José Fernando Salvador Carrillo

**Suscetibilidade e resiliência aos efeitos da subjugação social
prolongada em camundongos machos adolescentes: estudo da
enzima neuronal de síntese do óxido nítrico (nNOS)**

Dissertação apresentada ao Programa de
Pós-graduação em Farmacologia do
Instituto de Ciências Biomédicas da
Universidade de São Paulo, para obtenção
do Título de Mestre em Ciências.

Área de concentração: Farmacologia

Orientadora: Profa Dra Silvana Chiavegatto

Versão original

São Paulo

2017

RESUMO

Carrillo JFS. Suscetibilidade e resiliência aos efeitos da subjugação social prolongada em camundongos machos adolescentes: estudo da enzima neuronal de síntese do óxido nítrico (nNOS). [dissertação (Mestrado em Farmacologia)]. São Paul: Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo; 2017.

O cérebro não atinge sua completa maturidade até a idade adulta, tornando os adolescentes especialmente vulneráveis aos efeitos do estresse. Nesta etapa da vida, o *bullying* é um fator de risco que pode levar ao desenvolvimento da depressão, no entanto, não está claro porque alguns indivíduos são mais suscetíveis que outros. O óxido nítrico (NO), uma importante molécula sinalizadora no organismo, é sintetizada principalmente pela enzima óxido nítrico sintase neuronal (nNOS) no sistema nervoso central. Estudos sugerem que o NO e a nNOS poderiam desempenhar um importante papel na fisiopatologia da depressão, no entanto, ainda não foram realizadas pesquisas sobre a participação da nNOS no fenômeno da resiliência e suscetibilidade à depressão no período da adolescência. Por tanto, o objetivo deste trabalho foi estudar os efeitos da subjugação social prolongada em camundongos machos adolescentes C57BL/6 resilientes e suscetíveis a este tipo de estresse sobre comportamentos emocionais, bem como sobre a expressão gênica, proteica e a atividade enzimática da nNOS em algumas regiões cerebrais. Nossos resultados mostraram que alguns animais expostos ao estresse social prolongado desenvolveram esquiva social (56,7%) no teste de interação social e anedonia (50%) no teste de preferência por sacarose. Estes animais foram denominados “suscetíveis”. No entanto, outra parcela de animais não mostraram estas alterações comportamentais e foram denominados “resilientes”. Nossas análises moleculares mostraram que somente os camundongos resilientes apresentaram uma diminuição na expressão proteica e gênica da nNOS no hipocampo (HC) e no córtex pré-frontal (CPF), áreas comumente relacionadas com a depressão. Os camundongos suscetíveis apresentaram valores semelhantes aos controle nessas áreas cerebrais. Curiosamente, o estriado dorsal (ED), área utilizada como controle negativo, apresentou alterações na expressão gênica, proteica e na atividade enzimática nos animais resilientes e suscetíveis. Adicionalmente, foram analisadas as concentrações séricas dos nitratos e nitritos sistêmicos (NOx). Os camundongos resilientes apresentaram maiores concentrações destes metabolitos quando comparado com os animais suscetíveis. Em conclusão, nossos dados mostram que o estresse social prolongado é capaz de induzir comportamentos anedônicos e de esquiva social em camundongos machos adolescentes. As análises moleculares indicam que a resiliência a este tipo de estresse está associada à diminuição gênica e proteica da nNOS no HC e no CPF e ao aumento dos níveis séricos dos NOx. Além disso, as alterações moleculares no ED estariam sugerindo um papel para essa área na resposta do organismo frente ao estresse social.

Palavras-chaves: Estresse social. Resiliência. nNOS. Adolescência. Depressão.

ABSTRACT

Carrillo JFS. Susceptibility and resilience to the effects of prolonged social defeat in adolescent male mice: study of enzyme neuronal nitric oxide synthase. [Masters thesis (Pharmacology)]. São Paulo: Instituto de Ciências Biomédicas. Universidade de São Paulo; 2017.

The brain does not reach full maturity until adulthood, making adolescents especially vulnerable to the effects of stress. At this period of life, bullying is a risk factor for developing depression; however, it is unclear why some individuals are more susceptible than others. Nitric oxide (NO), an important neurotransmitter in the organism, is mainly synthesized by the neuronal NO synthase (nNOS) in the central nervous system. Several studies suggest that NO and nNOS can play an important role in the pathophysiology of depression, nevertheless, no research has been done yet on the participation of nNOS in the phenomenon of resilience and susceptibility to depression during adolescence. Therefore, the objective of this work was to study the effects of prolonged social defeat in adolescent male mice C57BL/6 resilient and susceptible to this type of stress on emotional behaviors, as well as on the gene expression, protein and enzymatic activity of nNOS in some brain regions. Our results showed that some animals exposed to prolonged social stress developed social approach-avoidance (56.7%) in social interaction test and anhedonia (50%) in sucrose preference test. These animals were called “susceptible”. However, remaining animals did not show these behavioral alterations and they were classified as “resilient”. Our molecular tests showed that resilient animals had a reduction nNOS gene and protein expression in hippocampus (HC) and prefrontal cortex (PFC), areas commonly related with depression. Susceptible mice displayed similar data to controls in these brain areas. Interestingly, dorsal striatum (DS), brain area used as negative control, showed alterations in gene and protein expression and enzymatic activity in resilient and susceptible mice. Additionally, serum nitrate and nitrite (NOx) concentration were evaluated. Resilient mice displayed increase of systemic NOx levels when compared with susceptible animals. Concluding, our data show that prolonged social defeat stress is capable of inducing anhedonic and social approach-avoidance behaviors in adolescent male mice. Molecular tests suggest that resilience to this type of stress is associated with reduction of nNOS gene and protein expression in HC and PFC and with increase of serum NOx levels. Furthermore, molecular alterations in DS would be suggesting a role for this area in organism response to social stress.

Keywords: Social stress. Resilience. nNOS. Adolescence. Depression.

1 INTRODUÇÃO

1.1 Resiliência e Suscetibilidade ao Estresse

O “estresse” foi descrito inicialmente por Selye (1936) para descrever uma ameaça real ou potencial à homeostasia. Este estímulo pode provocar diferentes reações nos organismos dependendo da intensidade e do tempo de exposição. O estresse pode gerar respostas fisiológicas adaptativas para restaurar a homeostasia interna. No entanto, quando o estresse não pode ser controlado ou quando o organismo tem uma prolongada exposição a este (estresse crônico), pode levar ao desenvolvimento de transtornos psiquiátricos, incluindo depressão maior (DM), transtornos de pânico ou transtornos de estresse pós-traumático (TEPT). Porém, nem todos os organismos expostos ao estresse crônico ou eventos estressantes fortes desenvolvem transtornos psiquiátricos, demonstrando a existência de uma grande variabilidade individual na vulnerabilidade aos efeitos negativos do estresse (Cooper et al., 2015). Thomas e colaboradores (2010) reportaram que aproximadamente 9 a 31% dos soldados expostos a eventos traumáticos desenvolveram DM ou TEPT. Similarmente, outro estudo indica que 20 a 25% das pessoas que experimentaram eventos estressantes durante a vida desenvolveram depressão (Cohen et al., 2007).

Este fenômeno de resiliência ou suscetibilidade frente ao estresse no desenvolvimento de transtornos psiquiátricos tem sido considerado como a “pedra angular” da psiquiatria (Karatsoreos, McEwen, 2011). O termo “resiliência” pode ser definido como “a capacidade de um indivíduo em lidar com o estresse e a adversidade para evitar as consequências fisiológicas e psicológicas negativas que possam prejudicar o bem-estar físico ou psicológico” (Luthar et al., 2006). A “suscetibilidade” é “o estado de sensibilidade a um estressor, recrutando mecanismos de defesa inadequados ou ineficazes, que implica também em uma ausência de resiliência, muitas vezes necessitando de intervenção externa” (Karatsoreos, McEwen, 2011).

A resiliência tem sido considerada como um processo ativo com o envolvimento de mecanismos moleculares, hormonais, neurais e comportamentais que evitam o desenvolvimento de doenças ou transtornos psiquiátricos (Zannas et al., 2014). A literatura científica sugere que a resiliência é mediada não somente pela ausência das alterações moleculares encontradas nos organismos suscetíveis, mas também pela presença de adaptações moleculares que ocorrem no organismo resiliente que ajuda a promover a manutenção dos comportamentos emocionais normais (Russo et al., 2012). Portanto, diversas vias moleculares têm sido implicadas na resiliência e suscetibilidade frente ao estresse crônico.

Berton e colaboradores (2006) demonstraram que a redução dos níveis do Fator Neurotrófico Derivado do Cérebro (BDNF, do inglês Brain-Derived Neurotrophic Factor) na área tegmental ventral (ATV), via silenciamento gênico do BDNF localizado, proporcionou resiliência em camundongos expostos ao estresse social frente ao desenvolvimento de comportamentos tipo-depressivos. Adicionalmente, um estudo relaciona o aumento do BDNF no *nucleus accumbens* com suscetibilidade e sua diminuição com resiliência em camundongos expostos ao estresse social prolongado (Krishnan et al., 2007). Sistemas glutamatérgicos, serotoninérgicos e GABAérgicos também poderiam estar envolvidos neste fenômeno. Animais resilientes e suscetíveis ao estresse crônico apresentaram diferença significativa na expressão do receptor AMPA no hipocampo dorsal (Schmidt et al., 2010). Camundongos knockout dos transportadores da serotonina (5-HTT) expostos ao estresse por derrota social apresentaram um aumento de suscetibilidade à esquivas sociais (Bartolomucci et al., 2010). Do mesmo modo, a inibição da via GABAérgica especificamente no córtex pré-frontal (CPF) também aumentou a suscetibilidade ao estresse por derrota social em camundongos (Veeraiah et al., 2014). Adicionalmente a estas vias, o sistema nitrérgico também poderia participar da resiliência e suscetibilidade ao desenvolvimento de transtornos psiquiátricos. Alguns estudos sugerem que alterações do gene *NOS1* (óxido nítrico sintase neuronal) poderiam estar associadas à vulnerabilidade a esquizofrenia ou transtorno bipolar (Freudenberg et al., 2015).

Atualmente muitos esforços têm sido direcionados às investigações acerca dos mecanismos neurobiológicos envolvidos na suscetibilidade e resiliência à depressão. Isto justifica-se por ser um dos transtornos psiquiátricos mais importantes, causando grandes gastos financeiros na saúde pública, e por ser a segunda causa de incapacidade em nível mundial (Reddy, 2010). Entre os principais fatores estudados neste contexto, estão os receptores 5-HT_{1A} e os polimorfismos do gene que codifica o 5-HTT (Southwick et al., 2005). No entanto, os mecanismos moleculares implicados na resiliência e na suscetibilidade à depressão ainda permanecem desconhecidos.

1.2 Depressão e o estresse

A DM consiste em um distúrbio de humor persistente, com um mínimo de duas semanas de evolução, caracterizada por humor depressivo (sentimento de tristeza, desesperança, vazio e desamparo) e/ou perda de interesse ou prazer (anedonia) como principais sintomas. Além disso, o paciente pode manifestar culpa excessiva, alterações do peso e/ou sono e fobia social (Potter et al., 1991). A depressão é um transtorno que afeta significativamente pessoas de todas as comunidades no mundo. Segundo a Organização Mundial da Saúde (OMS), estima-se que a depressão atinja 350 milhões de pessoas.

Infelizmente, apesar da prevalência deste transtorno de humor, grande parte da etiologia e, por conseguinte, das medidas preventivas e estratégias eficientes para controlar seus sintomas ainda permanecem incertas (Hollis, Kabbaj, 2014). As causas da depressão podem ser explicadas pela interação de fatores genéticos e ambientais. Existem evidências de que os fatores genéticos desempenhem um papel significativo na predisposição de um organismo para o desenvolvimento da depressão. No entanto, não existe um gene único que seja responsável, mas uma combinação de genes. O risco genético para desenvolver depressão é cerca de 40% se os pais biológicos forem diagnosticados com este transtorno, os outros 60% são decorrentes de fatores do próprio ambiente, como eventos estressantes significativos (Lohoff, 2010).

O estresse é um dos principais fatores ambientais que predispõe um indivíduo a desenvolver depressão. Como descrito anteriormente, em 60% dos casos, os episódios depressivos são precedidos de eventos estressantes fortes, principalmente de origem psicossocial. Além disso, a importante influência dos fatores genéticos no desenvolvimento da depressão poderia ter um papel importante na vulnerabilidade ao estresse (Joca et al., 2003). A principal resposta fisiológica ao estresse é a ativação do eixo hipotálamo-pituitária-adrenal (eixo HPA). Este circuito é ativado imediatamente após um estresse agudo. Neurônios no núcleo paraventricular do hipotálamo (PVN) liberam o hormônio liberador de corticotrofina (CRF) estimulando a produção do hormônio adrenocorticotrófico (ACTH) pelas células da adenohipófise. O ACTH é transportado através da corrente sanguínea e vai estimular a liberação de glicocorticoides (cortisol em humanos e corticosterona em roedores) no córtex das glândulas adrenais. O cortisol liberado age no próprio eixo HPA, atuando como controle de retroalimentação negativa, limitando e controlando a resposta ao estresse (Chrousos, Gold, 1992).

O controle do eixo HPA parece estar alterado em pacientes com depressão. Muitos estudos têm reportado aumento da atividade do eixo, como por exemplo, níveis elevados de cortisol plasmático e salivar e a inadequada resposta ao teste de supressão com o corticosteróide sintético dexametasona (Baungartner et al., 1985). A exposição contínua ao estresse produz efeitos deletérios no organismo, especialmente no cérebro, e parece ser mediado pelos glicocorticoides. Os receptores dos glicocorticoides se encontram distribuídos em importantes regiões cerebrais, como no hipocampo (HC), CPF e amígdala (região límbica). Estas regiões cerebrais estão muito relacionadas à recepção e elaboração de estímulos emocionais e são especialmente vulneráveis ao estresse. Além disso, também estão envolvidas na regulação da retroalimentação negativa do eixo HPA (Swaab et al., 2005).

Estudos relatam que níveis elevados de cortisol podem produzir atrofia hipocampal (Lupien et al., 1998) e se relacionam à diminuição do volume hipocampal e aos déficits cognitivos observados em pacientes deprimidos (Sheline et al., 2003). Em estudos *post-mortem* foram observados diminuição na quantidade de neurônios e atrofia celular nas regiões dorsolateral e orbitofrontal do CPF (Rajkowska, 2000). Por outro lado, a amígdala

apresenta atividade e tamanho aumentados (Maletic, Raison, 2009), e tende a decrescer, especialmente em mulheres, com a cronicidade (Lorenzetti et al., 2009).

Considerando a importância de cada uma dessas regiões cerebrais na neurobiologia da depressão e sua relação com o estresse, o estudo dessas áreas torna-se bastante interessante. No entanto, a maioria de trabalhos foram realizados em humanos e roedores na idade adulta, onde estas regiões já estão maduras e preparadas para responder aos estímulos estressantes. Durante a adolescência, período onde o estresse é um dos fatores mais importantes no desenvolvimento da depressão (Fiske et al., 2009), estas áreas cerebrais ainda estão em processo de maturação e os circuitos neurais que irão regular o estresse ainda estão se estabelecendo (Romeo, McEwen 2006).

1.3 Estresse na adolescência e Depressão.

A adolescência é um período de grande importância no desenvolvimento de um indivíduo, marcada por mudanças no comportamento social, cognitivo e emocional, além das mudanças fisiológicas. Esta etapa é também caracterizada pelo aparecimento de transtornos psiquiátricos, tais como: ansiedade, psicoses, transtornos alimentares, depressão e abuso de drogas (Paus et al., 2008). Kessler e colaboradores (2005) demonstraram que o pico de idade da maioria dos transtornos psiquiátricos é de 14 anos, inclusive para os transtornos de humor.

Depressão em adolescentes é uma das principais causas de suicídio, sendo este a segunda ou terceira causa de morte nesta fase etária (Windfuhr et al., 2008). Segundo o Centro de Estatística e Qualidade da Saúde Comportamental (traduzido de *Center for Behavioral Health Statistics and Quality*) (2016), 12,5% dos adolescentes entre 12 a 17 anos sofrem um episódio depressivo por ano. Muitos fatores poderiam explicar esta elevada taxa de episódios depressivos, já que durante esta etapa o cérebro é particularmente vulnerável ao estresse (Dahl, 2004).

Estudos feitos em ratos adolescentes demonstram uma alta resposta ao estresse quando comparados com adultos (McCormick et al., 2010). Por exemplo, ratos adolescentes expostos ao estresse crônico apresentam o dobro das concentrações de corticosterona que adultos nas mesmas condições (Gomez et al., 2002). No entanto, não está claro porque o eixo HPA apresenta uma alta reatividade durante a adolescência. Possivelmente, as regiões límbicas (HC, CPF, amígdala), que ainda estão amadurecendo durante a adolescência, não consigam modular a reatividade hormonal ao estresse (Ulrich-Lai, Herman, 2009).

Os estressores de natureza social são muito frequentes na adolescência, sendo o *bullying* um dos mais comuns (Bandeira, Hutz, 2012). Aproximadamente 10-30% dos adolescentes ao redor do mundo sofrem bullying na escolas, sendo estes mais meninos do que meninas. Depressão, ansiedade e sintomas psicossomáticos são observados frequentemente entre as vítimas de *bullying*, colocando-o como um dos principais fatores de risco para o desenvolvimento de transtornos mentais nos adolescentes (Kaltiala-Heino, Fröjd, 2011). No entanto, como descrito anteriormente, nem todos os adolescentes que sofrem bullying desenvolvem depressão, evidenciando que alguns sejam resilientes e outros suscetíveis a este tipo de estresse psicossocial. Embora existam estudos sobre esse fenômeno, e também sobre a neurobiologia da depressão, o número de pesquisas direcionadas ao período da adolescência é menor quando comparado com outras idades. Identificar os mecanismos envolvidos na resposta ao estresse psicossocial prolongado na adolescência torna-se essencial.

1.4 Óxido Nítrico Sintase Neuronal e a Neurobiologia da Depressão

Os mecanismos de ação da grande maioria dos fármacos antidepressivos se fundamentam na teoria monoaminérgica da depressão. Essa teoria propõe que a depressão seja consequência de uma menor disponibilidade de aminas biogênicas cerebrais, em particular de serotonina, noradrenalina e possivelmente também dopamina. Neste sentido, os atuais fármacos antidepressivos aumentam a disponibilidade desses neurotransmissores na fenda sináptica, seja pela inibição (seletiva ou não) de suas recaptações, ou, pela inibição da enzima responsável por sua degradação (inibidores da

monoaminoxidase) (Stahl, 1997). No entanto, apesar de ser amplamente estudada, essa teoria não consegue explicar alguns fatos importantes na clínica, como a taxa de resistência de 30% dos pacientes ao tratamento, ou ainda, a necessidade de se esperar pelo menos duas semanas para o início da reversão dos sintomas, uma vez que os fármacos antidepressivos aumentam as monoaminas nas fendas sinápticas nas primeiras doses (Vismari et al., 2008).

Assim, outras teorias têm sido formuladas para tentar explicar a neurobiologia da depressão, tais como: a teoria neurotrófica, que descreve a participação do BDNF na neuroplasticidade; a teoria da neurogênese; e também da neuroinflamação. Entre essas, ganha destaque a participação glutamatérgica, onde a óxido nítrico sintase neuronal (nNOS), enzima acoplada ao receptor glutamatérgico do tipo N-metil D-Aspartato (NMDA), teria um papel importante.

O glutamato, principal neurotransmissor excitatório do sistema nervoso central (SNC), tem sido de particular interesse no estudo da neurobiologia da depressão desde o relato que antagonistas do receptor NMDA produzem um efeito tipo-antidepressivo em camundongos no teste de nado forçado e de desamparo aprendido (Petrie et al., 2000). A cetamina, inibidor não-competitivo dos receptores NMDA produz um rápido efeito antidepressivo em doses sub-anestésicas, embora com efeitos secundários que dificultem seu uso clínico (Sen, Sanacora, 2008; Hashimoto, 2009). Estas observações sugeriram que a manipulação da neurotransmissão glutamatérgica, através do receptor NMDA, exerceria de alguma forma um efeito antidepressivo. No entanto, a maior parte dos antagonistas glutamatérgicos atuais possuem efeitos adversos intoleráveis, portanto, é necessário estudar outras moléculas que participem da via glutamato-receptor NMDA como alvos para o desenvolvimento de futuras drogas e para o entendimento dos mecanismos moleculares da fisiopatologia da depressão. Uma das moléculas de grande interesse é a nNOS, principal enzima responsável por produzir o óxido nítrico (NO) no SNC.

1.4.1 A nNOS e o sistema nervoso central

O NO é sintetizado com o auxílio de um grupo de enzimas do tipo sintases, as óxido nítrico sintases (NOS). Existem 3 isoformas de NOS: a NOS neuronal (nNOS), a NOS endotelial (eNOS), e a NOS induzível (iNOS). Porém, a isoforma nNOS foi encontrada em maiores concentrações em áreas associadas ao estresse e depressão, como o HC, hipotálamo, núcleo dorsal da rafe, entre outras (McLeod et al., 2001).

A nNOS é uma enzima dependente de cálcio, expressa em mamíferos, que produz NO e L-citrulina a partir de L-arginina e oxigênio (Mayer et al., 1991). O NO é um importante neurotransmissor no SNC, que diferentemente de outros neurotransmissores, é um gás e pode atravessar livremente as membranas plasmáticas, possuindo uma vida média entre 3 a 6 s (Ignarro, 1989). A principal via de sinalização celular do NO é através da ativação da enzima guanilato ciclase solúvel (GCs), para produzir a guanosina monofosfato cíclica (GMPc) e a fosforilação de proteínas intracelulares. O NO também tem sido relacionado com o estresse oxidativo, onde a formação de espécies reativas de nitrogênio podem alterar a função normal de proteínas, lipídeos e o DNA (Guix et al., 2005).

A nNOS se encontra fisicamente acoplada ao receptor NMDA através da proteína de densidade pós-sináptica 95 (PSD-95). Especificamente, o domínio PDZ da nNOS interage com a PSD-95 para poder ancorar-se ao receptor NMDA, permitindo assim, reagir ao influxo de Ca^{++} gerado pela interação do glutamato ao receptor mencionado (Freuderberg et al., 2015) (**Fig. 1**).

Figura 1 – Localização da enzima nNOS nos neurônios do sistema nervoso central

Enzima nNOS ancorada ao receptor NMDA através da PSD-95. A atividade da nNOS dependerá do influxo de Ca^{++} através do receptor NMDA (Adaptado de Freuderberg, 2015).

No entanto, outras isoformas da própria nNOS não estão necessariamente acopladas ao receptor NMDA. Estas isoformas são geradas por *splicings* alternativos no RNAm as quais carecem do exon 2, porção responsável pela transcrição do domínio PDZ (Wang et al., 1999). Entre as principais isoformas da nNOS, as mais estudadas são a β nNOS e γ nNOS (**Fig. 2**).

Figura 2 – Principais isoformas da nNOS.

As principais isoformas da nNOS são: α, β e γ. Somente a isoforma αnNOS apresenta o domínio PDZ que vai permitir sua ancoragem ao receptor NMDA através da PSD-95 (Fonte: Guix et al., 2005).

Ensaaios *in vitro* mostraram que a γnNOS carece de atividade catalítica significativa, porém, a βnNOS teria uma atividade comparável à isoforma acoplada ao receptor NMDA (αnNOS) (Brenman et al., 1996). No entanto, estudos *in vivo* sugerem que a isoforma αnNOS seria a responsável pela maior parte da atividade catalítica no cérebro. Camundongos knockouts adultos para αnNOS mostraram uma redução de 95% da atividade catalítica no cérebro (Huang et al., 1993), no entanto, outro estudo demonstrou que estes animais apresentam quantidades consideráveis de neurônios marcados para βnNOS e γnNOS no estriado e no córtex (Eliasson et al, 1997).

1.4.2 A nNOS e a fisiopatologia da depressão

A nNOS é um alvo de interesse no nosso laboratório por ser uma proteína ligada à regulação de comportamentos emocionais. Comportamentos como agressividade e impulsividade (Chiavegatto et al., 2001), comportamentos exploratórios e comportamentos tipo-depressivos (Wultsch et al., 2007) têm sido influenciados pela manipulação genética da nNOS. Portanto, nossa hipótese é que a nNOS possa estar envolvida na fisiopatologia dos transtornos de humor.

Estudos sugerem uma possível relação significativa entre NO, nNOS e a depressão. Jefferys e colegas (1996) reportaram que a inibição da NOS induz comportamentos tipo-antidepressivos no teste de nado forçado (NF) em ratos, e este efeito seria revertido pelo pré-tratamento de L-arginina, precursor do NO. Outro estudo, utilizando 7-nitroindazol (7-NI, um inibidor seletivo para nNOS) também verificou efeito antidepressivo em camundongos, refletido pela diminuição da imobilidade no teste de NF (Yildiz et al., 2000). Continuando nessa linha de abordagem, a administração intrahipocampal de 7-NI também gerou um efeito antidepressivo no teste de NF, prevenido também pela administração prévia de L-arginina (Joca, Guimarães, 2006).

Estudos clínicos reforçam o possível envolvimento do NO e nNOS na depressão. Pacientes com DM ou transtorno bipolar apresentaram alta imunoreatividade para nNOS no CA1 e algumas regiões do HC quando comparados com o grupo controle (Oliveira et al., 2008). Além disso, a concentração de nitrato plasmático, um indicador da produção periférica de NO, foi encontrada proeminentemente maior em pacientes com depressão (Suzuki et al., 2001).

Trabalhos utilizando o estresse crônico em roedores têm demonstrado a relação entre a nNOS, o estresse e o desenvolvimento de comportamentos tipo depressivos. Camundongos adultos expostos ao estresse crônico moderado (ECM) apresentaram aumento da expressão gênica da nNOS no HC. Adicionalmente, os animais desenvolveram comportamentos tipo-depressivos e redução na neurogênese no HC. Todas estas alterações foram revertidas pela administração de inibidores da nNOS ou prevenidas pelo silenciamento gênico da nNOS (camundongos knockout nNOS^{-/-}) (Zhou et al., 2007). Outro trabalho em camundongos adultos mostra que o ECM, ou a exposição à glicocorticoides, aumenta a expressão gênica da nNOS no HC através dos receptores mineralocorticoides. Adicionalmente, os autores relataram que a nNOS é necessária para o desenvolvimento de comportamentos tipo-depressivos induzidos pela corticosterona (Zhou et al., 2011).

De acordo com os dados apresentados, o NO e a nNOS parecem desempenhar um importante papel na fisiopatologia da depressão, no entanto ainda não foram realizadas pesquisas sobre a participação da nNOS no fenômeno da resiliência e suscetibilidade à depressão no período da adolescência.

1.5 Modelo de subjugação social e o estudo da resiliência e suscetibilidade à depressão

Historicamente, ratos e camundongos têm sido alocados a dois grupos: “controle” e “experimental” e qualquer mudança ao nível molecular, comportamental e fisiológico no grupo “estressado” iria ser atribuída aos efeitos do estresse (Krishnan, 2014). No entanto, como comentado anteriormente, não necessariamente todos os organismos expostos ao estresse desenvolvem as mesmas alterações comportamentais e moleculares.

É por esta razão que tem ressurgido um interesse na utilização do modelo de subjugação social (ou derrota social, do inglês *social defeat*) (Kudryavtseva et al., 1991). Este modelo tem demonstrado validade etológica, preditiva e de face e utiliza o conflito social entre dois membros da mesma espécie para gerar estresse físico e emocional (Hollis, Kabbaj, 2014). Após a exposição a esse estresse, alguns animais exibem comportamentos tipo-depressivos como alterações no comportamento social, anedonia, alterações de peso corporal, entre outros (Hammels et al., 2015). No entanto, outra parcela de animais não mostram estas alterações comportamentais. Krishnan e colegas (2007) propuseram a divisão dos animais que passaram pelo estresse de subjugação social em dois grupos: suscetíveis e resilientes, baseados em suas respostas frente ao teste de interação social (IS). Segundo estes autores, os animais suscetíveis também apresentaram diminuição da preferência por sacarose (PPS, comportamento anedônico), diminuição do peso corporal, enquanto que os animais resilientes não apresentaram nenhuma destas alterações.

Na atualidade, o modelo de subjugação social é utilizado para estudar as respostas individuais ao estresse psicossocial prolongado (Cao et al, 2010; Berube et al., 2013; Isingrini 2016). A identificação de mecanismos moleculares envolvidos na resiliência ao estresse psicossocial poder gerar novas oportunidades para o desenvolvimento de moléculas antidepressivas (Krishnnan et al., 2007).

Para o presente trabalho, selecionamos o modelo de subjugação prolongada em camundongos machos adolescentes, pois este consegue modelar, de maneira mais etológica, os aspectos relacionados ao abuso físico e a subjugação social observados em situações de *bullying* em jovens. Vale ressaltar que a adolescência é uma etapa vulnerável ao estresse e, mesmo assim, tem sido menos estudada quando comparada a

outras etapas da vida. Para o estudo dos comportamentos tipo-depressivos foram analisadas a anedonia, principal característica da depressão, e a esquivas social, característica ainda mais relevante durante as fases iniciais da vida. Adicionalmente, o fenômeno da resiliência e suscetibilidade ao estresse psicossocial foi estudado através de análises bioquímico-moleculares da enzima nNOS no CPF e HC, por serem algumas das áreas relacionadas à depressão, e no estriado dorsal (ED), como uma área controle negativo.

4 CONCLUSÃO

O modelo de subjugação social em camundongos machos adolescentes induz a comportamentos anedônicos e de esquiva social em uma população suscetível. Estes comportamentos não estão necessariamente associados, existindo, portanto, suscetibilidades diferenciais para ambas as respostas. Nossos achados suportam a existência de vias neurais distintas envolvidas na expressão da anedonia e da esquiva social, como pode ser observado clinicamente em humanos.

A resiliência ao estresse psicossocial nos camundongos adolescentes está associada à diminuição da expressão gênica e proteica da isoforma α NOS no HC e no CPF. Estes resultados inéditos contribuem para o entendimento dos mecanismos de adaptação dos organismos, no período da adolescência, frente ao estresse psicossocial. A futura investigação detalhada dos mecanismos moleculares prévios e posteriores à redução dos níveis da isoforma α NOS cerebrais na resposta adaptativa positiva, frente ao estresse psicossocial, deverá contribuir com alvos moleculares novos para o desenvolvimento de terapias gênicas preventivas, ou farmacológicas mais específicas para pacientes com depressão.

As concentrações dos metabólitos séricos suportam uma participação diferencial do NO no fenômeno de resiliência/suscetibilidade frente ao estresse social. O aumento destes metabólitos circulantes nos animais resilientes, frente aos animais suscetíveis, permite diferenciar os indivíduos que não desenvolvem a anedonia, ou seja, indivíduos que possuem mecanismos ativos para enfrentar o estresse psicossocial prolongado. A sugestão da quantificação dos NOx, como um biomarcador periférico é uma importante contribuição na área.

O ED, uma área pouco estudada no contexto da depressão, apresentou alterações moleculares, tanto nos animais resilientes, como nos suscetíveis, suportando o envolvimento desta área durante o estresse psicossocial prolongado, de forma independente aos mecanismos associados à resiliência/suscetibilidade à anedonia.

REFERÊNCIAS*

Alves dos Santos L. Suscetibilidade e resiliência aos efeitos da subjugação social prolongada em camundongos machos adolescentes: estudo do BDNF cerebral. [dissertação (Mestrado em Farmacologia)]. São Paulo: Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo; 2014.

Angold A, Costello EJ, Erkanli A. Comorbidity. *Journal of Child Psychology, Psychiatry, and Allied Disciplines*. 1999; 40 (1):57–87.

Antonini A, Moresco RM, Gobbo C, De Notaris R, Panzacchi A, Barone P, Calzetti S, Negrotti A, Pezzoli G, Fazio F. The status of dopamine nerve terminals in Parkinson's disease and essential tremor: a PET study with the tracer [11-C]FE-CIT. *Neurological Science* . 2001; 22 (1):47–8.

Arora DK, Cosgrave AS, Howard MR, Bubb V, Quinn JP, Thippeswamy T. Evidence of postnatal neurogenesis in dorsal root ganglion: role of nitric oxide and neuronal restrictive silencer transcription factor. *Journal of Molecular Neuroscience*. 2007; 31 (2):97-107.

Axelson DA, Birmaher B. Relation between anxiety and depressive disorders in childhood and adolescence. *Depression and Anxiety*. 2001; 14 (1):67–78.

Balleine BW, Delgado MR, Hikosaka O. The Role of the Dorsal Striatum in Reward and Decision-Making. *Journal of Neuroscience*. 2007; 27 (31):8161-5.

Bandeira CM, Hutz CS. Bullying: prevalência, implicações e diferenças entre os gêneros. *Psicologia Escolar e Educacional*. 2012; 16 (1):35-44.

Bartolomucci A, Carola V, Pascucci T, Puglisi-Allegra S, Cabib S, Lesch K.-P, Parmigiani S, Palanza P, Gross C, 2010. Increased vulnerability to psychosocial stress in heterozygous serotonin transporter knockout mice. *Disease Models and Mechanisms*. 2013; (3):459-70.

Baungartner A, Graf KJ, Kurten I. The dexamethasone suppression test in depression in schizophrenia, and during emotional stress. *Biological Psychiatry*. 1985; 20 (6):675-9.

Berridge KC, Aldridge JW. Super-stereotypy I: enhancement of a complex movement sequence by systemic dopamine D1 agonists. *Synapse*. 2000; 37 (3):194-204.

Berton O, McClung CA, Dileone RJ, Krishnan V, Renthal W, Russo SJ, Graham D, Tsankova NM, Bolanos CA, Rios M, Monteggia LM, Self DW, Nestler EJ. Essential role of BDNF in the mesolimbic dopamine pathway in social defeat stress. *Science*. 2006; 311 (5762):864-8.

* De acordo com:

International Committee of Medical Journal Editors. [Internet]. Uniform requirements for manuscripts submitted to Biomedical Journal: sample references. [updated 2011 Jul 15]. Available from: <http://www.icmje.org>

Berube P, Laforest S, Bhatnagar S, Drolet G. Enkephalin and dynorphin mRNA expression are associated with resilience or vulnerability to chronic social defeat stress. *Physiology Behavior*. 2013; 122:237–45.

Blackshaw S, Eliasson MJ, Sawa A, Watkins CC, Krug D, Gupta A, Arai T, Ferrante RJ, Snyder SH. Species, strain and developmental variations in hippocampal neuronal and endothelial nitric oxide synthase clarify discrepancies in nitric oxide-dependent synaptic plasticity. *Neuroscience*. 2003; 119(4):979-90.

Bredt DS, Snyder SH. Isolation of nitric oxide synthetase, a calmodulin-requiring enzyme. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1990; 87(2):682-5.

Brenman JE, Chao DS, Gee SH, McGee AW, Craven SE, Santillano DR, Wu Z, Huang F, Xia H, Peters MF, Froehner SC, Bredt DS. Interaction of nitric oxide synthase with the post synaptic density protein PSD-95 and alpha1-syntrophin mediated by PDZ domain. *Cell*. 1996; 84 (5):757-67.

Brown SM, Henning S, Wellman CL. Mild, short-term stress alters dendritic morphology in rat medial prefrontal cortex. *Cerebral Cortex*. 2005; 15 (11):1714-22.

Canossa M, Giordano E, Cappello S, Guarnieri C, Ferri S. Nitric oxide down-regulates brain-derived neurotrophic secretion in cultured hippocampal neurons. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2002; 99 (5):3282-7.

Cao JL, Covington 3rd HE, Friedman AK, Wilkinson MB, Walsh JJ, Cooper DC, Han MH. Mesolimbic dopamine neurons in the brain reward circuit mediate susceptibility to social defeat and antidepressant action. 2010. *Journal of Neuroscience*. 2010; 30 (49):16453-8.

Center for Behavioral Health Statistics and Quality. Key substance use and mental health indicators in the United States: Results from the 2015 National Survey on Drug Use and Health (HHS Publication No. SMA 16-4984, NSDUH Series H-51). <http://www.samhsa.gov/data/>

Chen HJ, Spiers JG, Sernia C, Lavidis NA. Response of the nitroergic system to activation of the neuroendocrine stress axis. *Frontiers in Neuroscience*. 2015; 9:3.

Chiavegatto S, Dawson VL, Mamounas LA, Koliatsos VE, Dawson TM, Nelson RJ. Brain serotonin dysfunction accounts for aggression in male mice lacking neuronal nitric oxide synthase. *PNAS*. 2001; 98 (3):1277-81.

Chiavegatto S, Izidio GS, Mendes-Lana A, Aneas I, Freitas TA, Torráo AS, Conceição IM, Britto LR, Ramos A. Expression of alpha-synuclein is increased in the hippocampus of rats with levels of innate anxiety. *Molecular Psychiatry*. 2009; 14 (9):894-905.

Chiavegatto S, Sauce B, Ambar G, Cheverud JM, Peripato AC. Hypothalamic expression of Peg3 gene is associated with maternal care differences between SM/J and LG/J mouse strains. 2012; 2 (4):365-76.

Chiavegatto S, Scavone C; Canteras NS. Nitric oxide synthase activity in the dorsal periaqueductal gray of rats expressing innate fear responses. Neuroreport. 1998; 9 (4):571-6.

Chiavegatto S. Metodologia em Modelos Animais. In: Miguel EC; Gentil V; Gattaz WF. (Org.). Clínica Psiquiátrica. 1 ed. Barueri, SP: Manole. 2011; 2:2080-8

Chrapko W, Jurasz P, Radomski MW, Archer SL, Newman SC, Baker G, Lara N, Le Mellédo JM. Alteration of decreased plasma NO metabolites and platelet NO synthase activity by paroxetine in depressed patients. Neuropsychopharmacology official publication of the American College of Neuropsychopharmacology. 2006; 31 (6):1286-93.

Chrousos GP, Gold PW. The concepts of stress and stress system disorders: Overview of physical and behavioral homeostasis. Journal of the American Medical Association. 1992; 267 (9):1244–52.

Coers W, Timens W, Kempinga C, Klok PA, Moshage H. Specificity of Antibodies to Nitric Oxide Synthase Isoforms in Human, Guinea Pig, Rat, and Mouse Tissues. Journal of Histochemistry & Cytochemistry. 1998; 46 (12):1385-92.

Cohen S, Janicki-Deverts D, Miller GE. Psychological Stress and Disease. Journal of the American Medical Association. 2007; 298(14):1685-7.

Colaço AL. Padronização e expressão da proteína inibidora da oxido nítrico sintase neuronal (PIN) em tecidos de ratos espontaneamente hipertensos e de ratos desnutridos intrauterinamente. [dissertação (Mestrado em Farmacologia)]. São Paulo: Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo; 2005.

Cooper MA, Clinard CT, Morrison KE. Neurobiological mechanisms supporting experience-dependent resistance to social stress. Neuroscience. 2015; Apr 16; 291:1-14.

Czeh B, Muller-Keuker JI, Rygula R, Abumaria N, Hiemke C. Chronic social stress inhibits cell proliferation in the adult medial prefrontal cortex: hemispheric asymmetry and reversal by fluoxetine treatment. Neuropsychopharmacology. 2007; 32 (7):1490-503.

Dahl RE. Adolescent brain development: a period of vulnerabilities and opportunities. Annals of the New York Academy of Sciences. 2004; (1021):1-22.

Dalle-Donne I, Scaloni A, Giustarini D, Cavarra E, Tell G, Lungarella G, Colombo R, Rossi R, Milzani A. Proteins as biomarkers of oxidative/nitrosative stress in diseases: The contribution of redox proteomics. Mass Spectrometry Review. 2005; 24 (1):55–99.

Desbonnet L, O'Tuathaigh C, Clarke G, O'Leary C, Petit E, Clarke N, Waddington JL. Phenotypic effects of repeated psychosocial stress during adolescence in mice mutant for the schizophrenia risk gene neuregulin-1: a putative model of gene $\times$ environment interaction. *Brain, Behavior and Immunity*. 2012; 26 (4):660-71.

Eliasson MJL, Blackshaw S, Schell MJ, Snyder SH. Neuronal nitric oxide synthase alternatively spliced forms: Prominent functional localizations in the brain. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1997;94 (7):3396-401.

Fiske A, Wetherell JL, Gatz M. Depression in Older Adults. *Annual review of clinical psychology*. 2009;5:363-89.

Franklin KBJ, Paxinos G. The mouse Brain in stereotaxic coordinates. 3rd ed. New York: Elsevier; 2008.

Freudenberg F, Alttoa A, Reif A. Neuronal nitric oxide synthase (NOS1) and its adaptor, NOS1AP, as a genetic risk factors for psychiatric disorders. *Genes, brain, and behavior*. 2015, 14 (1):46-63.

Furman DJ, Hamilton JP, Gotlib IH. Frontostriatal functional connectivity in major depressive disorder. *Mood Anxiety Disorder*. 2011; 8:1–11.

Gabbay V, Ely BA, Li Q, Bangaru SD, Panzer AM, Alonso CM, Castellanos FX, Milham MP. Striatum-based circuitry of adolescent depression and anhedonia. *Journal of the American of Child Adolescent Psychiatry* 2013; 52 (6):628–41.

Garber J, Weersing VR. Comorbidity of Anxiety and Depression in Youth: Implications for Treatment and Prevention. *Clinical Psychology*. 2010; 17 (4):293-306.

García PM, Blanco GM, Valiente LM, Rodríguez AM, Miñarro J, Aguila MA. Long-term effects of repeated social stress on the conditioned place preference induced by MDMA in mice. *Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry*. 2015; 63:98-109.

Golden SA, Covington HE 3rd, Berton O, Russo SJ. A standardized protocol for repeated social defeat stress in mice. *Nature Protocols*. 2011; 6 (8):1183-91.

Gomez F, Houshyar H, Dallman MF. Marked regulatory shifts in gonadal, adrenal, and metabolic system responses to repeated restraint stress occur within a 3-week period in pubertal male rats. *Endocrinology*. 2002; 143(8):2852–62.

Gorwood P. Neurobiological mechanisms of anhedonia. *Dialogues in Clinical Neuroscience*. 2008; 10(3):291-9.

Gotti S, Sica M, Panzica CV, Panzica G. Distribution of Nitric Oxide Synthase Immunoreactivity in the Mouse Brain. *Microscopy research and technique*. 2005; 68 (1): 13-35

Guix FX, Uribesalco I, Coma M, Muñoz FJ. The physiology and pathophysiology of nitric oxide in the brain. *Progress in Neurobiology*. 2005; 76 (2):126-52

Hammels C, Pishva E, De Vry J, Van Den Hove DL, Prickaerts J, Van Winkel R, Selten JP, Lesch KP, Daskalakis NP, Steinbusch HWM, Os JV, Kenis G, Rutten BPF. Defeat stress in rodents: From behavior to molecules. *Neuroscience & Biobehavioral Reviews*. 2015; 59:111-40

Hardingham N, Dachtler J, Fox K. The role of nitric oxide in pre-synaptic plasticity and homeostasis. *Frontiers in Cellular Neuroscience*. 2013; 7:190.

Hashimoto K. Emerging role of glutamate in the pathophysiology of major depressive disorder. *Brain Research Review*. 2009; 61(2):105-23.

Heshmati M, Russo SR. Anhedonia and the Brain Reward Circuitry in Depression. *Current Behavioral Neuroscience Report*. 2015; 2 (3):146–53.

Hollis F, Kabbaj M. Social Defeat as an Animal Model for Depression. *Institute for Laboratory Animal Research Journal*. 2014; 55 (2):221-32.

Hu M, Sun YJ, Zhou QG, Chen L, Hu Y, Luo CX, Wu JY, Xu JS, Li LX, Zhu DY. Negative regulation of neurogenesis and spatial memory by NR2B-containing NMDA receptors. *Journal of Neurochemistry*. 2008; 106 (4):1900-13.

Huang GB, Zhao T, Muna SS, Bagalkot TR, Jin HM, Chae HJ, Chung YC. Effects of chronic social defeat stress on behaviour, endoplasmic reticulum proteins and choline acetyltransferase in adolescent mice. *International Journal of Neuropsychopharmacology*. 2013; 16 (7):1635–47.

Huang PL, Dawson TM, Bredt DS, Snyder SH, Fishman MC. Targeted disruption of the neuronal nitric oxide synthase gene. *Cell*. 1993; 75 (7):1273–86.

Ignarro LJ. Endothelium-derived nitric oxide: actions and properties. *The FASEB Journal*. 1989; 3 (1):31-6.

Iñiguez SD, Riggs LM, Nieto JS, Dayrit G, Zamora NN, Shawhan KL, Cruz B, Warren BL. Social defeat stress induces a depression-like phenotype in adolescent male c57BL/6 mice. *Stress*, 2014; 17 (3):247–55.

Isingrini E, Perret L, Rainer Q, Amilhon B, Guma E, Tanti A, Martin G, Robinson J, Monquin L, Marti F, Mechawar N, Williams S, Gratton A, Giros B. Resilience to chronic stress is mediated by noradrenergic regulation of dopamine neurons. *Nature neuroscience*. 2016; 19 (4):560-3.

Jefferys D, Funder J. Nitric oxide modulates retention of immobility in the forced swimming test in rats. *European Journal Pharmacology*. 1996; 295 (2-3):131–5.

Joca SRL, Guimaraes FS. Inhibition of neuronal nitric oxide synthase in the rat hippocampus induces antidepressant-like effects. *Psychopharmacology*. 2006; (185): 298-305.

Joca SRL, Padovan CM e Guimarães FS. Estresse, depressão e hipocampo. *Revista Brasileira de Psiquiatria*. 2003; 25 (2):46-51.

Kaltiala-Heino R, Fröjd S. Correlation between bullying and clinical depression in adolescent patients. *Journal of Adolescent Health, Medicine and Therapeutics*. 2011; (2): 37–44.

Karatsoreos I, McEwen, B. Psychobiological allostasis: resistance, resilience and vulnerability. *Trends in Cognitive Sciences*. 2011; 15 (12):576 – 84.

Kerestes R, Harrison BJ, Dandash O, Stephanou, Whittle S, Pujol, Davey GC. Specific functional connectivity alterations of the dorsal striatum in young people with depression. *Neuroimage Clinical*. 2015; 7:266–72.

Kermadi I, Joseph JP. Activity in the caudate nucleus of monkey during spatial sequencing. *Journal Neurophysiology*. 1995; 74 (3):911-33.

Kessler RC, Berglund P, Demler O, Jin R, Merikangas KR, Walters EE. Lifetime prevalence and age-of-onset distributions of DSM-IV disorders in the National Comorbidity Survey Replication. *Archives of General Psychiatry*. 2005; 62 (6):593–602.

Kim SH, Won SJ, Mao XO, Lendert C, Jin K, Greenberg DA. Role for neuronal nitric-oxide synthase in cannabinoid-induced neurogenesis. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*. 2006; 319 (1):150-4.

Kim YK, Paik JW, Lee SW, Yoon D, Han C, Lee BH. Increased plasma nitric oxide level associated with suicide attempt in depressive patients. *Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry*. 2006; 30 (6):1091-6.

Kimura M. Behaviorally contingent property of movement-related activity of the primate putamen. *Journal Neurophysiology*. 1990; 63 (6):1277-96.

Kinsey SG, Bailey MT, Sheridan JF, Padgett DA. The inflammatory response to social defeat is increased in older mice. *Physiology & Behavior*. 2008; 93 (3):628-36.

Kishimoto J, Tsuchiya T, Emson PC, Nakayama Y. Immobilization-induced stress activates neuronal nitric oxide synthase (nNOS) mRNA and protein in hypothalamic-pituitary-adrenal axis in rats. *Brain Research*. 1996, 720 (1-2):159–71.

Krishnan V, Han MH, Graham DL, Berton O, Renthal W, Russo SJ, et al. Molecular adaptations underlying susceptibility and resistance to social defeat in brain reward regions. *Cell*. 2007;131(2):391-404.

Krishnan V. Defeating the fear: New insights into the neurobiology of stress susceptibility. *Experimental Neurology*. 2014, 261:412-6.

Kubota Y, Shigematsu N, Karube F, Sekigawa A, Kato S, Yamaguchi N, Hirai Y, Morishima M, Kawaguchi Y. Selective co-expression of multiple chemical markers defines discrete populations of neocortical GABAergic neurons. *Cerebral Cortex*. 2011; 21 (8): 1803-17.

Kudryavtseva NN, Bakshtanovskaya IV, Koryakina LA. Social model of depression in mice of C57BL/6J strain. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*. 1991; 38 (2):315-20.

Lagace DC, Donovan MH, DeCarolus NA, Farnbauch LA, Malhotra S, Berton O, et al. Adult hippocampal neurogenesis is functionally important for stress-induced social avoidance. *Proceeding of the National Academy of Science of the United States of America*. 2010; 107 (9):4436-41.

Lohoff FW. Overview of the Genetics of Major Depressive Disorder. *Current Psychiatry Reports*. 2010; 12 (6):539-46.

Lorenzetti V, Allenb NB, Fornitoa A, Yücel M. Structural brain abnormalities in major depressive disorder: a selective review of recent MRI studies. *Journal of Affective Disorders*. 2009; 117(1-2):1-17.

Luo CX, Jin X, Cao CC, Zhu MM, Wang B, Chang L, Zhou QG, Wu HY, Zhu DY. Bidirectional regulation of neurogenesis by neuronal nitric oxide synthase derived from neurons and neural stem cells. *Stem Cells*. 2010; 28:2041–52.

Lupien SJ, De Leon M, De Santi S, Convit A, Tarshish C, Nair NPV, Thakur M, McEwen B, Hauger R, Meaney MJ. Cortisol levels during human aging predict hippocampal atrophy and memory deficits. *Nature Neuroscience*. 1998; 1(1):69-72.

Luthar SS, Sawyer JA, Brown PJ. Conceptual issues in studies of resilience: past, present, and future research. *Annals of the New York Academy of Sciences*. 2006; 1094:105–15.

Maletic V, Raison CL. Neurobiology of depression, fibromyalgia and neuropathic pain. *Frontier in Bioscience*. 2009 Jun; 14:5291-338.

Mayer B, John Mathias, Heinzl B, Werner ER, Wachter H, Schultz G, Böhme E. Brain nitric oxide synthase is a biopterin- and flavin-containing multi-functional oxido-reductase. *FEBS Letters*. 1991; 288 (1-2):187-91.

McCormick CM, Mathews IZ, Thomas C, Waters P. Investigations of HPA function and the enduring consequences of stressors in adolescence in animal models. *Brain and Cognition*. 2010; 72(1):73–85

McLeod TM, López-Figueroa AL, López-Figueroa MO. Nitric oxide, stress, and depression. *Psychopharmacology Bulletin*. 2001; 35 (1):24–41.

Muscará MN, de Nucci G. Simultaneous determination of nitrite and nitrate anions in plasma, urine and cell culture supernatants by high-performance liquid chromatography with post-column reactions. *Journal of Chromatography B: Biomedical and Applications*. 1996; 686 (2):157-64.

Nishida K, Harrison DG, Navas JP, Fisher AA, Dockery SP, Uematsu M, Nerem RM, Alexander RW, Murphy TJ. Molecular cloning and characterization of the constitutive bovine aortic endothelial cell nitric oxide synthase. *The Journal of Clinical Investigation*. 1992; 90 (5):2092-6.

Oliveira RM, Guimarães FS, Deakin JF. Expression of neuronal nitric oxide synthase in the hippocampal formation in affective disorders. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*. 2008; 41 (4): 333-41.

Organização Mundial da Saúde. Depression. A Global Public Health Concern. Disponível em: http://www.who.int/mental_health/management/depression/who_paper_depression_wfmh_2012.pdf. Acessado: 26/01/2015

Pasumarthi RK1, Gerashchenko D, Kilduff TS. Further characterization of sleep-active neuronal nitric oxide synthase neurons in the mouse brain. *Neuroscience*. 2010; 169 (1):149-57.

Paus T, Keshavan M, Giedd JN. Why do many psychiatric disorders emerge during adolescence? *Nature Review Neuroscience*. 2008; 9 (12):947–57.

Petrie RX, Reid IC, Stewart CA. The N-methyl-D-aspartate receptor, synaptic plasticity, and depressive disorder. A critical review *Pharmacology Therapy*. 2000; 87 (1):11–25.

Pereira-Junior J. Estudos dos Telômeros em tecido hipocampal de camundongos submetidos a um estresse psicossocial prolongado. [dissertação (Mestrado em Farmacologia)]. São Paulo: Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo; 2008.

Pereira VS, Romano A, Wegener G, Joca SMRL. Antidepressant-like effects induced by NMDA receptor blockade and NO synthesis inhibition in the ventral medial prefrontal cortex of rats exposed to the forced swim test. *Psychopharmacology*. 2015; 232 (13): 2263-73.

Pinto VLM, Bruninin TMC, Ferraz MR, Okinga A, Ribeiro ACM. Depression and Cardiovascular Disease: Role of Nitric Oxide. *Cardiovascular & Hematological Agents in Medicinal Chemistry*. 2008; 6 (2): 142-9

Potter PAE, Hays RB, Pound CD. Depression in general practice. *Medical Journal of Australia*. 1991; 157 (38): 41.

Price JL, Drevets WC. Neurocircuitry of mood disorders. *Neuropsychopharmacology reviews*. 2009; 35 (1): 192-216.

Rajkowska G. Postmortem studies in mood disorders indicate altered numbers of neurons and glial cells. *Biological Psychiatry*. 2000; 48 (8):766–77.

Razzoli M, Andreoli M, Michielin F, Quarta D, Sokal DM. Increased phasic activity of VTA dopamine neurons in mice 3 weeks after repeated social defeat. *Behavioural Brain Research*. 2011; 218 (1):253-7.

Reddy MS. Depression: the disorder and the Burden. *Indian Journal of Psychological Medicine*. 2010; 32 (1):1-2.

Resende LS, Amaral CE, Soares RBS, Alves AS, Alves-dos-santos L, Britto LRG, Chiavegatto S. Social stress in adolescents induces depression and brain-region-specific modulation of the transcription factor MAX. *Translational Psychiatry*. 2016; 6 (10):e914

Rodriguez AM, Navarrete F, Blanco GMC, Arenas MC, Bartoll A, Aguilar M A, Rubio G, Miñarro J, Manzanares J. Social defeat in adolescent mice increases vulnerability to alcohol consumption. *Addiction Biology*. 2016; 21 (1):87–7.

Romeo RD, McEwen BS. Stress and the adolescent brain. *Annals of the New York Academy of Sciences*. 2006; 1094:202-14.

Russo JS, Murrough JW, Han MH, Charney DS, Nestler EJ. Neurobiology of resilience. *Nature neuroscience*. 2012; 15 (11):1475-84.

Russo SJ, Nestler EJ. The brain reward circuitry in mood disorders. *Nature Reviews Neuroscience*. 2013; 14 (9):609-25.

Rygula R, Abumaria N, Domenini E, Hiemeke C, Fuchs E. Effects of fluoxetine on behavioral deficits evoked by chronic social stress in rats. *Behavioural Brain Research*. 2006; 174 (1): 188-92.

Santos TB, Céspedes IC, Viana MB. Chronic corticosterone administration facilitates aversive memory retrieval and increases GR/NOS immunoreactivity. *Behavioural Brain Research*. 2014; 267:46-54.

Schmidt MV, Trümbach D, Weber P, Wagner K, Scharf SH, Liebl C, Datson N, Namendorf C, Gerlach T, Kühne C, Uhr M, Deussing JM, Wurst W, Binder EB, Holsboer F, Müller MB. Individual stress vulnerability is predicted by short-term memory and AMPA receptor subunit ratio in the hippocampus. *The Journal of Neuroscience*. 2010; 30 (50):16949-58

Selye H. A syndrome produced by diverse nocuous agents. *Nature*. 1936; 886:172-89.

Sen S, Sanacora G. Major depression: emerging therapeutics. *Mount Sinai Journal of Medicine*. 2008; 75(3):204-25.

Seppi K, Schocke MF, Prennschuetz-Schuetzenau K, Mair KJ, Esterhammer R, Kremser C, Muigg A, Scherfler C, Jaschke W, Wenning GK, Poewe W. Topography of putaminal degeneration in multiple system atrophy: a diffusion magnetic resonance study. *Movement Disorders*. 2006; 21 (6):847–52.

Sheline Y, Gado M, Kraemer HC. Untreated depression and hippocampal volume loss. *The American Journal of Psychiatry*. 2003; 160 (8):1516-8.

Southwick SM, Vythilingam M, Charney DS. The psychobiology of depression and resilience to stress: Implications for prevention and treatment. *Annual Review of Clinical Psychology*. 2005; (1):255-91.

Stahl SM. *Psychopharmacology of antidepressants*. London: Martin Dunitz. 1997, 114p.

Strekalova T, Spanagel R, Bartsch D, Henn FA, Gass P. Stress-Induced Anhedonia in Mice is Associated with Deficits in Forced Swimming and Exploration. *Neuropsychopharmacology*. 2004; 29 (11): 2007–17.

Suzuki E, Nakaki M & Miyaoka. Plasma nitrate levels in depressive states. *Journal of Psychiatry and Neuroscience*. 2001; 63 (1-3):221-4.

Swaab DF, Bao A, Lucassen PJ. The stress system in the human brain in depression and neurodegeneration. *Ageing Research Review*. 2005; 4 (2):141-91.

Thomas JL, Wilk JE, Riviere LA, McGurk D, Castro CA, Hoge CW. Prevalence of Mental Health Problems and Functional Impairment Among Active Component and National Guard Soldiers 3 and 12 Months Following Combat in Iraq. *Archives of General Psychiatry*. 2010; 67 (10): 614-23.

Toth E, Gersner R, Wilf-Yarkoni A, Raizel H, Dar DE, Richter-Levin G, Levit O, Zangen A. Age-dependent effects of chronic stress on brain plasticity and depressive behavior. *Journal of Neurochemistry*. 2008;107:522–32.

Ulrich-Lai YM, Herman JP. Neural regulation of endocrine and autonomic stress responses. *Nature Review Neuroscience*. 2009; 10 (6):397–409.

Vandesompele J, De Preter K, Pattyn F, Poppe B, Van Roy N, De Paepe A, Speleman F. Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes. *Genome Biology*. 2002; 3 (7): RESEARCH0034.

Veeraiah P, Noronha JM, Maitra S, Bagga P, Khandelwal N, Chakravarty S, Kumar A, Patel AB. Dysfunctional glutamatergic and g-aminobutyric acidergic activities in prefrontal

cortex of mice in social defeat model of depression. *Biological Psychiatry*. 2014; (76):231-8.

Venzala E, Garcia-Garcia AL, Elizalde N, Delagrangre P, Tordera RM. Chronic social defeat stress model: behavioral features, antidepressant action, and interaction with biological risk factors. *Psychopharmacology*. 2012; 224 (2):313-25.

Vismari L, Alves GJ, Neto JP. Depressão, antidepressivos e sistema imune: Um novo olhar sobre um velho problema. *Revista Psiquiátrica Clínica*. 2008; 35 (5):196 – 204.

Wang Y, Marsden PA. Nitric oxide synthase: gene, structure and regulation. *Advances in Pharmacology*. 1995; 34:71-90.

Wegener G, Volker V, Harvey BH, Rosenberg R. Local, but not systemic, administration of serotonergic antidepressants decreases hippocampal nitric oxide synthase activity. *Brain Research*. 2003; 959 (1):128-34.

Weitzberg E, Hezel M, Lundberg JO. Nitrate-Nitrite-Nitric Oxide Pathway Implications. *Anesthesiology*. 2010; 113 (6): 1460-75.

Whitaker AM, Gilpin NW, Edwards S. Animal Models of Post-Traumatic Stress Disorder and Recent Neurobiological Insights. *Behavioural pharmacology*. 2014;25(0):398-409.

Windfuhr K, While D, Hunt I, et al. National confidential inquiry into suicide and homicide by people with mental illness. Suicide in juveniles and adolescents in the United Kingdom. *Journal of Child Psychology Psychiatry*. 2008; 49(11):1155–65.

Wulsch T, Chourbaji S, Fritzen S, Kittelt S, Grunblatt E, Gerlach M, Gutknecht L, Chizat F, Golfier G, Schmitt A, Gass P, Lesch KP & Reif A. Behavioural and expressional phenotyping of nitric oxide synthase-I knockdown animals. *Journal of Neural Transmission*. 2007; (72):69–85.

Yang B, Zhang J, Han M, Yao W, Yang C, Ren Q, Ma M, Chen QX, Hashimoto K. Comparison of R-ketamine and rapastinel antidepressant effects in the social defeat stress model of depression. *Psychopharmacology*. 2016; 233 (19-20):3647-57.

Yildiz F, Erden BF, Ulak G, Utkan T, Gacar N. Antidepressant-like effect of 7-nitroindazole in the forced swimming test in rats. *Psychopharmacology*. 2000, 149 (1): 41–4.

Yu T, Guo M, Garza J, Rendon S, Sun XL, Zhang W, et al. Cognitive and neural correlates of depression-like behavior in socially defeated mice: an animal model of depression with cognitive dysfunction. *International Journal of Neuropsychopharmacology*. 2011, 14(3):303–17.

Zannas AS, West A. Epigenetics and the regulation of stress vulnerability and resilience. *Neuroscience*. 2014; 0:157 –70.

Zhou QG, Hu Y, Hua Y, Hu M, Luo CX, Han X, et al. Neuronal nitric oxide synthase contributes to chronic stress-induced depression by suppressing hippocampal neurogenesis. *Journal of Neurochemistry*. 2007; 103 (5):1843-54.

Zhou QG, Zhu LJ, Chen C, Wu HY, Luo CX, Chang L, Zhu DY. Hippocampal neuronal nitric oxide synthase mediates the stress-related depressive behaviors of glucocorticoids by downregulating glucocorticoid receptor. *Journal of Neurochemistry*. 2011; 31 (21):7579–90.