor mRNA levels. *Endocrinology* 136: 3299–3309.
- Malberg, J.E., and Duman, R.S. (2003). Cell proliferation in adult hippocampus is decreased by inescapable stress: reversal by fluoxetine treatment. *Neuropsychopharmacol. Off. Publ. Am. Coll. Neuropsychopharmacol.* 28: 1562–1571.
- Martín-Subero, J.I. (2011). How epigenomics brings phenotype into being. *Pediatr. Endocrinol. Rev. PER 9 Suppl 1*: 506–510.
- Matrisciano, F., Panaccione, I., Dong, E., Grayson, D.R., and Guidotti, A. (2016). Epigenetics: From Basic Biology to Chromatin-Modifying Drugs and New Potential Clinical Applications. In *Epigenetic Methods in Neuroscience Research*, N. Karpova, ed. (New York, NY: Springer New York), pp 3–18.
- Maur, D.G., Romero, C.B., Burdet, B., Palumbo, M.L., and Zorrilla-Zubilete, M.A. (2012). Prenatal stress induces alterations in cerebellar nitric oxide that are correlated with deficits in spatial memory in rat's offspring. *Neurochem. Int.* 61: 1294–1301.
- Mayer, B., Brunner, F., and Schmidt, K. (1993). Inhibition of nitric oxide synthesis by methylene blue. *Biochem. Pharmacol.* 45: 367–374.
- Mayer, J.L., Klumpers, L., Maslam, S., Kloet, E.R. de, Joëls, M., and Lucassen, P.J. (2006). Brief treatment with the glucocorticoid receptor antagonist mifepristone normalises the corticosterone-induced reduction of adult hippocampal neurogenesis. *J. Neuroendocrinol.* 18: 629–631.
- Maynard, K.R., Hill, J.L., Calcaterra, N.E., Palko, M.E., Kardian, A., Paredes, D., et al. (2016). Functional Role of BDNF Production from Unique Promoters in Aggression and Serotonin Signaling. *Neuropsychopharmacol. Off. Publ. Am. Coll. Neuropsychopharmacol.* 41: 1943–1955.
- McEwen, B.S., and Gianaros, P.J. (2011). Stress- and allostasis-induced brain plasticity. *Annu. Rev. Med.* 62: 431–445.
- McGowan, P.O., Sasaki, A., D'Alessio, A.C., Dymov, S., Labonté, B., Szyf, M., et al. (2009). Epigenetic regulation of the glucocorticoid receptor in human brain associates with childhood abuse. *Nat. Neurosci.* 12: 342–348.
- Mifsud, K.R., Saunderson, E.A., Spiers, H., Carter, S.D., Trollope, A.F., Mill, J., et al. (2017). Rapid Down-Regulation of Glucocorticoid Receptor Gene Expression in the Dentate Gyrus after Acute Stress in vivo: Role of DNA Methylation and MicroRNA Activity. *Neuroendocrinology* 104: 157–169.

- Mishra, O.P., Ashraf, Q.M., and Delivoria-Papadopoulos, M. (2002). Phosphorylation of cAMP response element binding (CREB) protein during hypoxia in cerebral cortex of newborn piglets and the effect of nitric oxide synthase inhibition. *Neuroscience* 115: 985–991.
- Mitchelmore, C., and Gede, L. (2014). Brain Derived Neurotrophic Factor: epigenetic regulation in psychiatric disorders. *Brain Res.* 1586: 162–172.
- Moghaddam, B. (2002). Stress activation of glutamate neurotransmission in the prefrontal cortex: implications for dopamine-associated psychiatric disorders. *Biol. Psychiatry* 51: 775–787.
- Montagna, C., Rizza, S., Maiani, E., Piredda, L., Filomeni, G., and Cecconi, F. (2016). To eat, or NOt to eat: S-nitrosylation signaling in autophagy. *FEBS J.*
- Montezuma, K., Biojone, C., Lisboa, S.F., Cunha, F.Q., Guimarães, F.S., and Joca, S.R.L. (2012). Inhibition of iNOS induces antidepressant-like effects in mice: pharmacological and genetic evidence. *Neuropharmacology* 62: 485–491.
- Morimoto, M., Morita, N., Ozawa, H., Yokoyama, K., and Kawata, M. (1996). Distribution of glucocorticoid receptor immunoreactivity and mRNA in the rat brain: an immunohistochemical and in situ hybridization study. *Neurosci. Res.* 26: 235–269.
- Morris, M.J., Na, E.S., Autry, A.E., and Monteggia, L.M. (2016). Impact of DNMT1 and DNMT3a forebrain knockout on depressive- and anxiety like behavior in mice. *Neurobiol. Learn. Mem.* 135: 139–145.
- Mukherjee, P., Cinelli, M.A., Kang, S., and Silverman, R.B. (2014). Development of nitric oxide synthase inhibitors for neurodegeneration and neuropathic pain. *Chem. Soc. Rev.* 43: 6814–6838.
- Murphy, G.M., Hollander, S.B., Rodrigues, H.E., Kremer, C., and Schatzberg, A.F. (2004). Effects of the serotonin transporter gene promoter polymorphism on mirtazapine and paroxetine efficacy and adverse events in geriatric major depression. *Arch. Gen. Psychiatry* 61: 1163–1169.
- Murray, C.J., and Lopez, A.D. (1997). Global mortality, disability, and the contribution of risk factors: Global Burden of Disease Study. *Lancet Lond. Engl.* 349: 1436–1442.
- Musazzi, L., Tornese, P., Sala, N., and Popoli, M. (2017). Acute or Chronic? A Stressful Question. *Trends Neurosci.* 40: 525–535.
- Musazzi, L., Treccani, G., Mallei, A., and Popoli, M. (2013). The action of antidepressants on the glutamate system: regulation of glutamate release and glutamate receptors. *Biol. Psychiatry* 73: 1180–1188.
- Nagy, C., Vaillancourt, K., and Turecki, G. (2017). A role for activity-dependent epigenetics in the development and treatment of major depressive disorder. *Genes Brain Behav.*
- Nakamura, T., and Lipton, S.A. (2016a). Nitrosative Stress in the Nervous System: Guidelines for Designing Experimental Strategies to Study Protein S-Nitrosylation. *Neurochem. Res.* 41: 510–514.

- Nakamura, T., and Lipton, S.A. (2016b). Protein S-Nitrosylation as a Therapeutic Target for Neurodegenerative Diseases. *Trends Pharmacol. Sci.* 37: 73–84.
- Nava, N., Treccani, G., Alabsi, A., Kaastrup Mueller, H., Elfving, B., Popoli, M., et al. (2017). Temporal Dynamics of Acute Stress-Induced Dendritic Remodeling in Medial Prefrontal Cortex and the Protective Effect of Desipramine. *Cereb. Cortex N. Y. N 1991* 27: 694–705.
- Naylor, G.J., Smith, A.H., and Connelly, P. (1987). A controlled trial of methylene blue in severe depressive illness. *Biol. Psychiatry* 22: 657–659.
- Nestler, E.J. (1998). Antidepressant treatments in the 21st century. *Biol. Psychiatry* 44: 526–533.
- Nestler, E.J., Barrot, M., DiLeone, R.J., Eisch, A.J., Gold, S.J., and Monteggia, L.M. (2002). Neurobiology of depression. *Neuron* 34: 13–25.
- Nott, A., Nitarska, J., Veenvliet, J.V., Schacke, S., Derijck, A.A.H.A., Sirko, P., et al. (2013). S-nitrosylation of HDAC2 regulates the expression of the chromatin-remodeling factor Brm during radial neuron migration. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 110: 3113–3118.
- Nott, A., and Riccio, A. (2009). Nitric oxide-mediated epigenetic mechanisms in developing neurons. *Cell Cycle Georget. Tex* 8: 725–730.
- Okano, M., Bell, D.W., Haber, D.A., and Li, E. (1999). DNA methyltransferases Dnmt3a and Dnmt3b are essential for de novo methylation and mammalian development. *Cell* 99: 247–257.
- Oliveira, R.M.W., Guimarães, F.S., and Deakin, J.F.W. (2008). Expression of neuronal nitric oxide synthase in the hippocampal formation in affective disorders. *Braz. J. Med. Biol. Res. Rev. Bras. Pesqui. Medicas E Biol.* 41: 333–341.
- Palmer, R.M., Ferrige, A.G., and Moncada, S. (1987). Nitric oxide release accounts for the biological activity of endothelium-derived relaxing factor. *Nature* 327: 524–526.
- Park, K., Heo, H., Han, M.E., Choi, K., Yi, J.H., Kang, S.J., et al. (2015). Learning-induced synaptic potentiation in implanted neural precursor cell-derived neurons. *Sci. Rep.* 5: 17796.
- Pehrson, A.L., and Sanchez, C. (2014). Serotonergic modulation of glutamate neurotransmission as a strategy for treating depression and cognitive dysfunction. *CNS Spectr.* 19: 121–133.
- Peng, Y.-L., Liu, Y.-N., Liu, L., Wang, X., Jiang, C.-L., and Wang, Y.-X. (2012). Inducible nitric oxide synthase is involved in the modulation of depressive behaviors induced by unpredictable chronic mild stress. *J. Neuroinflammation* 9:.
- Pezawas, L., Meyer-Lindenberg, A., Drabant, E.M., Verchinski, B.A., Munoz, K.E., Kolachana, B.S., et al. (2005). 5-HTTLPR polymorphism impacts human cingulate-amygdala interactions: a genetic susceptibility mechanism for depression. *Nat. Neurosci.* 8: 828–834.

- Pezawas, L., Meyer-Lindenberg, A., Goldman, A.L., Verchinski, B.A., Chen, G., Kolachana, B.S., et al. (2008). Evidence of biologic epistasis between BDNF and SLC6A4 and implications for depression. *Mol. Psychiatry* 13: 709–716.
- Pinnock, S.B., and Herbert, J. (2008). Brain-derived neurotrophic factor and neurogenesis in the adult rat dentate gyrus: interactions with corticosterone. *Eur. J. Neurosci.* 27: 2493–2500.
- Popoli, M., Yan, Z., McEwen, B.S., and Sanacora, G. (2011). The stressed synapse: the impact of stress and glucocorticoids on glutamate transmission. *Nat. Rev. Neurosci.* 13: 22–37.
- Porsolt, R.D., Anton, G., Blavet, N., and Jalfre, M. (1978). Behavioural despair in rats: a new model sensitive to antidepressant treatments. *Eur. J. Pharmacol.* 47: 379–391.
- Post, R.M. (1992). Transduction of psychosocial stress into the neurobiology of recurrent affective disorder. *Am. J. Psychiatry* 149: 999–1010.
- Pryce, C.R., Azzinnari, D., Spinelli, S., Seifritz, E., Tegethoff, M., and Meinlschmidt, G. (2011). Helplessness: a systematic translational review of theory and evidence for its relevance to understanding and treating depression. *Pharmacol. Ther.* 132: 242–267.
- Rameau, G.A., Tukey, D.S., Garcin-Hosfield, E.D., Titcombe, R.F., Misra, C., Khatri, L., et al. (2007). Biphasic coupling of neuronal nitric oxide synthase phosphorylation to the NMDA receptor regulates AMPA receptor trafficking and neuronal cell death. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* 27: 3445–3455.
- Rasmusson, A.M., Shi, L., and Duman, R. (2002). Downregulation of BDNF mRNA in the hippocampal dentate gyrus after re-exposure to cues previously associated with footshock. *Neuropsychopharmacol. Off. Publ. Am. Coll. Neuropsychopharmacol.* 27: 133–142.
- Renfranz, P.J., Cunningham, M.G., and McKay, R.D. (1991). Region-specific differentiation of the hippocampal stem cell line HiB5 upon implantation into the developing mammalian brain. *Cell* 66: 713–729.
- Roenker, N.L., Gudelsky, G.A., Ahlbrand, R., Horn, P.S., and Richtand, N.M. (2012). Evidence for involvement of nitric oxide and GABAB receptors in MK-801-stimulated release of glutamate in rat prefrontal cortex. *Neuropharmacology* 63: 575–581.
- Rosso, I.M., Crowley, D.J., Silveri, M.M., Rauch, S.L., and Jensen, J.E. (2017). Hippocampus Glutamate and N-Acetyl Aspartate Markers of Excitotoxic Neuronal Compromise in Posttraumatic Stress Disorder. *Neuropsychopharmacol. Off. Publ. Am. Coll. Neuropsychopharmacol.* 42: 1698–1705.
- Roth, T.L., Lubin, F.D., Funk, A.J., and Sweatt, J.D. (2009). Lasting epigenetic influence of early-life adversity on the BDNF gene. *Biol. Psychiatry* 65: 760–769.
- Roth, T.L., Zoladz, P.R., Sweatt, J.D., and Diamond, D.M. (2011). Epigenetic modification of hippocampal Bdnf DNA in adult rats in an animal model of post-traumatic stress disorder. *J. Psychiatr. Res.* 45: 919–926.
- Russo, S.J., and Nestler, E.J. (2013). The brain reward circuitry in mood disorders. *Nat. Rev. Neurosci.* 14: 609–625.

- Sakata, K., and Duke, S.M. (2014). Lack of BDNF expression through promoter IV disturbs expression of monoamine genes in the frontal cortex and hippocampus. *Neuroscience* 260: 265–275.
- Sakata, K., Jin, L., and Jha, S. (2010). Lack of promoter IV-driven BDNF transcription results in depression-like behavior. *Genes Brain Behav.* 9: 712–721.
- Sales, A.J., Biojone, C., Terceti, M.S., Guimarães, F.S., Gomes, M.V.M., and Joca, S.R.L. (2011). Antidepressant-like effect induced by systemic and intra-hippocampal administration of DNA methylation inhibitors. *Br. J. Pharmacol.* 164: 1711–1721.
- Sales, A.J., Hiroaki-Sato, V.A., and Joca, S.R.L. (2017). Participation of hippocampal nitric oxide synthase and soluble guanylate cyclase in the modulation of behavioral responses elicited by the rat forced swimming test. *Behav. Pharmacol.* 28: 19–29.
- Sales, A.J., and Joca, S.R.L. (2016). Effects of DNA methylation inhibitors and conventional antidepressants on mice behaviour and brain DNA methylation levels. *Acta Neuropsychiatr.* 28: 11–22.
- Sales, A.J., and Joca, S.R.L. (2018). Antidepressant administration modulates stress-induced DNA methylation and DNA methyltransferase expression in rat prefrontal cortex and hippocampus. *Behav. Brain Res.* 343: 8–15.
- Sanacora, G., Treccani, G., and Popoli, M. (2012). Towards a glutamate hypothesis of depression. *Neuropharmacology* 62: 63–77.
- Sánchez, F., Moreno, M.N., Vacas, P., Carretero, J., and Vázquez, R. (1999). Swim stress enhances the NADPH-diaphorase histochemical staining in the paraventricular nucleus of the hypothalamus. *Brain Res.* 828: 159–162.
- Sandoval, R., González, A., Caviedes, A., Pancetti, F., Smalla, K.-H., Kaehne, T., et al. (2011). Homeostatic NMDA receptor down-regulation via brain derived neurotrophic factor and nitric oxide-dependent signalling in cortical but not in hippocampal neurons. *J. Neurochem.* 118: 760–772.
- Santarelli, L., Saxe, M., Gross, C., Surget, A., Battaglia, F., Dulawa, S., et al. (2003). Requirement of hippocampal neurogenesis for the behavioral effects of antidepressants. *Science* 301: 805–809.
- Santos, A.I., Martínez-Ruiz, A., and Araújo, I.M. (2015). S-nitrosation and neuronal plasticity. *Br. J. Pharmacol.* 172: 1468–1478.
- Sato, V.A.H. (2015). Neural substrates involved with the helplessness behavior development in rats: possible involvement of nitric oxide. University of São Paulo.
- Schmaal, L., Veltman, D.J., Erp, T.G.M. van, Sämann, P.G., Frodl, T., Jahanshad, N., et al. (2016). Subcortical brain alterations in major depressive disorder: findings from the ENIGMA Major Depressive Disorder working group. *Mol. Psychiatry* 21: 806–812.
- Schmidt, H.D., and Duman, R.S. (2007). The role of neurotrophic factors in adult hippocampal neurogenesis, antidepressant treatments and animal models of depressive-like behavior. *Behav. Pharmacol.* 18: 391–418.

- Seligman, M.E., and Beagley, G. (1975). Learned helplessness in the rat. *J. Comp. Physiol. Psychol.* 88: 534–541.
- Seligman, M.E., and Maier, S.F. (1967). Failure to escape traumatic shock. *J. Exp. Psychol.* 74: 1–9.
- Selye, H. (1936). A syndrome produced by diverse nocuous agents. 1936. *J. Neuropsychiatry Clin. Neurosci.* 10: 230–231.
- Selye, H. (1973). The evolution of the stress concept. *Am. Sci.* 61: 692–699.
- Sharma, D., Bhawe, S., Gregg, E., and Uht, R. (2013). Dexamethasone induces a putative repressor complex and chromatin modifications in the CRH promoter. *Mol. Endocrinol. Baltim. Md* 27: 1142–1152.
- Sherman, A.D., Sacquitne, J.L., and Petty, F. (1982). Specificity of the learned helplessness model of depression. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 16: 449–454.
- Shi, S.-S., Shao, S.-H., Yuan, B.-P., Pan, F., and Li, Z.-L. (2010). Acute stress and chronic stress change brain-derived neurotrophic factor (BDNF) and tyrosine kinase-coupled receptor (TrkB) expression in both young and aged rat hippocampus. *Yonsei Med. J.* 51: 661–671.
- Singh, V., Sharma, P., and Capalash, N. (2013). DNA methyltransferase-1 inhibitors as epigenetic therapy for cancer. *Curr. Cancer Drug Targets* 13: 379–399.
- Skolnick, P. (2002). Modulation of glutamate receptors: strategies for the development of novel antidepressants. *Amino Acids* 23: 153–159.
- Skolnick, P., Popik, P., and Trullas, R. (2009). Glutamate-based antidepressants: 20 years on. *Trends Pharmacol. Sci.* 30: 563–569.
- Slattery, D.A., and Cryan, J.F. (2017). Modelling depression in animals: at the interface of reward and stress pathways. *Psychopharmacology (Berl.)* 234: 1451–1465.
- Socco, S., Bovee, R.C., Palczewski, M.B., Hickok, J.R., and Thomas, D.D. (2017). Epigenetics: The third pillar of nitric oxide signaling. *Pharmacol. Res.* 121: 52–58.
- Soetanto, A., Wilson, R.S., Talbot, K., Un, A., Schneider, J.A., Sobiesk, M., et al. (2010). Association of anxiety and depression with microtubule-associated protein 2- and synaptopodin-immunolabeled dendrite and spine densities in hippocampal CA3 of older humans. *Arch. Gen. Psychiatry* 67: 448–457.
- Son, H., Hawkins, R.D., Martin, K., Kiebler, M., Huang, P.L., Fishman, M.C., et al. (1996). Long-term potentiation is reduced in mice that are doubly mutant in endothelial and neuronal nitric oxide synthase. *Cell* 87: 1015–1023.
- Sousa, N. (2016). The dynamics of the stress neuromatrix. *Mol. Psychiatry* 21: 302–312.
- Stanguini, L.A., Biojone, C., Guimarães, F.S., and Joca, S.R. (2017). Repeated treatment with nitric oxide synthase inhibitor attenuates learned helplessness development in rats and increases hippocampal BDNF expression. *Acta Neuropsychiatr.* 1–10.

- Stresemann, C., Brueckner, B., Musch, T., Stopper, H., and Lyko, F. (2006). Functional diversity of DNA methyltransferase inhibitors in human cancer cell lines. *Cancer Res.* 66: 2794–2800.
- Suri, D., and Vaidya, V.A. (2013). Glucocorticoid regulation of brain-derived neurotrophic factor: relevance to hippocampal structural and functional plasticity. *Neuroscience* 239: 196–213.
- Suzuki, E., Yagi, G., Nakaki, T., Kanba, S., and Asai, M. (2001). Elevated plasma nitrate levels in depressive states. *J. Affect. Disord.* 63: 221–224.
- Szyf, M., Weaver, I., and Meaney, M. (2007). Maternal care, the epigenome and phenotypic differences in behavior. *Reprod. Toxicol. Elmsford N* 24: 9–19.
- Takahashi, T., Kimoto, T., Tanabe, N., Hattori, T., Yasumatsu, N., and Kawato, S. (2002). Corticosterone acutely prolonged N-methyl-D-aspartate receptor-mediated Ca²⁺ elevation in cultured rat hippocampal neurons. *J. Neurochem.* 83: 1441–1451.
- Thompson Ray, M., Weickert, C.S., Wyatt, E., and Webster, M.J. (2011). Decreased BDNF, trkB-TK+ and GAD67 mRNA expression in the hippocampus of individuals with schizophrenia and mood disorders. *J. Psychiatry Neurosci.* JPN 36: 195–203.
- Tramontina, A.C., Nardin, P., Quincozes-Santos, A., Tortorelli, L., Wartchow, K.M., Andreazza, A.C., et al. (2012). High-glucose and S100B stimulate glutamate uptake in C6 glioma cells. *Neurochem. Res.* 37: 1399–1408.
- Treccani, G., Musazzi, L., Perego, C., Milanese, M., Nava, N., Bonifacino, T., et al. (2014). Stress and corticosterone increase the readily releasable pool of glutamate vesicles in synaptic terminals of prefrontal and frontal cortex. *Mol. Psychiatry* 19: 433–443.
- Ulrich-Lai, Y.M., and Herman, J.P. (2009). Neural regulation of endocrine and autonomic stress responses. *Nat. Rev. Neurosci.* 10: 397–409.
- Valadas, J.S., Batalha, V.L., Ferreira, D.G., Gomes, R., Coelho, J.E., Sebastião, A.M., et al. (2012). Neuroprotection afforded by adenosine A2A receptor blockade is modulated by corticotrophin-releasing factor (CRF) in glutamate injured cortical neurons. *J. Neurochem.* 123: 1030–1040.
- Vasudevan, D., Bovee, R.C., and Thomas, D.D. (2016). Nitric oxide, the new architect of epigenetic landscapes. *Nitric Oxide Biol. Chem.* 59: 54–62.
- Vialou, V., Feng, J., Robison, A.J., and Nestler, E.J. (2013). Epigenetic mechanisms of depression and antidepressant action. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 53: 59–87.
- Wang, C.-C., and Wang, S.-J. (2009). Modulation of presynaptic glucocorticoid receptors on glutamate release from rat hippocampal nerve terminals. *Synap. N. Y. N* 63: 745–751.
- Weber, M., and Schübeler, D. (2007). Genomic patterns of DNA methylation: targets and function of an epigenetic mark. *Curr. Opin. Cell Biol.* 19: 273–280.

- Wegener, G., Harvey, B.H., Bonefeld, B., Müller, H.K., Volke, V., Overstreet, D.H., et al. (2010). Increased stress-evoked nitric oxide signalling in the Flinders sensitive line (FSL) rat: a genetic animal model of depression. *Int. J. Neuropsychopharmacol.* 13: 461–473.
- Wegener, G., and Joca, S.R.L. (2016). Nitric Oxide Signaling in Depression and Antidepressant Action. In *Melatonin, Neuroprotective Agents and Antidepressant Therapy*, F. López-Muñoz, V. Srinivasan, D. de Berardis, C. Álamo, and T.A. Kato, eds. (New Delhi: Springer India), pp 765–792.
- Wegener, G., and Volke, V. (2010). Nitric Oxide Synthase Inhibitors as Antidepressants. *Pharm. Basel Switz.* 3: 273–299.
- Wegener, G., Volke, V., Harvey, B.H., and 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., and Rosenberg, R. (2000). Endogenous nitric oxide decreases hippocampal levels of serotonin and dopamine in vivo. *Br. J. Pharmacol.* 130: 575–580.
- Weiss, J.M., Goodman, P.A., Losito, B.G., Corrigan, S., Charry, J.M., and Bailey, W.H. (1981). Behavioral depression produced by an uncontrollable stressor: Relationship to norepinephrine, dopamine, and serotonin levels in various regions of rat brain. *Brain Res. Rev.* 3: 167–205.
- Wiborg, O. (2013). Chronic mild stress for modeling anhedonia. *Cell Tissue Res.* 354: 155–169.
- 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.
- Wittchen, H.U., Knäuper, B., and Kessler, R.C. (1994). Lifetime risk of depression. *Br. J. Psychiatry. Suppl.* 16–22.
- Wong, M.L., and Licinio, J. (2001). Research and treatment approaches to depression. *Nat. Rev. Neurosci.* 2: 343–351.
- Wong, V.W.C., and Lerner, E. (2015). Nitric oxide inhibition strategies. *Future Sci. OA* 1:.
- Xing, G., Chavko, M., Zhang, L.-X., Yang, S., and Post, R.M. (2002). Decreased calcium-dependent constitutive nitric oxide synthase (cNOS) activity in prefrontal cortex in schizophrenia and depression. *Schizophr. Res.* 58: 21–30.
- Xiong, Y., Fru, M.F., Yu, Y., Montani, J.-P., Ming, X.-F., and Yang, Z. (2014). Long term exposure to L-arginine accelerates endothelial cell senescence through arginase-II and S6K1 signaling. *Aging* 6: 369–379.
- Yan, H.-C., Cao, X., Das, M., Zhu, X.-H., and Gao, T.-M. (2010). Behavioral animal models of depression. *Neurosci. Bull.* 26: 327–337.
- Yazir, Y., Utkan, T., and Aricioglu, F. (2012). Inhibition of neuronal nitric oxide synthase and soluble guanylate cyclase prevents depression-like behaviour in rats exposed to chronic unpredictable mild stress. *Basic Clin. Pharmacol. Toxicol.* 111: 154–160.

Yetik-Anacak, G., and Catravas, J.D. (2006). Nitric oxide and the endothelium: history and impact on cardiovascular disease. *Vascul. Pharmacol.* 45: 268–276.

Yu, H., Wang, D.-D., Wang, Y., Liu, T., Lee, F.S., and Chen, Z.-Y. (2012). Variant brain-derived neurotrophic factor Val66Met polymorphism alters vulnerability to stress and response to antidepressants. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* 32: 4092–4101.

Zhang, J., Huang, X.-Y., Ye, M.-L., Luo, C.-X., Wu, H.-Y., Hu, Y., et al. (2010). Neuronal nitric oxide synthase alteration accounts for the role of 5-HT1A receptor in modulating anxiety-related behaviors. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* 30: 2433–2441.

Zheleznyakova, G.Y., Cao, H., and Schiöth, H.B. (2016). BDNF DNA methylation changes as a biomarker of psychiatric disorders: literature review and open access database analysis. *Behav. Brain Funct. BBF* 12: 17.

Zhou, Q.-G., Hu, Y., Hua, Y., Hu, M., Luo, C.-X., Han, X., et al. (2007). Neuronal nitric oxide synthase contributes to chronic stress-induced depression by suppressing hippocampal neurogenesis. *J. Neurochem.* 103: 1843–1854.

Zhu, X.J., Hua, Y., Jiang, J., Zhou, Q.G., Luo, C.X., Han, X., et al. (2006). Neuronal nitric oxide synthase-derived nitric oxide inhibits neurogenesis in the adult dentate gyrus by down-regulating cyclic AMP response element binding protein phosphorylation. *Neuroscience* 141: 827–836.

Zhu, X.Z., and Luo, L.G. (1992). Effect of nitroprusside (nitric oxide) on endogenous dopamine release from rat striatal slices. *J. Neurochem.* 59: 932–935.

Zimmermann, N., Zschocke, J., Perisic, T., Yu, S., Holsboer, F., and Rein, T. (2012). Antidepressants inhibit DNA methyltransferase 1 through reducing G9a levels. *Biochem. J.* 448: 93–102.

Anexo 1: Certificado de aprovação para uso de animais do presente projeto.

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto
COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

CERTIFICADO

Certificamos que o projeto intitulado “Avaliação do efeito dos inibidores da óxido nítrico sintase sobre a metilação do DNA e sobre a atividade e expressão das enzimas DNA metiltransferases no cérebro de ratos submetidos ao estresse”, protocolo nº 15.1.285.60.5, sob a responsabilidade da Profa. Dra. Sâmia Regiane Lourenço Joca, que envolve manutenção e utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem) para fins de pesquisa científica encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto (CEUA FCFRP) na reunião de 30/11/2015.

Vigência do Projeto	01/06/2015 a 31/07/2018	
Espécie/Linhagem	Rato heterogênico Wistar	Rato heterogênico Wistar
Nº de animais	204	208
Peso/Idade	270-300g/ 8 semanas	0-1 dia/ 7g
Sexo	Macho	Macho
Origem	Biotério Central da PUSP-RP	Biotério Central da PUSP-RP

Ribeirão Preto, 01 de dezembro de 2015.

Profa. Dra. Ana Patrícia Yatsuda Natsui
Presidente da CEUA-FCFRP