

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

“Efeitos da inibição da síntese de NO sobre o padrão de expressão da proteína Fos no encéfalo de ratos expostos a modelo animal de depressão”

Michelle Silva

RIBEIRÃO PRETO

2010

Livros Grátis

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

Milhares de livros grátis para download.

Michelle Silva

“Efeitos da inibição da síntese de NO sobre o padrão de expressão da proteína Fos no encéfalo de ratos expostos a modelo animal de depressão”

Dissertação de mestrado apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto para obtenção do título de Mestre em Ciências.

Área de Concentração: Farmacologia

Aluno: Michelle Silva

Orientador: Profa. Dra. Sâmia Regiane Lourenço Joca

RIBEIRÃO PRETO

2010

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

FICHA CATALOGRÁFICA

Preparada pela Biblioteca Central do Campus Administrativo de Ribeirão Preto/USP

Silva, Michelle

Efeitos da inibição da síntese de NO sobre o padrão de expressão de proteína Fos induzido no encéfalo de ratos expostos ao modelo do nado forçado / Michelle Silva; orientador: Sâmia Regiane Lourenço Joca. – Ribeirão Preto, 2010.

126 p.

Dissertação (Mestrado em Ciências – Área de Concentração: Farmacologia) – Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo.

1. Depressão.2.Óxido Nítrico.3.Nado Forçado.4.Imunohistoquímica.5.Fos

FOLHA DE APROVAÇÃO

Michelle Silva

Efeitos da inibição da síntese de NO sobre o padrão de expressão da proteína Fos no encéfalo de ratos expostos a modelo animal de depressão.

Dissertação apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Mestre em Ciências, Área de Concentração: Farmacologia.

Aprovado em:

Banca examinadora

Profa. Dra. Sâmia Regiane Lourenço Joca

Instituição: FCFRP-USP

Assinatura: _____

Prof. Dr. Fernando Morgan de Aguiar Correa

Instituição: FMRP-USP

Assinatura: _____

Profa. Dra. Vanessa Beijamini Harres

Instituição: UFES

Assinatura: _____

Os primeiros passos de nossas vidas são amparados por nossos pais e os passos seguintes por seus ensinamentos. Dedico a meus pais, Stela e Sebastião este trabalho.

AGRADECIMENTOS

A Profa. Dra. Sâmia Regiane Lourenço Joca pela confiança e incansável dedicação, pelo carinho, apoio e acima de tudo pela amizade em todos os momentos. Sem dúvida sem sua orientação esse trabalho não teria o mesmo valor.

Ao Prof. Dr. Francisco Silveira Guimarães pela colaboração em meu projeto e por estar sempre disposto a me auxiliar quando precisei.

A Profa. Dra. Daniele Cristina de Aguiar, pela dedicação, paciência e competência na co-orientação desse trabalho, sem seu auxílio e dedicação para que tudo corresse em ordem, o meu trabalho certamente seria muito mais difícil.

Aos senhores membros da banca examinadora Prof. Dr. Fernando Morgan de Aguiar Correa e Prof. Dra. Vanessa Beijamini Harres, pela disponibilidade e participação através de críticas e sugestões.

Ao Prof. Dr. Leonardo Resstel pelas sugestões e pela ajuda nas dúvidas surgidas. Com sua atenção, certamente meu trabalho se enriqueceu.

A Cláudio Humberto da Silva pelo apoio e compreensão. Por me mostrar que a distância não é tão ruim, ela apenas nos mostra o quanto é bom estarmos juntos. Sem você certamente não seria tão forte.

Aos meus pais Sebastião e Stela, meus irmãos Fabrícia e Michael e a toda minha família que sempre me mostraram que não há nada impossível, porque os sonhos de ontem são as esperanças de hoje e podem converter-se em realidade amanhã.

Aos meus amigos e companheiros de laboratório que me ajudaram a crescer como pessoa e como profissional. Com eles pude chegar à conclusão de que nenhum trabalho de qualidade pode ser feito sem concentração, auto-sacrifício, esforço e esclarecimento de dúvidas.

Aos amigos antigos, distantes, sinceros (Taty, Dedé, Cintya, Fabiano, Celso, Frankilin, Nayana, Leonardo, Lislene....) que sempre nas horas difíceis me diziam que podemos escolher o que semear, mas que somos obrigados a colher o que plantamos. Taí o fruto de minhas sementes.

Aos amigos que fiz na pós-graduação (Carol, Sabrina, Dani, Plínio, Felipe, Vinícius, Ana, Vitor, Laura, Cassiano, Karina, Amanda, Michely...) pelo companheirismo, pela força, pelas brincadeiras, pelo ombro amigo quando necessário.

As minhas amigas de morada (Evelin, Taty, Zú, Aline, Karen, Nadi) por todo carinho e dedicação e por terem sido meu ponto de apoio inabalável quando precisei.

A José Carlos de Aguiar, Eleni Tamburus Gomes, Afonso Paulo Padovan e Tadeu Franco Vieira pelo auxílio técnico e atenção dispensados a mim quando precisei. Obrigada pelo carinho e dedicação.

A Flávia Fiacadori Salata pelo auxílio nos experimentos e dedicação em todos os momentos.

Aos funcionários das secretarias, Ramon, Sônia, Fátima e Marlene pela amizade e toda ajuda nesse período de convivência.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pelo apoio financeiro e a FAPESP, CAPES e FAEPA pelos auxílios que ajudaram a manter nosso laboratório.

Obrigada a todos vocês!!!

“Deus nos concede, a cada dia, uma página de vida nova no livro do tempo. Aquilo que colocamos nela corre por nossa conta.”

Chico Xavier

Resumo

SILVA, M. Efeitos da inibição da síntese de NO sobre o padrão de expressão da proteína Fos no encéfalo de ratos expostos a modelo animal de depressão.

2010.126f. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2010.

A Depressão é uma das psicopatologias mais prevalentes e um dos principais fatores que pode desencadear esta condição é o estresse. Vários neurotransmissores têm sido envolvidos na fisiopatologia da depressão, incluindo as monoaminas e, mais recentemente, o glutamato e o óxido nítrico (NO). Nesse sentido, evidências indicam que a administração de inibidores da sintase do NO neuronal (nNOS) induz efeito tipo-antidepressivo em modelos animais, como o teste do nado forçado (FST). Entretanto, os circuitos neurais envolvidos nestes efeitos ainda não foram estudados. Portanto, o presente trabalho investigou as estruturas encefálicas envolvidas no efeito tipo-antidepressivo induzido pela administração sistêmica de um inibidor preferencial da nNOS, o 7-nitroindazole (7NI), comparando-o com os antidepressivos clássicos venlafaxina (VLF) e fluoxetina (FLX). Para tanto, foi analisado o padrão de expressão da proteína Fos, um marcador de atividade neuronal, no encéfalo de animais tratados e submetidos ao FST. Os resultados evidenciaram que o 7-NI, assim como a VLF e FLX promoveu efeito tipo-antidepressivo no modelo do nado forçado, evidenciado através da diminuição do tempo de imobilidade dos animais durante o teste. Esses efeitos foram acompanhados de redução na expressão da proteína Fos em diversas estruturas encefálicas, tais como córtex pré-frontal medial, núcleos da rafe (dorsal e mediano), hipotálamo, núcleo acumbens, amígdala, substância cinzenta periaquedutal, locus coeruleus, entre outros. O conjunto de dados sugere que o efeito tipo-antidepressivo induzido pelos inibidores da NOS envolveria substratos neurobiológicos que são comuns aos antidepressivos convencionais e dá maior sustentação à participação do NO na neurobiologia da depressão.

Abstract

SILVA, M. **Effects of NO synthesis inhibition on Fos protein expression in the brain of rats submitted to an animal modelo of depression.** 2010. 126f. Thesis (Masters) - Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2010.

Depression is one of the most prevalent psychopathology and one of the main factors that can trigger this condition is stress. Several neurotransmitters have been implicated in the pathophysiology of depression, including monoamines and, more recently, glutamate and nitric oxide (NO). Accordingly, evidence indicates that administration of inhibitors of neuronal NO synthase (nNOS) induces antidepressant-like effects in animal models, such as the forced swimming test (FST). However, the neural circuits involved in these effects have not been studied yet. Therefore, this study investigated the brain structures involved in the antidepressant-like effect induced by systemic administration of a nNOS inhibitor, 7-nitroindazole (7NI), comparing it with classic antidepressants, venlafaxine (VLF) and fluoxetine (FLX). For this, we examined the expression of Fos, a marker of neuronal activity in the brain of treated animals submitted to FST. The results showed that 7-NI, as well as VLF and FLX promoted antidepressant-like effect in the forced swimming test, evidenced through the reduction of the immobility time of animals during the test. These effects were accompanied by reduction in the expression of Fos protein in various brain structures, such as medial prefrontal cortex, dorsal and median raphe nuclei, hypothalamus, amygdala, locus coeruleus, among others. The data set suggests that the antidepressant-like effect induced by inhibitors of NOS involve neurobiological substrates that are common to conventional antidepressants. Moreover, it further corroborates NO involvement in the neurobiology of depression.

Lista de Abreviaturas

5-HT - serotonina	GTP – guanosina trifosfato
7-NI – 7-nitroindazole	h - horas
ABC – complexo avidina biotina peroxidase	HL – hipotálamo lateral
AMme – amidala medial	H ₂ O ₂ – água oxigenada
ASL – área septal lateral	HPA – hipotálamo-hipófise-adrenal
BNST – núcleo intersticial da estria terminal	IHQ – imunohistoquímica
BSA – soro albumina bovina	IL – infra-límbico
CPu – caudato putamen	iMAO – inibidor da monoamina oxidase
CPF – córtex pré-frontal	iNOS – sintase de óxido nítrico induzida
CG - cingulado	i.p. – intra-peritonal
DAB – 3'3'3 – diaminobenzidina	LC – locus coeruleus
ECT - eletroconvulsiterapia	L-NA – NG-nitro-L-arginina
eNOS – sintase de óxido nítrico endotelial	MAO – monoamina oxidase
DMSO – dimetil sulfoxido	min - minutos
DOPAC - dihidroxifenilacético	NAc – núcleo acumbens
FCFRP-USP – Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto - Universidade de São Paulo	NDR – núcleo dorsal da rafe
FLX – Fluoxetina	NMR – núcleo mediano da rafe
FMRP-USP – Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto - Universidade de São Paulo	NMDA – N-metil-D-aspartato
Fos-IR – imunorreatividade para Fos	nNOS – sintase do óxido nítrico neuronal
FRDE – fator de relaxamento derivado do endotélio	NO – óxido nítrico
FST – teste do nado forçado	NOR – noradrenalina
GD – giro denteado	NOS – sintase do óxido nítrico
GMPC – guanosina monofosfato cíclico	pCPA – para-chlorophenylamine
	PFA - paraformaldeído
	PKG – proteína quinase dependente de GMPc
	PL – pré-límbico
	PT – pré-teste

PVN – núcleo paraventricular do hipotálamo

PVT – núcleo paraventricular do tálamo

SCP – substância cinzenta periaquedutal

SCPdl – substância cinzenta periaquedutal dorsolateral

sGC – guanilato ciclase solúvel

SNC – sistema nervoso central

T – teste

TI – tempo de imobilidade

TRIM – 1-(2 trifluoromethylphenyl)-imidazol

VLF – venlafaxina

SUMÁRIO

Introdução	14
1 – Depressão.....	15
2 – Teoria Monoaminérgica Clássica.....	18
3 – Óxido Nítrico.....	20
4 – Modelo do Nado Forçado.....	23
5 – Proteína Fos.....	24
6 – Hipótese.....	26
Objetivos	27
Objetivos Gerais.....	28
Objetivos Específicos.....	28
Metodologia	29
1 – Animais.....	30
2 – Drogas.....	30
3 – Desenho Experimental.....	30
3.1 – Nado Forçado.....	30
3.2 – Imunohistoquímica.....	31
3.4 – Grupos experimentais.....	33
<u>Grupo experimental 1</u> : Efeitos dos tratamentos com VLF, FLX ou 7-NI sobre a expressão de Fos em animais não estressados.....	33
<u>Grupo experimental 2</u> : Efeitos dos tratamentos com VLF, FLX ou 7-NI sobre a expressão de Fos em animais estressados.....	33
<u>Grupo experimental 3</u> : Avaliação da expressão basal de Fos.....	34
3.5 – Análise dos Dados.....	34
Resultados	35
Discussão	77
Conclusões	99
Referências Bibliográficas	101

INTRODUÇÃO

1- Depressão

O conceito de doença depressiva existe desde o século II d.c e, nessa época, já existiam relatos médicos com descrições de pacientes que apresentavam transtornos de humor (Sartorius, 2001). Contudo, foi apenas no final do século XIX que o psiquiatra alemão Emil Kraepelin apresentou uma classificação diagnóstica para a depressão, diferenciando-a da esquizofrenia e de outras doenças mentais (Angst & Gama, 2008). Atualmente, segundo o Manual Estatístico e Diagnóstico da Associação Norte-Americana de Psiquiatria, em sua quarta versão (DSM-IV) os distúrbios afetivos podem ser classificados em distúrbios depressivos (depressão maior, distímia e tipos não-especificados) e distúrbios bipolares.

A depressão maior é uma das desordens psiquiátricas mais freqüentemente observadas e se caracteriza por um ou mais episódios depressivos com pelo menos duas semanas de humor deprimido ou perda de interesse na maioria das atividades (anedonia), ou ambos. Para fins de diagnóstico, pelo menos mais quatro sintomas devem estar presentes, incluindo: sentimentos de desamparo e culpa, alterações de apetite e de sono, fadiga, alterações motoras (retardo ou agitação), alterações da libido, dificuldade de concentração e raciocínio, e ideias suicidas (DSM-IV). A presença de humor deprimido por pelo menos dois anos associado a alguns desses sintomas, mas sem caracterizar um episódio depressivo maior, caracterizam as distímias.

Os distúrbios bipolares são constituídos por episódios maníacos alternados com episódios depressivos. Episódios de mania são caracterizados por humor persistentemente elevado, hiperatividade, insônia, euforia, dispersão, excesso de auto-estima e confiança, por pelo menos uma semana (DSM-IV).

Hoje se sabe que a depressão é um importante distúrbio neuropsiquiátrico que afeta diferentes classes etárias, de crianças a adultos (Kiss, 2008, Kozisek et. al., 2008a). Além disso, com uma prevalência de até 25% entre diferentes populações, a depressão representa um enorme dispêndio econômico para sociedade já que a ela são atribuídas muitas despesas com atendimento ambulatorial, medicamentos e internações (Kiss, 2008). A depressão também promove disfunções no organismo que provocam uma série de alterações comportamentais e emocionais como, por exemplo, falta de concentração, desânimo, melancolia, levando a dificuldades profissionais, familiares e pessoais (Southwick et. al., 2005).

Somado a esses fatores, apesar da existência de diferentes opções de medicamentos no mercado para o tratamento do distúrbio, muitos são os indivíduos que não apresentam uma melhora do quadro depressivo com os tratamentos farmacológicos tradicionais (Kessler et. al., 2003; Pinder, 2001). Confirmando esses dados, relatos demonstram que o sucesso do tratamento farmacológico não chega a 60% dos pacientes, o que significa que pelo menos 40% deles não apresentam melhora do quadro depressivo. Além disso, mesmo depois de múltiplas terapias utilizando diferentes drogas, apenas cerca de 70% tem sucesso com o tratamento (Kiss, 2008). Daí a importância de mais estudos que contribuam para elucidação da neurobiologia da depressão a fim de auxiliar no desenvolvimento de novas drogas que aumentem a porcentagem de sucesso do tratamento, reduzam a latência para o aparecimento do efeito ou até mesmo ajudem a promover a cura da doença.

Já está bastante consolidado na literatura que o estresse seria o principal fator ambiental capaz de predispor um indivíduo ao desenvolvimento das alterações neuroquímicas e plásticas que levariam ao distúrbio depressivo (Kendler et. al., 1995; Southwick et. al., 2005; Pittenger & Duman, 2008). Vários trabalhos têm

demonstrado, por exemplo, que fatores genéticos específicos associados a eventos estressantes durante a vida aumentam a predisposição para desenvolver a depressão (Kendler et al., 1995; Caspi et al., 2003). Além disso, Post (1994) relata que, em cerca de 60% dos casos, o primeiro episódio de depressão é precipitado pela pré-exposição a algum evento de estresse intenso. Estudos demonstram, ainda, que eventos estressantes tais como ser vítima de um crime, problemas financeiros, divórcio, a perda dos pais, também possuem uma forte associação com o desenvolvimento do distúrbio (Southwick et. al., 2005; Post, 1994; Kendler, 1990; Caspi et. al., 2003).

Diante a uma situação de estresse incontrolável, ocorre uma exacerbação de mediadores da resposta ao estresse, como glicocorticóides (McEwen, 2004), os quais, em grandes quantidades favoreceriam o desenvolvimento de diversos transtornos psiquiátricos, incluindo a depressão (McEwen, 2004).

Reforçando os dados apresentados, trabalhos vêm demonstrando que a aplicação de estímulos físicos e/ou psicológicos intensos a animais de laboratório podem constituir um fator estressante capaz de levar a alterações fisiológicas e comportamentais observadas também em indivíduos deprimidos, de maneira sensível ao tratamento com drogas antidepressivas (Willner, 1986; McArthur & Borsini, 2006). Com isso, a exposição de animais de laboratório a situações estressantes não controláveis vem sendo empregada como importante ferramenta experimental para se estudar a neurobiologia da depressão (Willner, 1990; Mathews et. al., 2005; McArthur & Borsini, 2006). Alguns exemplos são o teste do nado forçado (FST) (Porsolt et. al., 1977), a suspensão pela cauda (McArthur & Borsini, 2006) e desamparo aprendido (Willner, 1985).

2–Teoria Monoaminérgica Clássica da Depressão

As primeiras teorias sobre a neurobiologia da depressão surgiram através da descoberta inesperada de que drogas utilizadas com outros fins terapêuticos eram capazes de aliviar alguns sintomas observados nesse transtorno afetivo (Nestler et. al., 2002; Urani et. al., 2005). O surgimento dos primeiros indícios se deu a partir de observações de que drogas como a iproniazida, que era utilizada no tratamento da tuberculose (Selikoff & Robitzek, 1952; Loomer et. al., 1957), e a imipramina, que era investigada no tratamento da esquizofrenia (Kuhn, 1957), melhoravam nitidamente o humor dos pacientes que estavam em tratamento com as mesmas. Posteriormente, foram demonstrados os efeitos antidepressivos para essas drogas em estudos clínicos controlados (Azima & Vispo, 1958; Kuhn, 1958; Klerman et. al., 1965). Mais tarde, os mecanismos de ação dessas drogas foram elucidados e hoje se sabe que a iproniazida é um inibidor da monoamina oxidase (MAO), uma enzima que degrada monoaminas (Selikoff & Robitzek, 1952; Loomer et. al., 1957), e que a imipramina é um inibidor não seletivo da recaptação de monoaminas (Axelrod & Inscoe, 1963; Glowsinski & Axelrod, 1964). A partir desses achados farmacológicos, foi postulado que os efeitos antidepressivos induzidos por essas drogas estariam relacionados à facilitação da neurotransmissão monoaminérgica (Axelrod & Inscoe, 1963; Glowsinski & Axelrod, 1964). Corroborando esses dados, havia evidências de que a reserpina, uma substância depletora de monoaminas, levava alguns pacientes a quadros de depressão e que a anfetamina, droga que diminui a recaptação e promove liberação de noradrenalina (NOR), induzia euforia (Sulzer et. al., 1964).

Diante de tais evidências surgiu a “Teoria Monoaminérgica Clássica da Depressão”, a qual propõe que o transtorno depressivo seria provocado pela

diminuição dos níveis de noradrenalina (Schildkraut, 1965; Schildkraut & Kety, 1967) e/ou serotonina (5-HT) (Lapin & Oxenkrug, 1969) no sistema nervoso central (SNC).

Apesar de, até o momento, essa ainda ser a mais aceita e conhecida das teorias que procuram explicar a neurobiologia da depressão, ela possui falhas de construto que indicam se tratar de um processo muito mais complexo. Por exemplo, essa hipótese não explica a latência para o aparecimento do efeito antidepressivo (2-3 semanas), uma vez que a inibição da recaptação de monoaminas e a inibição da MAO acontecem agudamente (Castrén 2005). Além disso, a teoria monominérgica também não explica porque a depleção aguda dos níveis de monoaminas (serotonina ou noradrenalina) não induz quadros depressivos em humanos, embora isso prejudique a resposta ao tratamento farmacológico (Delgado et al., 1990; Heninger et al., 1996).

Por isso, recentemente novas teorias tem surgido no intuito de explicar as lacunas evidenciadas pela teoria monoaminérgica sobre a neurobiologia da depressão. Nesse sentido, estudos utilizando ligantes marcados e o advento da era da biologia molecular tem demonstrado que o tratamento repetido com drogas antidepressivas induz alterações plásticas no SNC que parecem coincidir com o início do efeito terapêutico dessas drogas, portanto, implicando tais alterações na neurobiologia da depressão e da resposta a antidepressivos (Blier & Ward, 2003; Castren, 2005; Nestler, 2010). Por exemplo, a exposição de animais a estresse repetido promove diminuição da expressão de fatores neurotróficos, principalmente do fator neurotrófico derivado do cérebro (BDNF), em diferentes estruturas encefálicas, como córtex prefrontal e hipocampo, e diminuição da neurogênese (Castren, 2005; Kozisek et. al., 2008a). Tais alterações são atenuadas pelo tratamento repetido com antidepressivos e são necessárias para o aparecimento de seus efeitos comportamentais (Castren, 2005; Nestler, 2010). Diante disso, foi

proposta a Hipótese Neurotrófica (ou Molecular) da depressão, preconizando que a depressão resultaria de alterações plásticas encefálicas induzidas pelo estresse que provocariam um colapso nas redes neuronais responsáveis pelo processamento emocional e de informações e que os antidepressivos restaurariam gradualmente a plasticidade neuronal e conseqüentemente as redes neuronais, promovendo assim seu efeito terapêutico (Kozisek et. al., 2008a).

Além disso, novas propostas sugerem o envolvimento de outros neurotransmissores, além das monoaminas, como glutamato e óxido nítrico (NO), no desenvolvimento do distúrbio depressivo (Pittenger & Duman, 2008; Maeng & Zarate Jr, 2007). Ademais, há evidências que apontam alterações endócrinas nos indivíduos deprimidos como a disfunção na atividade do eixo Hipotálamo-hipófise-adrenal (HPA) (Tsigos & Chrousos, 2002; Keller et. al., 2005). Portanto, tais alterações neuroquímicas e endocrinológicas poderiam contribuir para os desequilíbrios plásticos que predisporiam um indivíduo ao desenvolvimento da depressão ou um animal ao desenvolvimento de alterações comportamentais do estresse.

3– Óxido Nítrico

Atualmente, o envolvimento de outros neurotransmissores tem sido investigado na neurobiologia da depressão e no mecanismo de ação dos antidepressivos, gerando novas hipóteses a respeito da neurobiologia da desordem (Pittenger & Duman, 2008; Maeng & Zarate Jr, 2007).

Dentre eles, destaca-se o NO, o qual foi identificado primeiramente como Fator de Relaxamento Derivado do Endotélio (EDRF – endothelium derived relaxing

factor) (Furchgot & Zawadzki, 1980), tendo sido, mais tarde, identificado como um neurotransmissor atípico no SNC (Gartwaite et. al., 1988).

A síntese de NO ocorre através da ação de uma enzima, a Óxido Nítrico Sintase (NOS) que pode ser encontrada no organismo em diferentes isoformas: neuronal (nNOS), induzida (iNOS) e endotelial (eNOS) (Guix et al., 2005). A nNOS está largamente presente no encéfalo dos mamíferos, onde é responsável por mais de 90% da produção de NO (Bernstein et. al., 2005). Uma das formas de síntese é através da ativação de receptores para glutamato denominados N-metil-D-aspartato (NMDA), promovendo assim o influxo de cálcio para o interior celular, o que ativa a nNOS a qual, por sua vez, atua sobre a L-arginina para formar citrulina e NO (Gartwaite et. al., 1988; Bredt & Snyder, 1994; Calabrese et. al., 2007). O NO possui diversas vias de sinalização, sendo que a principal no SNC ocorre através da ativação da enzima guanilato ciclase solúvel (sGC), que converte guanosina trifosfato (GTP) em guanosina monofosfato cíclico (GMPc). O aumento do GMPc ativa moléculas efetoras como proteínas quinases dependentes de GMPc (PKG) e canais iônicos (Snyder & Ferris, 2000; Friebe & Koesling, 2003). Acredita-se que o NO, através dessa via, promoveria vários efeitos, como a modulação da liberação de neurotransmissores, influenciando assim vários sistemas de neurotransmissão (Kiss, 2000).

Estudos de hibridização *in situ* e imunohistoquímica indicam que a nNOS, bem como a sGC, estão amplamente distribuídas no SNC, com significativa expressão em algumas estruturas envolvidas com a resposta comportamental ao estresse, tais como córtex pré-frontal, hipocampo, estriado (CPu e NAc), habênula, SCP, núcleos amigdalóides, tálamo, núcleos da rafe, área septal, LC e PVN (Nakane et al., 1983; Vincent & Kimura, 1992; Rodrigo et al., 1994; Iwase et al., 1998; De

Vente et al., 1998). É importante mencionar que, em algumas dessas estruturas, a nNOS está expressa particularmente em neurônios monoaminérgicos (Johnson & Ma, 1993), sugerindo que o NO seja um importante regulador dos níveis de monoaminas no SNC.

A hipótese inicial a cerca de um provável envolvimento do NO na neurobiologia da depressão foi formulada com base em trabalhos que demonstravam que o tratamento sistêmico com antagonistas de receptores NMDA induziam efeito tipo-antidepressivo em modelos animais de depressão (Paul & Skolnick, 1990; Petrie et. al., 2000). De fato, Jefferys e Funder (1996) demonstraram pioneiramente que a administração sistêmica de inibidor não seletivo da NOS (L-NAME) induzia efeito tipo-antidepressivo no modelo do nado forçado em ratos, de reversível pelo pré-tratamento com L-arginina, sugerindo, portanto, que esse efeito seria devido à inibição da síntese de NO. Esse efeito parece ser mediado pela nNOS já que o tratamento com 7-NI, um inibidor preferencial dessa enzima, induziu efeito tipo-antidepressivo, de maneira dependente da dose, no modelo do nado forçado (Yildiz et. al., 2000). Posteriormente, esse efeito foi também observado em outros modelos animais de depressão, como o desamparo aprendido (Joca et. al., 2008) e o estresse crônico brando (Zhu et. al., 2007).

Reforçando, ainda, a hipótese de envolvimento do NO na neurobiologia da depressão, foi demonstrado que a inibição sistêmica da sGC promoveu efeito tipo-antidepressivo em modelos animais (Eroglu & Çaglayan, 1997; Heiberg et. al., 2002) e em humanos promoveu melhora significativa do humor em pacientes deprimidos (Naylor et. al., 1987).

Além disso, em humanos deprimidos, foi relatado aumento da expressão da nNOS no hipocampo (Oliveira et. al., 2008) e níveis séricos elevados de NO₂ e NO₃, metabólitos do NO (Suzuki et. al., 2001; Lee et al., 2006). Em animais estressados, observa-se aumento da produção de NO em estruturas que podem estar envolvidas com a neurobiologia da depressão, como por exemplo, córtex pré-frontal (CPF) (Ishizuka et. al., 2000; Eren et. al., 2007), hipotálamo (Shirakawa et. al., 2004; Rivier, 2001) e hipocampo (Harvey et. al., 2005; Zhou et. al., 2007).

Diante dessas evidências, é possível sugerir um importante papel do sistema nitrérgico na neurobiologia da depressão (Bernstein et. al., 2005). Contudo, as estruturas encefálicas envolvidas nesse processo permanecem não investigadas.

4 – Modelo do Nado Forçado

Ao longo dos últimos 50 anos, muitos modelos animais de estresse incontrolável têm sido desenvolvidos, sendo cruciais para a descoberta e desenvolvimento de fármacos clinicamente eficazes para o tratamento do transtorno depressivo (Willner, 1990; Mathews et. al., 2005; McArthur & Borsini, 2006). Dentre os modelos experimentais empregados, destaca-se o modelo do nado forçado que continua sendo um dos mais utilizados para o teste com antidepressivos, visto que, possui boa confiabilidade e validade preditiva, além de ser um modelo de fácil execução e baixo custo financeiro (Cryan et al., 2002).

O teste do nado forçado (*test swimming forced* - FST) envolve eventos estressantes inescapáveis, assim como outros modelos, porém tem como vantagem ser mais rápido e não estar associado ao emprego de estímulos dolorosos (Graeff & Guimarães, 1999). O método consiste em um pré-teste (PT), onde o animal é

colocado para nadar por 15 minutos sem a possibilidade de escapar e, após 24 horas (h), faz-se um teste (T) de 5 minutos (min) nas mesmas condições ao dia anterior, porém, nesse último, se quantifica o tempo de imobilidade (TI) do animal (Porsolt et. al. 1977). O tratamento com drogas antidepressivas, independente da classe farmacológica, diminui o TI, sendo isso considerado um efeito tipo-antidepressivo no modelo (Cryan et al., 2002).

Contudo, a discussão maior em torno desse modelo refere-se ao tratamento empregado que consiste em três injeções administradas entre PT e T, considerado por muitos como subagudo, sendo que os efeitos terapêuticos dos antidepressivos em humanos necessitam de algumas semanas para se tornarem aparentes (Porsolt et. al., 1979; Cryan et al., 2002). Ainda assim, esse continua sendo o modelo animal mais utilizado para o estudo da neurobiologia da depressão e para o teste de novos compostos com potencial efeito antidepressivo (Cryan et al., 2002).

5 – Proteína Fos

A estimulação de neurônios ativa vias responsáveis por processar e transmitir informações (Herdegen & Leah, 1998). Uma das possibilidades dessa ativação ocorre frente à aplicação de estímulos estressantes que, por sua vez, induzem a expressão de proto-oncogenes, como o *c-fos*, de forma rápida e específica em diversas estruturas encefálicas (Pakac & Palkovitz, 2001). A proteína Fos, produto do gene *c-fos* (Sandner et. al., 1992), é sintetizada no citoplasma e dirige-se ao núcleo neuronal onde permanece por um curto espaço de tempo (Sandner et. al., 1992). A presença dessa proteína em estruturas encefálicas permite sugerir que as mesmas foram ativadas frente ao estímulo empregado, sendo uma ferramenta

experimental importante para o estudo de vias neurais que participam da resposta ao estresse apresentado (Herrera et. al., 1996; Senba & Ueyama, 1997; Hoffman & Lyo, 2002).

Porém, assim como outras técnicas, a marcação para Fos apresenta algumas limitações como, por exemplo: 1-não são todos os neurônios que expressam os proto-oncogenes de modo que a ausência de marcação não necessariamente indica ausência de atividade neuronal; 2-podem ocorrer falso-positivos, já que a indução de um proto-oncogenese não está associada exclusivamente com atividade neuronal (exemplo: estimulação endócrina, pode às vezes implicar na expressão de proto-oncogenese); 3- como não é possível detectar alterações muito rápidas, a resolução temporal se mostra limitada (Farivar et.al., 2004).

No entanto, desde sua descoberta, a indução de Fos se faz uma ferramenta importante quando o intuito é o mapeamento funcional da atividade neuronal em estruturas responsáveis por alterações neuroendócrinas, autonômicas e comportamentais induzidas pelo estresse (Kovacs, 1998). Sob condições basais, os níveis detectáveis do RNAm para c-fos assim como da proteína Fos são muito baixos (Hughes et. al., 1994) e isso, aliado a indução rápida da transcrição, são as principais características que fazem desse proto-oncogenese um excelente marcador da atividade neuronal (Kovacs, 1998).

Em relação ao estresse, diversos trabalhos demonstram que a exposição de animais a algum tipo de estresse aumenta a expressão de Fos em diversas estruturas encefálicas, dentre elas destacam-se: estriado, habênula, hipotálamo lateral, núcleo paraventricular do hipotálamo, núcleo paraventricular do tálamo, amígdala, substância cinzenta periaquedutal (SCP), núcleo do leito da estria terminal (BNST), núcleos da rafe e locus coeruleus (Lino de Oliveira et. al., 2006; Beijamini e Guimarães, 2006a; Beijamini e Guimarães, 2006b; Lim et. al., 2009; Shoji et. al.,

2010; McDevitt et. al., 2009). Além disso, o tratamento com drogas antidepressivas modula a expressão de Fos induzida pelo estresse na maioria dessas estruturas (Beck & Figiber 1995, Duncan ET al., 1996; Amir et. al., 1997, Lino-de-Oliveira et. al., 2001, Salchner et. al., 2004, Lino-de-Oliveira et. al., 2006). Dessa maneira, tais estruturas são frequentemente associadas à resposta comportamental e/ou fisiológica ao estresse e à neurobiologia da depressão.

Por essas razões, essa ferramenta se faz útil quando o objetivo é promover o mapeamento funcional de áreas ativadas em várias regiões do organismo dentre elas, o SNC, propiciando, informações valiosas como, por exemplo, a elucidação de áreas encefálicas afetadas por determinada classe de droga ou situação experimental (Morgan & Curran, 1991).

6. Hipótese

Diante do exposto, acreditamos que a exposição ao estresse de nado forçado promoverá ativação de áreas do SNC relacionadas à resposta emocional ao estresse, a qual será atenuada pelo tratamento com antidepressivos, bem como com inibidor da síntese de NO.

OBJETIVOS

Objetivos gerais

Esse projeto teve como objetivo principal identificar possíveis estruturas encefálicas envolvidas no efeito antidepressivo induzido pela inibição da síntese de NO. Para tanto, investigaremos o padrão de expressão de Fos no encéfalo de animais tratados com um inibidor preferencial da nNOS e submetidos ao modelo do nado forçado.

Objetivos específicos

- Avaliar os efeitos dos tratamentos com antidepressivos convencionais como Fluoxetina, um inibidor seletivo da recaptação de 5-HT e Venlafaxina, um inibidor da recaptação de 5-HT e NOR e compará-los com um inibidor preferencial da nNOS (7-NI) sobre a expressão de Fos em estruturas encefálicas envolvidas com a resposta emocional ao estresse, em animais não estressados.
- Avaliar os efeitos dos mesmos tratamentos (Fluoxetina, Venlafaxina e 7-NI) sobre a expressão de Fos em estruturas encefálicas envolvidas com a resposta emocional ao estresse, em animais submetidos ao nado forçado.

METODOLOGIA

1- Animais

Foram utilizados ratos Wistar, 200 a 220 gramas, provenientes do Biotério da FCFRP-USP. Os animais foram mantidos aos pares, em caixas de acrílico, no Laboratório de Farmacologia da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo (FCFRP-USP), em condições controladas: temperatura ($23 \pm 1^\circ\text{C}$), ciclo de luz (acesas das 06h00min às 18h00min), sem privação de alimento e água. Os procedimentos experimentais descritos nesse trabalho foram avaliados pelo comitê de ética local, tendo sido aprovados (protocolo nº 145/2008).

2 - Drogas

- Fluoxetina (FLX, Sigma), inibidor seletivo da recaptação de 5-HT, na dose de 10 mg/kg, intra-peritonal (i.p.) (Renerick & Lucki, 1998).

- Venlafaxina (VLF, Eurofarma), inibidor da recaptação de 5-HT e NOR, na dose de 10 mg/kg, i.p. Essa dose foi estabelecida com base em experimentos preliminares realizados em nosso laboratório.

- 7-nitroindazol (7-NI, Sigma), inibidor preferencial da nNOS, na dose de 30 mg/kg, i.p. (Yildiz et. al., 2000).

OBS: as drogas foram diluídas em salina (FLX e VLF) e dimetil sulfóxido (DMSO) 20% (7-NI), imediatamente antes do uso.

3 – Desenho experimental

3.1 - Nado Forçado

O estressor incontrolável utilizado no presente trabalho foi o nado forçado, um modelo animal preditivo de efeitos antidepressivos (Porsolt et. al., 1977) que consistiu em uma sessão onde o animal foi colocado em balde com água (30 cm, $24 \pm 1^\circ\text{C}$), durante 15 min (PT, pré-teste) e uma sessão de teste (T), 5 min de nado, realizada 24h depois. Durante T foi registrado o tempo de imobilidade (TI) do animal na água (TI: quando o animal realizava apenas os movimentos necessários para mantê-lo com a cabeça acima da água). Trabalhos mostram que o tratamento subagudo com antidepressivos de diferentes classes reduz o TI (Porsolt et. al., 1978).

3.2 - Imunohistoquímica

Duas horas após o teste (grupos estressados) ou três horas após a última administração de droga (grupos não estressados), os animais foram anestesiados com uretana (Sigma, 25%, 5 ml/Kg de peso), perfundidos com solução de paraformaldeído 4% fosfatado e tamponado em PBS 0,1 M, pH 7,4. Os encéfalos foram removidos e processados conforme procedimento descrito por Aguiar 2008. Inicialmente, obtiveram-se cortes representativos, em duplicata, das seguintes regiões: CPF (bregma 3.20mm a 2.70mm), área septal lateral e medial (bregma 0.20mm), estriado dorsal e ventral (bregma 1.60mm a 1.00mm), núcleo intersticial da estria terminal (BNST) (bregma -0.30mm a -0.40mm), núcleo paraventricular do hipotálamo (PVN) (bregma -1.40mm a -1.80mm), habênula (bregma -3.30mm a -3.60mm), núcleo paraventricular do tálamo (bregma -3.30mm a -3.60mm), hipocampo dorsal (bregma -3.30mm a -3.60mm) e ventral (bregma -4.30mm a -4.52mm), amígdala basolateral, lateral e medial (bregma -3.30mm a -3.60 mm), substância cinzenta periaquedutal dorsolateral (SCPdl) (bregma -7.80mm a -

8.00mm), núcleos dorsal (NDR) (bregma -7.80mm a -8.00mm) e mediano da rafe (NMR) (bregma -7.80mm a -8.00mm) e lócus coeruleus (bregma -9.68mm a -9.80mm) (Paxinos & Watson, 1997).

As secções obtidas foram, então, pré-tratadas com água oxigenada (H₂O₂) 1% em TBS 0,05M por 10 minutos, para a redução da atividade da peroxidase endógena e posteriormente realizaram-se quatro lavagens de 5 minutos cada com TBS 0,05M (pH 7,4). Em seguida os cortes foram incubados com soro albumina bovina (BSA)1% em TBS 0,05M acrescido de Triton-X 0,02% (TBS-T), durante 30min, a fim de bloquear os sítios de ligações inespecíficas. Após, os cortes foram incubados à temperatura ambiente com um anticorpo primário policlonal de coelho anti-Fos (1:1000, Santa Cruz Biotechnology). Decorridas 15h dessa incubação, os cortes foram novamente lavados por três vezes de 5 minutos com TBS 0,05M e incubadas por mais 1h com anticorpo secundário biotilado (1:1000). Os anticorpos foram diluídos em TBS-T + BSA, à temperatura ambiente e submetidos à agitação constante. Para remoção do anticorpo secundário foi realizada três lavagens de 5 min. cada em TBS 0,05M e em seguida os cortes foram incubados por 1 h e 30 min com o complexo avidina – biotina peroxidase (ABC) (1:1500). Terminado o processo descrito acima a atividade da peroxidase foi revelada com o uso de tetracloreto de 3'3'3 – diaminobenzidina (DAB) contendo H₂O₂ 0,02%. Finalmente, após adequadamente lavadas, as lâminas foram desidratadas através de uma série de alcoóis (70%, 80%, 95% e 100%, 5 minutos cada), clareadas no xilol (duas x 10 minutos) e cobertas com Permount e lamínulas.

A imunorreatividade para Fos (Fos-IR) foi visualizada como um produto marrom depositado no interior dos núcleos neuronais. Os resultados foram expressos como a média de neurônios/secção/estrutura/área. A contagem e o

cálculo foram realizados da maneira descrita por Aguiar (2009). O número de células apresentando Fos-IR foi obtido de ambos os lados do cérebro, em áreas pré-fixadas para cada estrutura. A contagem foi realizada com o auxílio de um sistema computadorizado de análise de imagem (Image Pro-Plus 6.0, Media Cybernetics).

3.3 – Grupos experimentais

3.3.1- Efeitos dos tratamentos com VLF, FLX ou 7-NI sobre a expressão de Fos em animais não estressados.

Os animais foram divididos em quatro grupos independentes, sendo que cada grupo foi composto por oito animais que receberam um dos seguintes tratamentos: veículo, VLF, FLX ou 7NI. Esses animais receberam três injeções i.p. de droga ou veículo nos tempos 0h, 5h e 23h. Três horas após a última administração de droga, os animais foram anestesiados e perfundidos para posterior remoção do encéfalo e realização dos estudos de IHQ.

3.3.2. – Efeitos dos tratamentos com VLF, FLX ou 7-NI sobre a expressão de Fos em animais estressados.

Os animais foram divididos em quatro grupos independentes, sendo que cada grupo foi composto por oito animais que receberam um dos seguintes tratamentos: veículo, VLF, FLX ou 7NI. Esses animais foram submetidos a um pré-teste e posteriormente receberam injeções i.p. de droga ou veículo nos tempos 0h, 5h e 23h (em relação ao PT). Uma hora após a última administração, os animais foram submetidos ao T (Porsolt, 1978). Duas horas após o T, os animais foram anestesiados e perfundidos para posterior remoção do encéfalo e realização dos estudos de IHQ.

3.3.3 – Grupo Avaliação da expressão basal de Fos

Paralelamente ao período de cada experimento, foi mantido no biotério um grupo de animais sem tratamento e sem estresse (*naive*) que foi posteriormente sacrificado para um controle da expressão basal da proteína Fos. Esses animais foram anestesiados e perfundidos para posterior remoção do encéfalo e realização dos estudos de IHQ.

3.4- Análise dos Dados

Os resultados comportamentais do FST foram analisados por ANOVA de uma via seguida de pós-teste de Tukey.

Os resultados obtidos na quantificação da proteína Fos para cada estrutura foram analisados por ANOVA de duas vias, sendo os fatores tratamento e estresse. Em caso de interação entre os fatores, essa análise foi seguida por ANOVA de uma via e do pós-teste de Tukey. Foram consideradas significativas as diferenças em que $p < 0,05$.

RESULTADOS

O tratamento com FLX, VLF ou 7-NI reduziu significativamente o TI no FST ($F_{(4,29)} = 8,597$, $p < 0,05$) e também aumentou o tempo de latência dos animais ($F_{(4,29)} = 10,75$, $p < 0,05$) mostrando um efeito tipo-antidepressivo neste modelo. Os resultados estão representados na Figura 1.

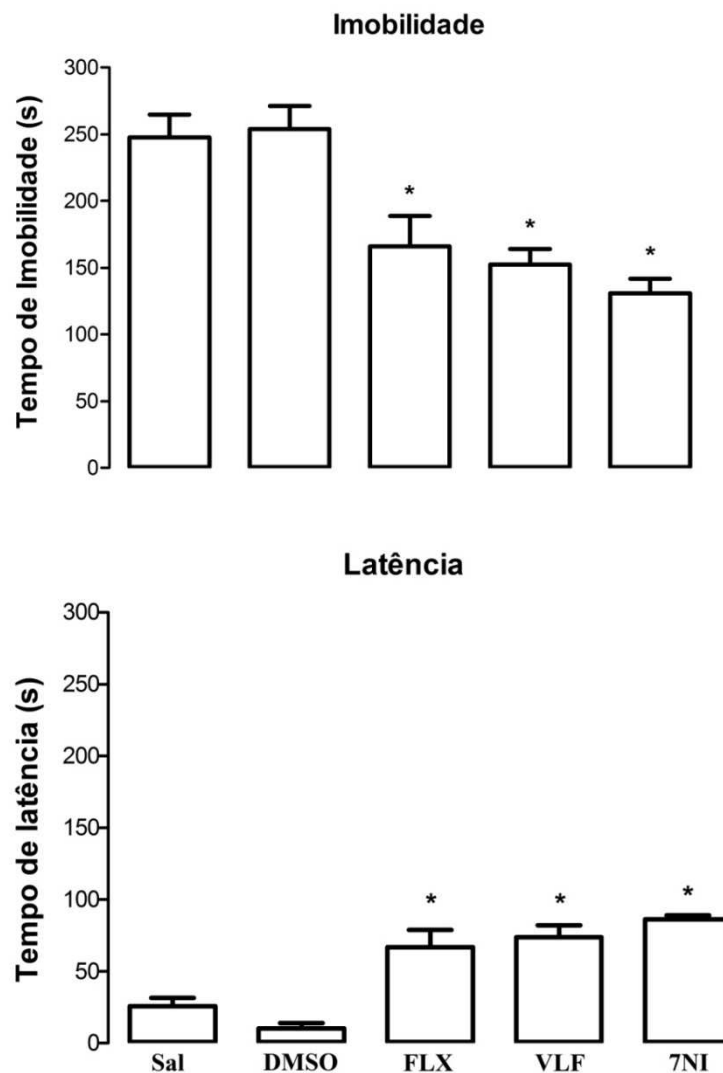


Figura 1: Efeito dos tratamentos com FLX (10 mg/kg), VLF (10mg/kg) ou 7-NI (30mg/kg) sobre o tempo de imobilidade (s) e tempo de latência (s) (para 1ª imobilidade) em ratos (n= 8-9) submetidos ao teste do nado forçado. Os valores representam a média \pm E.P.M. * $p < 0,05$ em relação ao grupo veículo (salina-Sal e DMSO) (ANOVA de uma via seguida de Tukey).

Não houve diferença significativa na expressão de Fos nas estruturas encefálicas analisadas nos animais não estressados, tratados com Veículo, FLX, VLF ou 7-NI. Porém, em animais estressados observou-se aumento da expressão de Fos que foi atenuado pelo tratamento com 7-NI, FLX ou VLF, quando comparados ao veículo, na maioria das estruturas avaliadas.

Ao analisarmos estatisticamente as porções cingulada (CG), infra-límbica (IL) e pré-límbica (PL), do CPF, realizando análise estatística ANOVA de duas vias verificamos interação entre os fatores estresse e tratamento: CG ($F_{(4,55)} = 27,79$, $p < 0,05$), PL ($F_{(4,55)} = 15,74$ $p < 0,05$) e IL ($F_{(4,55)} = 8,26$ $p < 0,05$); como também efeito do fator tratamento: CG ($F_{(4,55)} = 28,75$ $p < 0,05$), PL ($F_{(4,55)} = 16,06$ $p < 0,05$) e IL ($F_{(4,55)} = 8,01$ $p < 0,05$) e do fator estresse: CG ($F_{(1,55)} = 59,14$ $p < 0,05$), PL ($F_{(1,55)} = 27,35$ $p < 0,05$) e IL ($F_{(1,55)} = 13,68$ $p < 0,05$). Diante dos resultados obtidos com a ANOVA de duas vias, foi realizada uma segunda análise estatística empregando-se uma ANOVA de uma via para comparar os efeitos dos tratamentos em animais estressados e não estressados. Nos animais estressados verificamos diferenças significativas entre os tratamentos nas três porções analisadas: CG ($F_{(4,20)} = 13,99$ $p < 0,05$), IL ($F_{(4,20)} = 4,344$ $p < 0,05$) e PL ($F_{(4,20)} = 8,408$ $p < 0,05$). Nos animais não estressados não foram observadas diferenças significativas entre os tratamentos CG ($F_{(4,35)} = 1,017$ $p > 0,05$), IL ($F_{(4,35)} = 0,509$ $p > 0,05$) e PL ($F_{(4,35)} = 0,1187$ $p > 0,05$). Os resultados estão representados na Figura 2A.

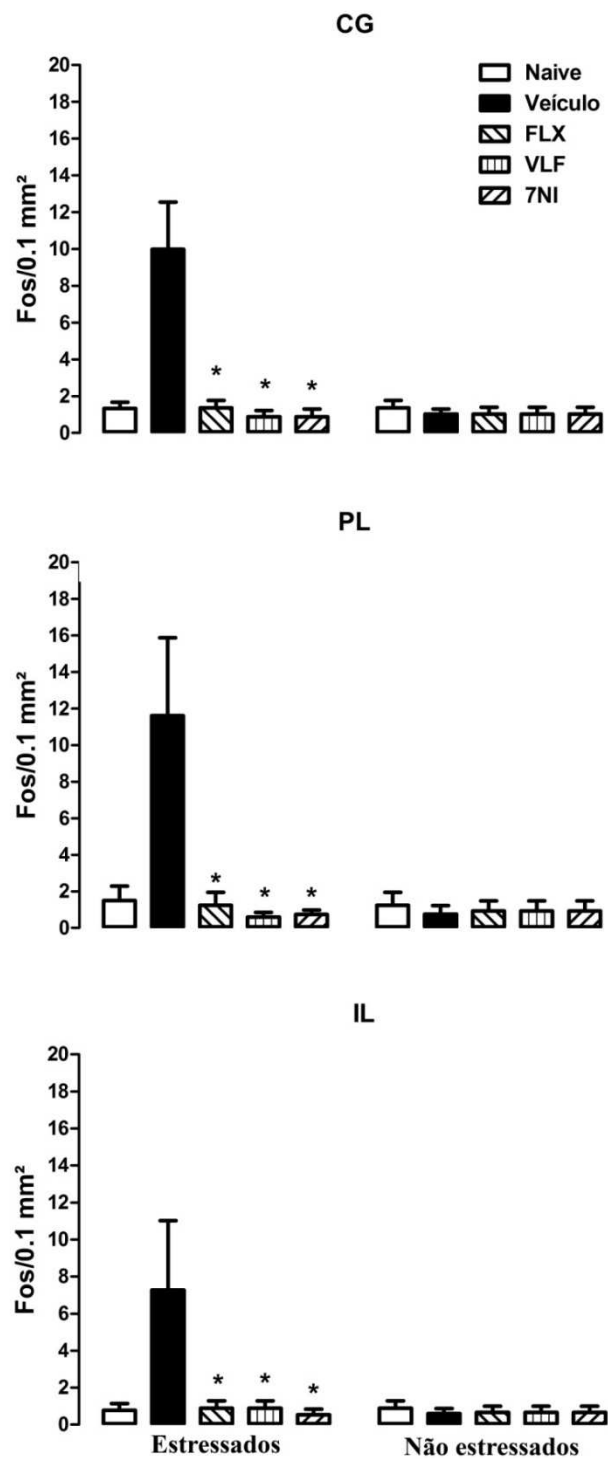


Figura 2A: Efeito dos tratamentos com FLX (10 mg/kg) , VLF (10mg/kg) ou 7-NI (30mg/kg) sobre o número de células Fos positivas nas porções CG, IL e PL do CPF de ratos (n= 4-10) submetidos ao FST ou somente tratados. Os animais naives não foram manipulados, nem submetidos ao nado. Os resultados representam média \pm E.P.M. do número de células positivas. * $p < 0,05$ em relação ao grupo veículo (salina e DMSO) (ANOVA de duas vias).

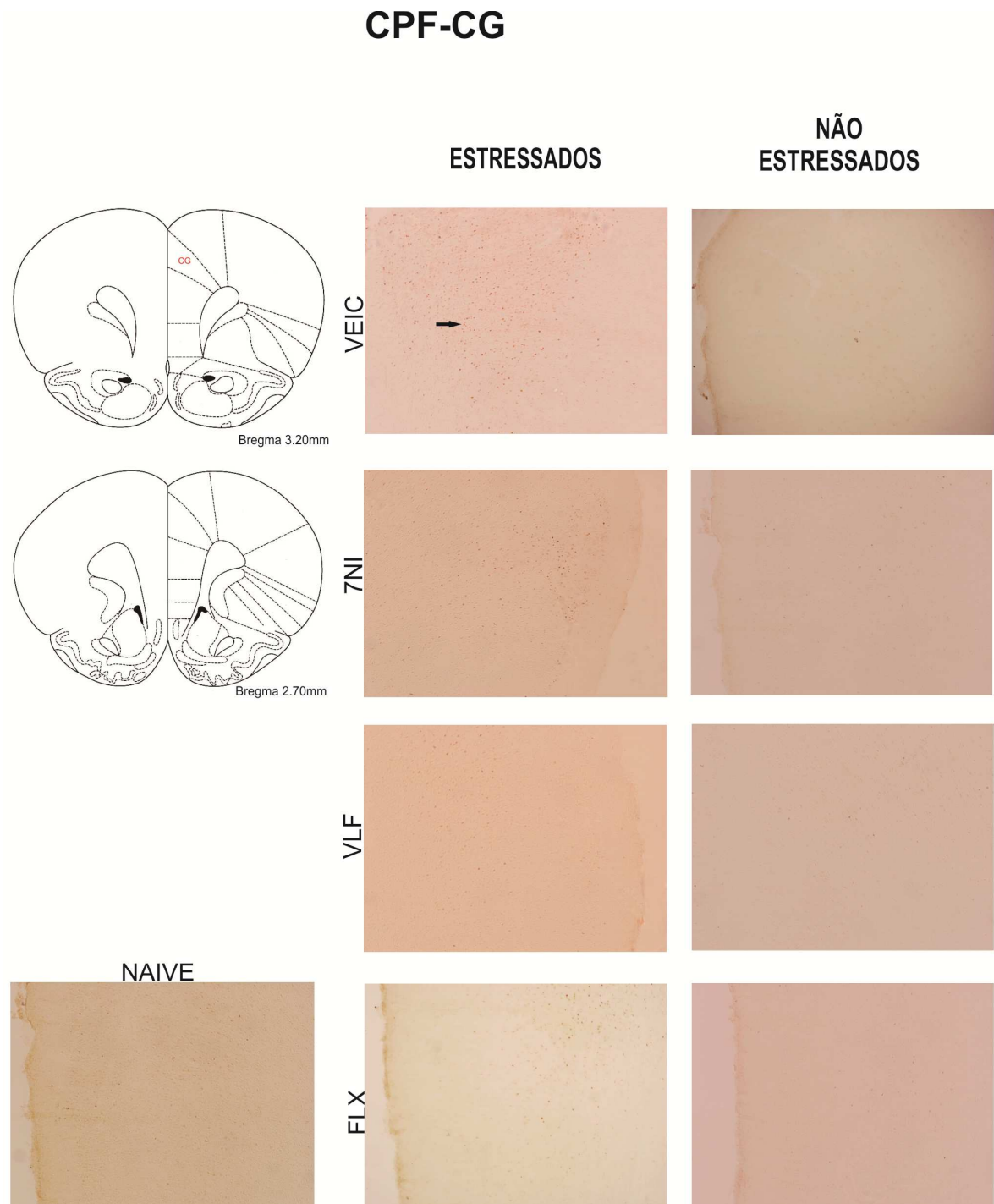


Figura 2B: Fotomicrografias representativas de secções coronais (40 μ m) da porção CG do CPF de um animal naive, de animais submetidos ao FST e tratados com FLX, VLF, 7-NI ou veículo e de animais somente tratados com FLX, VLF, 7-NI ou veículo, processadas para imunistoquímicas para a detecção da proteína Fos. A seta preta indica uma célula positiva para Fos.



Figura 2C: Fotomicrografias representativas de secções coronais (40 μm) da porção PL do CPF de um animal naive, de animais submetidos ao FST e tratados com FLX, VLF, 7-NI ou veículo e de animais somente tratados com FLX, VLF, 7-NI ou veículo, processadas para imunistoquímicas para a detecção da proteína Fos. A seta preta indica uma célula positiva para Fos.

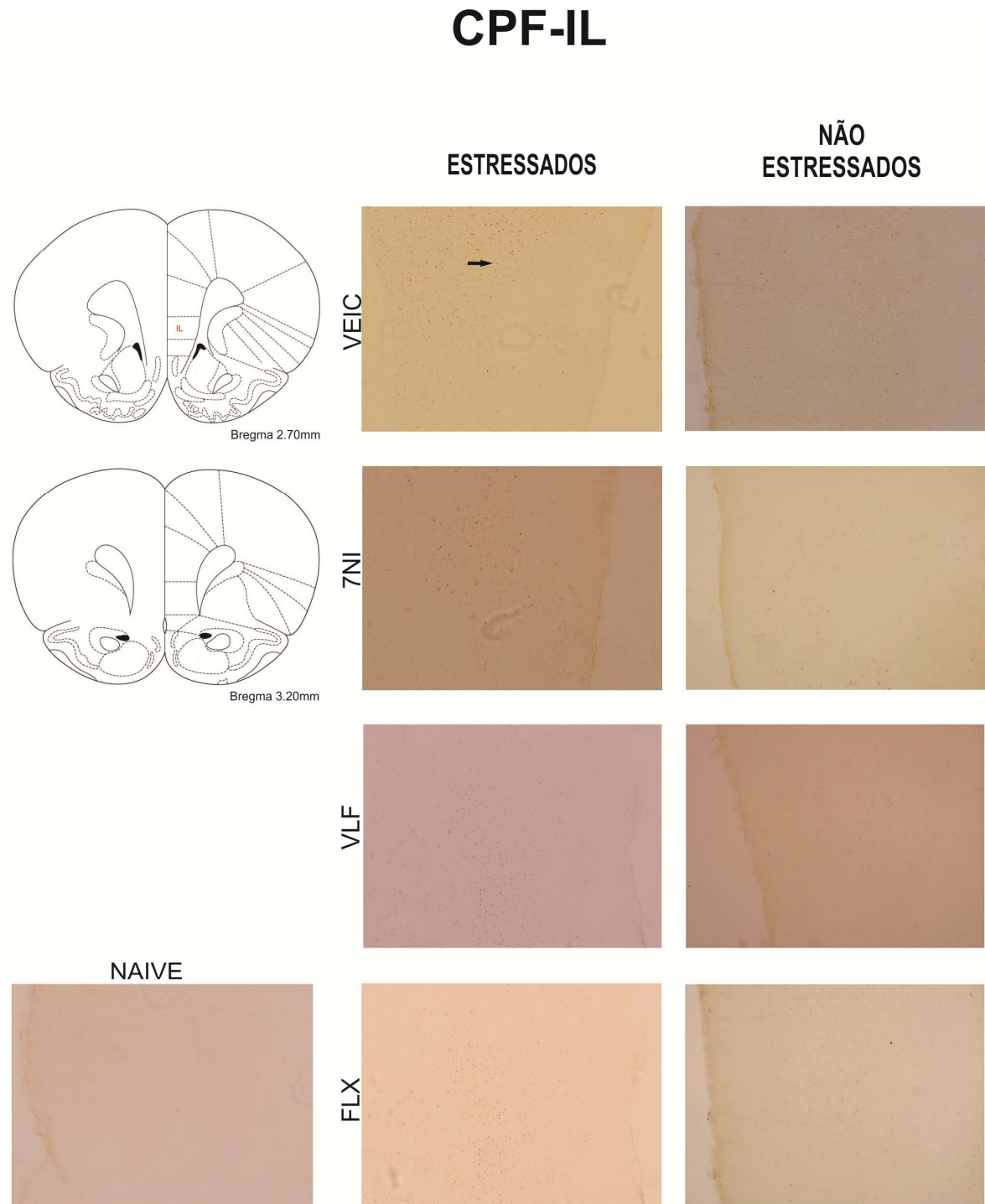


Figura 2D: Fotomicrografias representativas de secções coronais (40 μm) da porção IL do CPF de um animal naive, de animais submetidos ao FST e tratados com FLX, VLF, 7-NI ou veículo e de animais somente tratados com FLX, VLF, 7-NI ou veículo, processadas para imunistoquímicas para a detecção da proteína Fos. A seta preta indica uma célula positiva para Fos.

No caudato putamen, a ANOVA de duas vias mostrou interação entre os fatores estresse e tratamento: ($F_{(4,46)} = 6,20$ $p < 0,05$), como também efeito do fator

tratamento: ($F_{(4,46)} = 4,57$ $p < 0,05$) e fator estresse: ($F_{(1,46)} = 12,05$ $p < 0,05$). Com isso, foi realizada uma segunda análise estatística empregando-se uma ANOVA de uma via, para comparar os efeitos dos tratamentos nos animais estressados e não estressados. Nos animais estressados verificamos diferenças significativas entre os tratamentos: ($F_{(4,22)} = 5,231$ $p < 0,05$). Nos animais não estressados não foram observadas diferenças significativas entre os tratamentos ($F_{(4,29)} = 0,97$ $p > 0,05$).

No núcleo acumbens, também verificamos interação entre os fatores estresse e tratamento diante da realização da análise estatística ANOVA de duas vias, na porção Shell: ($F_{(4,46)} = 6,06$ $p < 0,05$), como também do fator tratamento: ($F_{(4,46)} = 6,63$ $p < 0,05$) e fator estresse: ($F_{(1,46)} = 6,31$ $p < 0,05$). Diante dos resultados obtidos com a ANOVA de duas vias, foi realizada uma segunda análise estatística empregando-se uma ANOVA de uma via, para comparar os efeitos dos tratamentos nos animais estressados e não estressados. Nos animais estressados verificamos diferenças significativas entre os tratamentos obtendo-se diferença significativa na porção shell: ($F_{(4,22)} = 6,876$ $p < 0,05$). Nos animais não estressados não foram observadas diferenças significativas entre os tratamentos: ($F_{(4,24)} = 1,37$ $p > 0,05$). Não houve marcação de Fos na porção core do núcleo acumbens e por isso não foi realizada a análise estatística. Os resultados estão representados na Figura 3A.

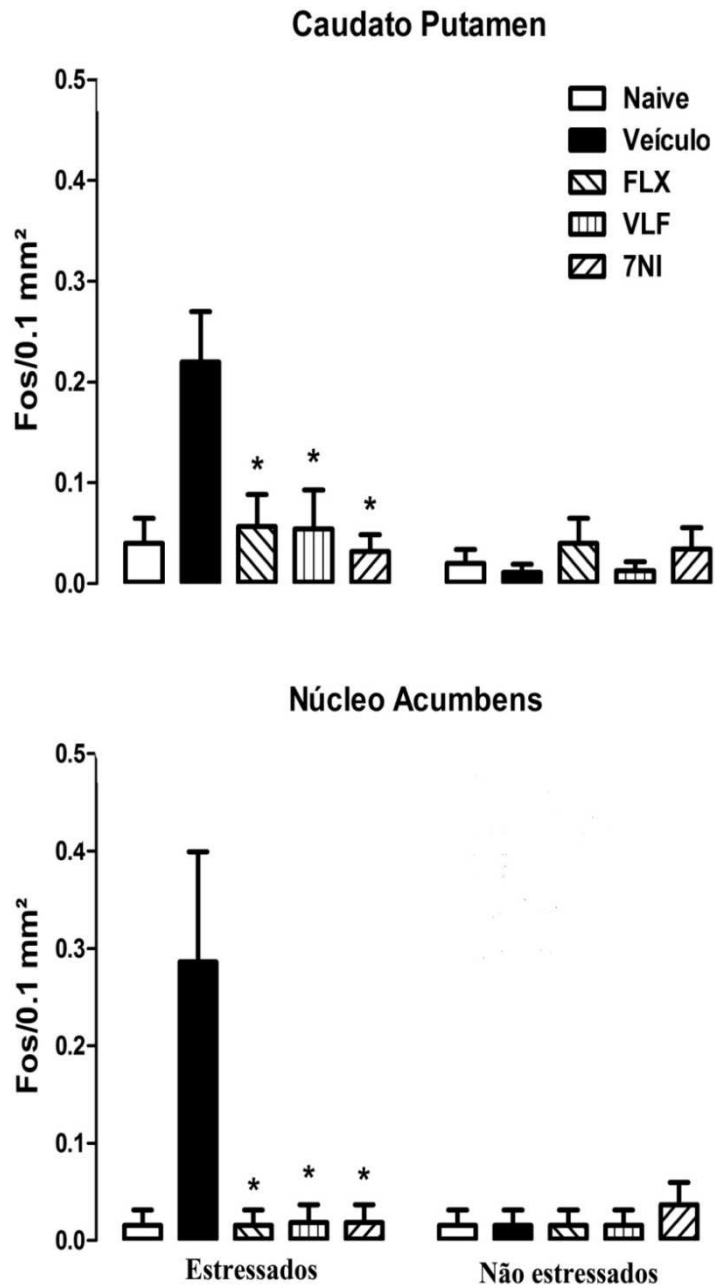


Figura 3A: Efeito dos tratamentos com FLX (10 mg/kg), VLF (10mg/kg) ou 7-NI-(30mg/kg) sobre o número de células Fos positivas no caudato putamen e núcleo acumbens de ratos (n= 4-9) submetidos ao FST ou somente tratados. Os animais naives não foram manipulados, nem submetidos ao nado. Os resultados representam média \pm E.P.M. do número de células positivas. * $p < 0,05$ em relação ao grupo veículo (salina e DMSO) (ANOVA de duas vias).

Caudato Putamen

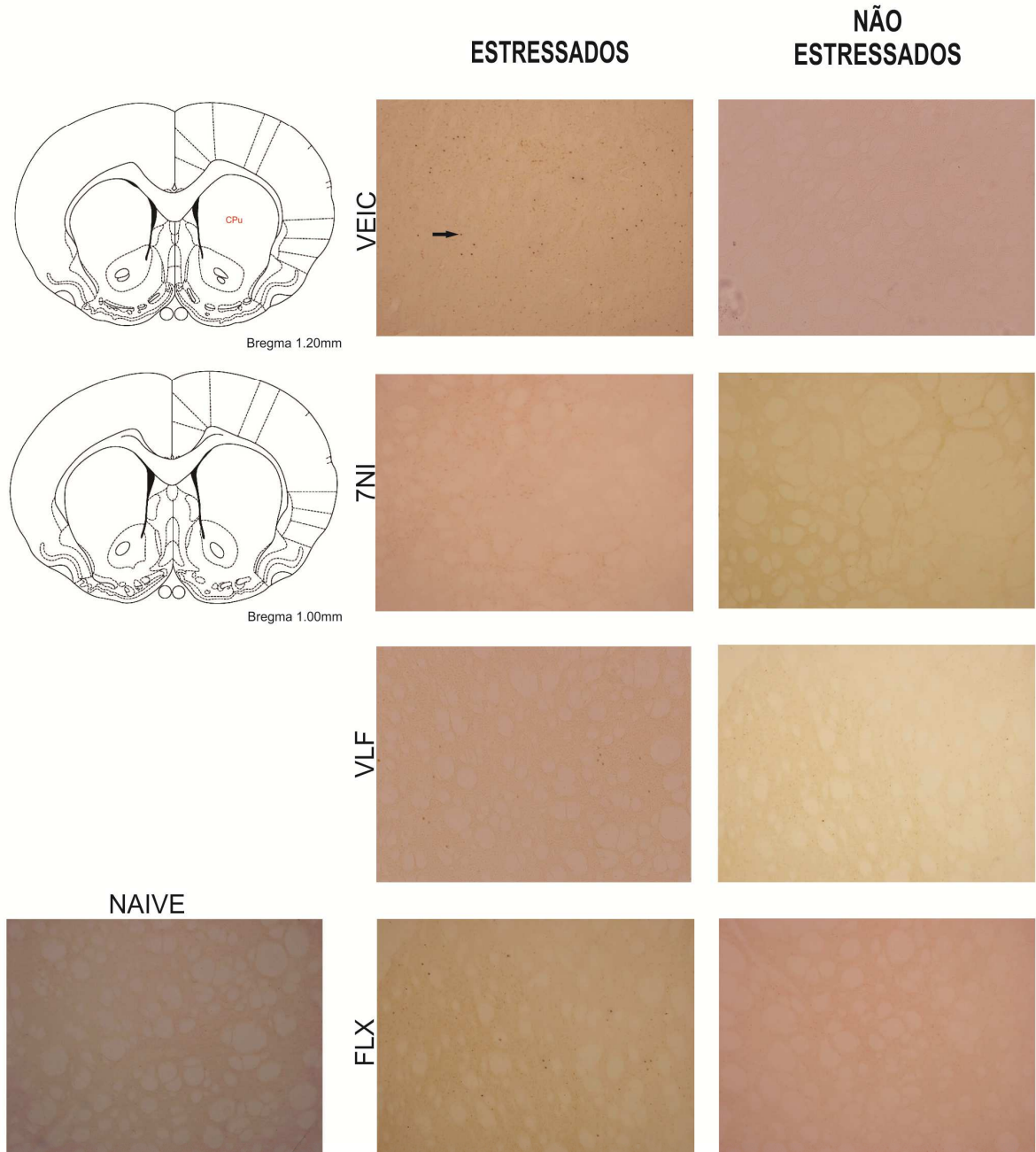


Figura 3B: Fotomicrografias representativas de secções coronais (40 μ m) do caudato putamen de um animal naive, de animais submetidos ao FST e tratados com FLX, VLF, 7-NI ou veículo e de animais somente tratados com FLX, VLF, 7-NI ou veículo, processadas para imunistoquímicas para a detecção da proteína Fos. A seta preta indica uma célula positiva para Fos.

NÚCLEO ACUMBENS

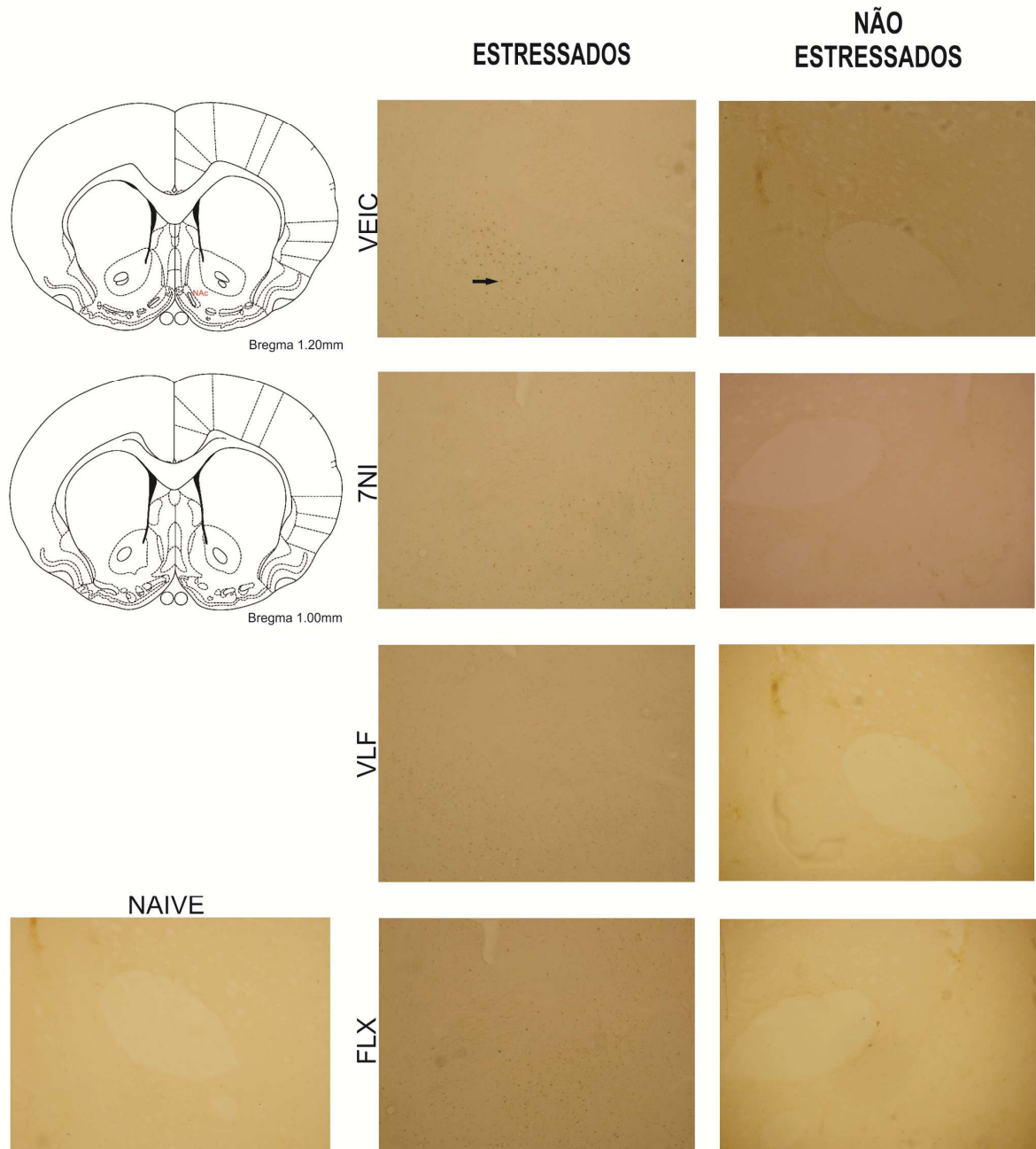


Figura 3C: Fotomicrografias representativas de secções coronais (40 μ m) do núcleo acumbens de um animal naive, de animais submetidos ao FST e tratados com FLX, VLF, 7-NI ou veículo e de animais somente tratados com FLX, VLF, 7-NI ou veículo, processadas para imunistoquímicas para a detecção da proteína Fos. A seta preta indica uma célula positiva para Fos.

Houve interação entre os fatores na área septal lateral: ($F_{(4,47)} = 6,91$ $p < 0,05$), como também efeito do fator tratamento: ($F_{(4,47)} = 9,86$ $p < 0,05$) e do fator estresse: ($F_{(1,47)} = 11,97$ $p < 0,05$). Diante dos resultados obtidos com a ANOVA de duas vias, foi realizada uma segunda análise estatística empregando-se uma ANOVA de uma via, para comparar os efeitos dos tratamentos nos animais estressados e não estressados. Nos animais estressados verificamos diferenças significativas entre os tratamentos: ($F_{(4,23)} = 6,70$ $p < 0,05$). Nos animais não estressados não foram observadas diferenças significativas entre os tratamentos: ($F_{(4,25)} = 1,07$ $p > 0,05$). Não houve marcação de Fos na área septal medial e por isso não foi realizada a análise estatística. Os resultados estão representados na Figura 4A.

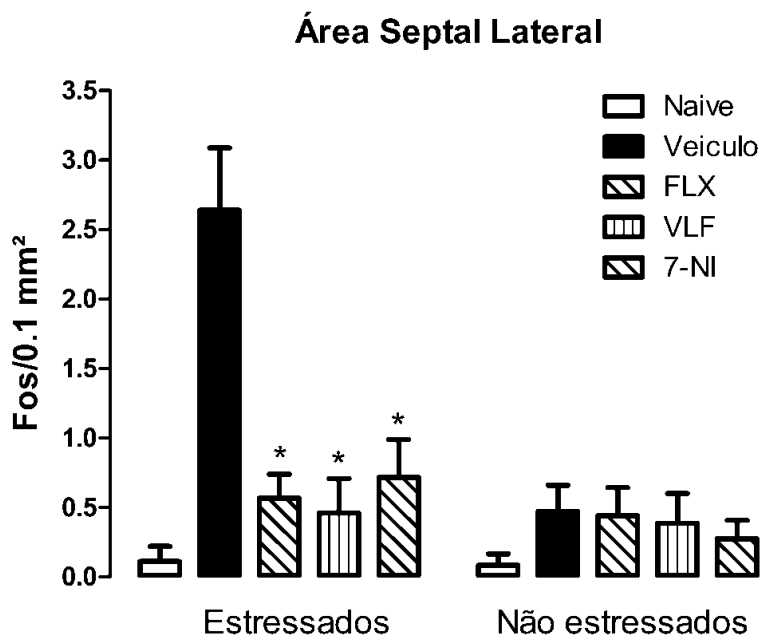


Figura 4A: Efeito dos tratamentos com FLX (10 mg/kg), VLF (10mg/kg) ou 7-NI (30mg/kg) sobre o número de células Fos positivas na área septal lateral de ratos ($n = 4-7$) submetidos ao FST ou somente tratados. Os animais naives não foram manipulados, nem submetidos ao nado. Os resultados representam média \pm E.P.M. do número de células positivas. * $p < 0,05$ em relação ao grupo veículo (salina e DMSO) (ANOVA de duas vias).

ÁREA SEPTAL LATERAL

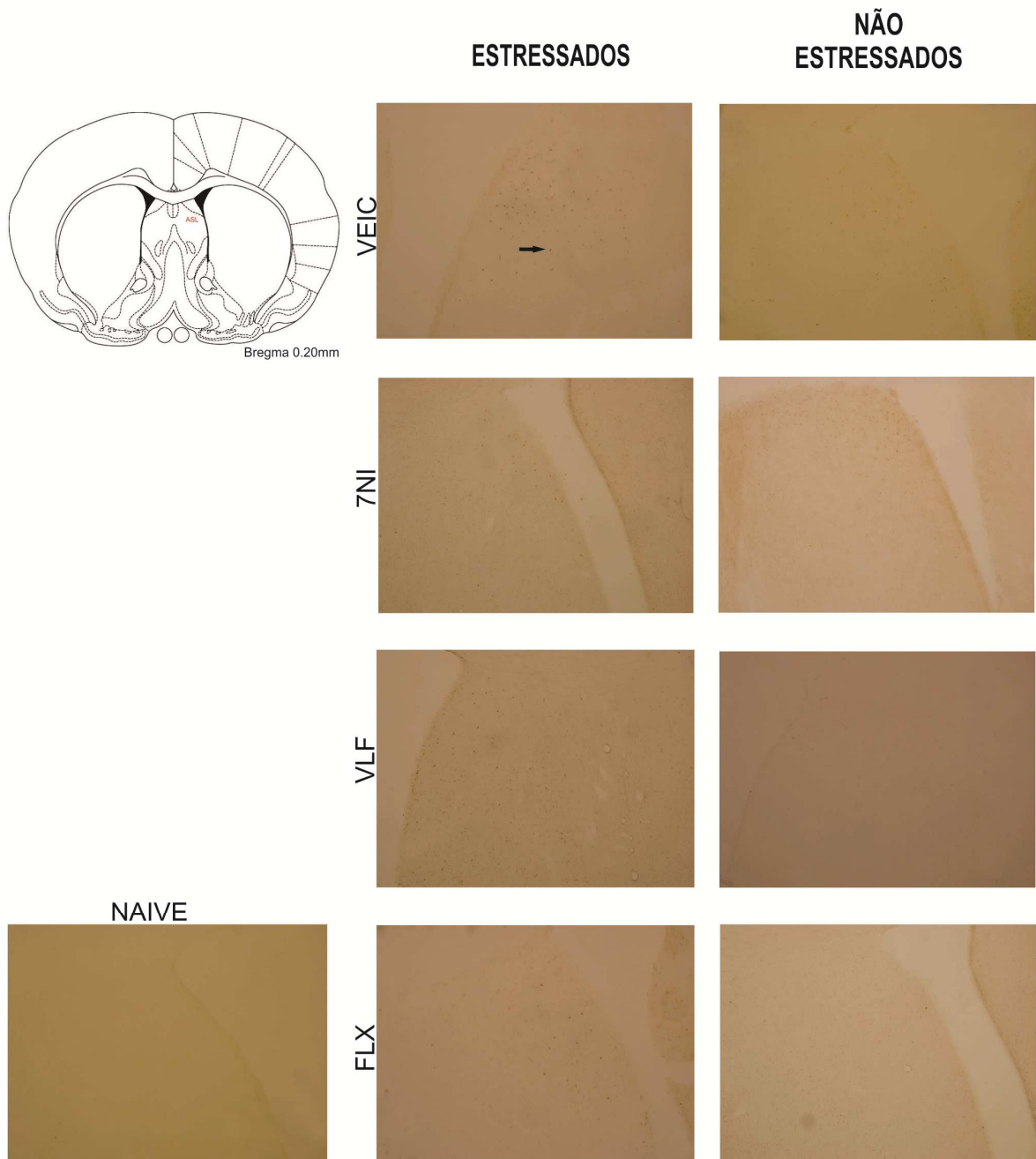


Figura 4B: Fotomicrografias representativas de secções coronais (40 μm) da área septal lateral de um animal naive, de animais submetidos ao FST e tratados com FLX, VLF, 7-NI ou veículo e de animais somente tratados com FLX, VLF, 7-NI ou veículo, processadas para imunistoquímicas para a detecção da proteína Fos. A seta preta indica uma célula positiva para Fos.

Houve interação entre os fatores no núcleo do leito da estria terminal (BNST): ($F_{(4,46)} = 8,16$ $p < 0,05$), como também efeito do fator tratamento: ($F_{(4,46)} = 11,77$ $p < 0,05$) e do fator estresse: ($F_{(1,46)} = 21,50$ $p < 0,05$). Diante dos resultados obtidos com a ANOVA de duas vias, foi realizada uma segunda análise estatística empregando-se uma ANOVA de uma via, para comparar os efeitos dos tratamentos nos animais estressados e não estressados. Nos animais estressados verificamos diferenças significativas entre os tratamentos: ($F_{(4,19)} = 4,706$ $p < 0,05$). Nos animais não estressados não foram observadas diferenças significativas entre os tratamentos: ($F_{(4,27)} = 1,63$ $p > 0,05$). Os resultados estão representados na Figura 5A.

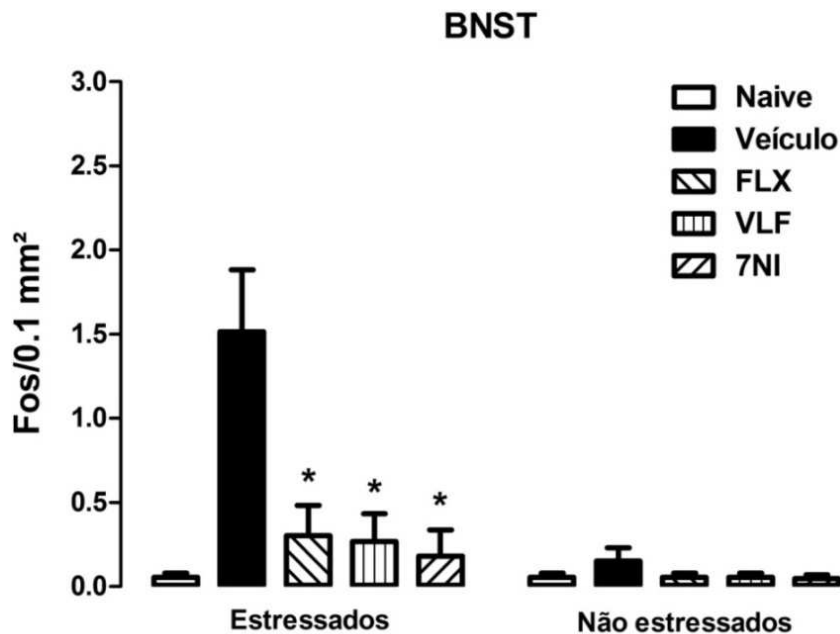


figura 5A: Efeito dos tratamentos com FLX (10 mg/kg), VLF (10mg/kg) ou 7-NI (30mg/kg) sobre o número de células Fos positivas no BNST de ratos ($n = 4-8$) submetidos ao FST ou somente tratados. Os animais naives não foram manipulados, nem submetidos ao nado. Os resultados representam média \pm E.P.M. do número de células positivas. * $p < 0,05$ em relação ao grupo veículo (salina e DMSO) (ANOVA de duas vias).

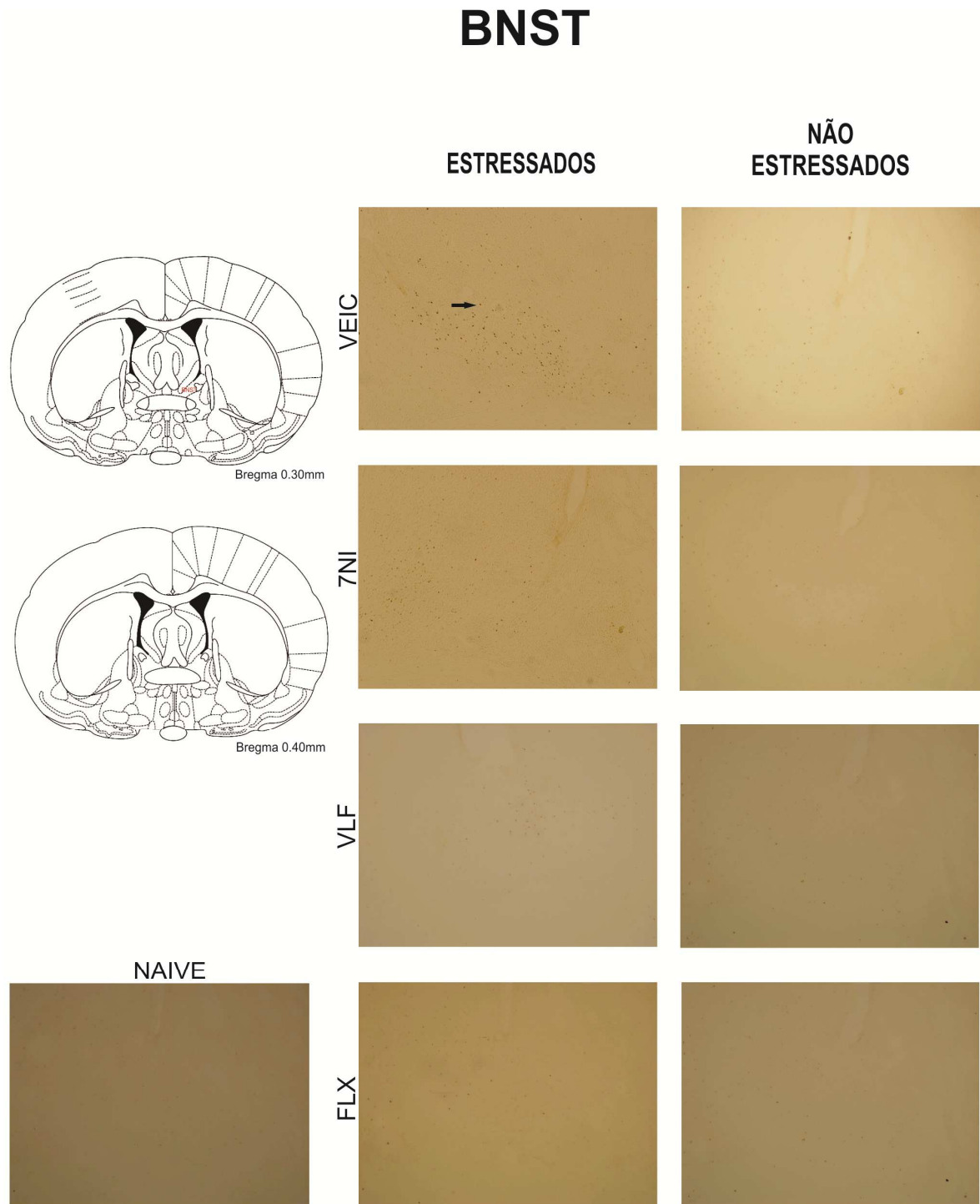


Figura 5B: Fotomicrografias representativas de seções coronais (40 μ m) do BNST de um animal naive, de animais submetidos ao FST e tratados com FLX, VLF, 7-NI ou veículo e de animais somente tratados com FLX, VLF, 7-NI ou veículo, processadas para imunistoquímicas para a detecção da proteína Fos. A seta preta indica uma célula positiva para Fos.

Na habênula, verificamos interação entre os fatores estresse e tratamento diante da realização da análise estatística ANOVA de duas vias: ($F_{(4,39)} = 10,09$

$p < 0,05$), como também efeito do fator tratamento: ($F_{(4,39)} = 12,27$ $p < 0,05$) e do fator estresse: ($F_{(1,39)} = 34,84$ $p < 0,05$). Diante dos resultados obtidos com a ANOVA de duas vias, foi realizada uma segunda análise estatística empregando-se uma ANOVA de uma via, para comparar os efeitos dos tratamentos nos animais estressados e não estressados. Nos animais estressados verificamos diferenças significativas entre os tratamentos: ($F_{(4,10)} = 6,204$ $p < 0,05$). Nos animais não estressados não foram observadas diferenças significativas entre os tratamentos: ($F_{(4,29)} = 0,29$ $p > 0,05$). Os resultados estão representados na Figura 6A.

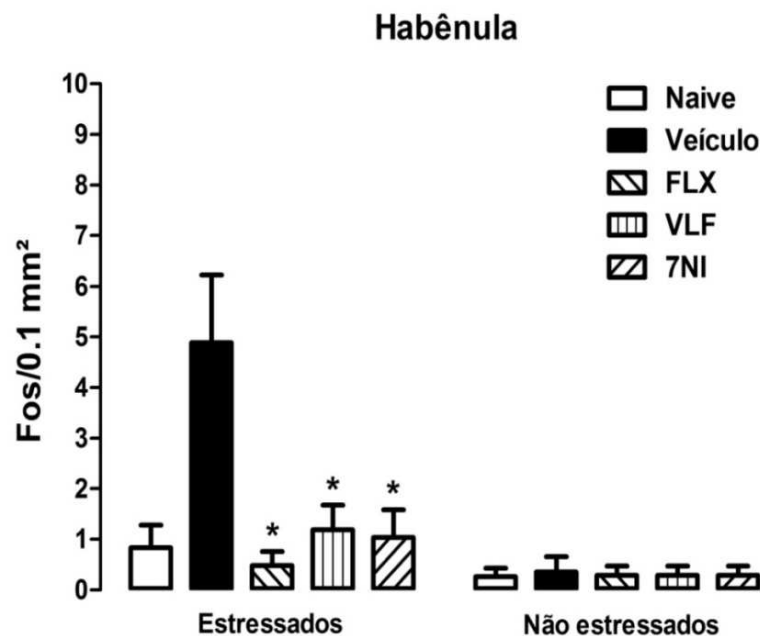


Figura 6A: Efeito dos tratamentos com FLX (10 mg/kg), VLF (10mg/kg) ou 7-NI (30mg/kg) sobre o número de células Fos positivas na habênula de ratos ($n = 4-9$) submetidos ao FST ou somente tratados. Os animais naives não foram manipulados, nem submetidos ao nado. Os resultados representam média \pm E.P.M. do número de células positivas. * $p < 0,05$ em relação ao grupo veículo (salina e DMSO) (ANOVA de duas vias).

HABÊNULA

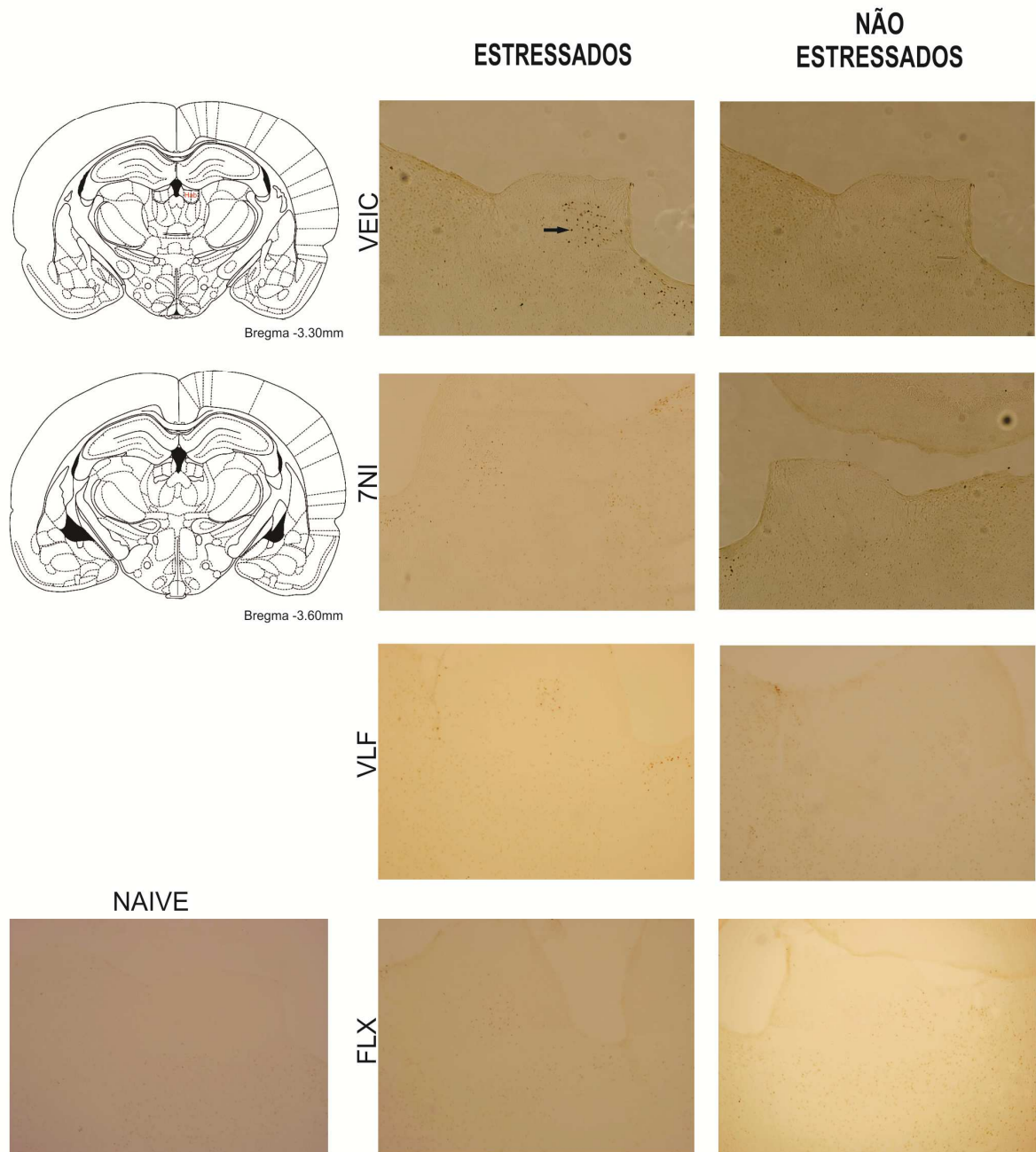


Figura 6B: Fotomicrografias representativas de secções coronais (40 μ m) da habenula de um animal naive, de animais submetidos ao FST e tratados com FLX, VLF, 7-NI ou veículo e de animais somente tratados com FLX, VLF, 7-NI ou veículo, processadas para imunistoquímica para a detecção da proteína Fos. A seta preta indica uma célula positiva para Fos.

O núcleo paraventricular do tálamo apresentou interação entre os fatores estresse e tratamento diante da ANOVA de duas vias: ($F_{(4,53)} = 4,87$ $p < 0,05$), como também do fator tratamento: ($F_{(4,53)} = 6,26$ $p < 0,05$) e fator estresse: ($F_{(1,53)} = 6,76$ $p < 0,05$). Com os resultados obtidos na ANOVA de duas vias, foi realizada uma ANOVA de uma via, para comparar os efeitos dos tratamentos entre animais estressados e não estressados. Nos animais estressados verificamos diferenças significativas entre os tratamentos: ($F_{(4,23)} = 4,407$ $p < 0,05$). Nos animais não estressados não foram observadas diferenças significativas entre os tratamentos ($F_{(4,30)} = 2,02$ $p > 0,05$). Os resultados estão representados na Figura 7A.

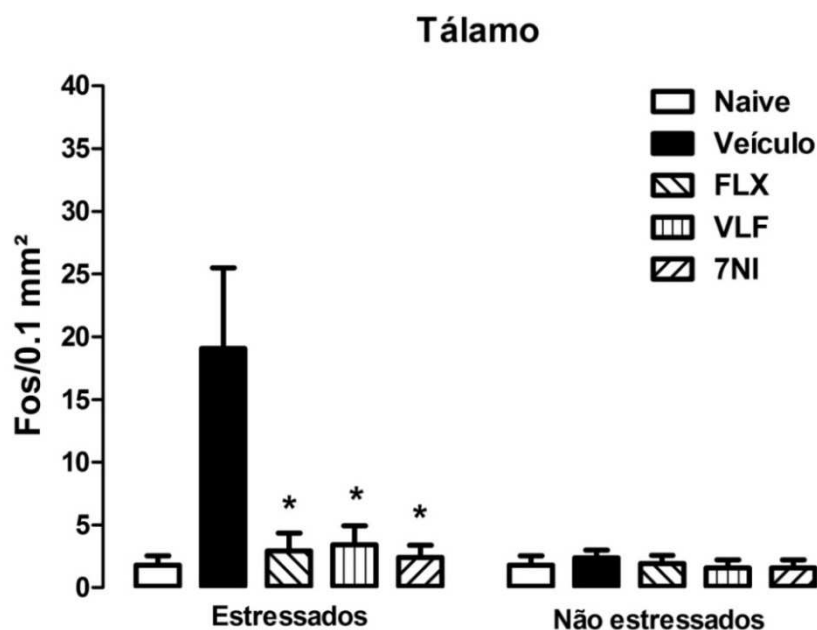


Figura 7A: Efeito dos tratamentos com FLX (10 mg/kg), VLF (10mg/kg) ou 7-NI (30mg/kg) sobre o número de células Fos positivas no tálamo de ratos ($n = 4-9$) submetidos ao FST ou somente tratados. Os animais naives não foram manipulados, nem submetidos ao nado. Os resultados representam média \pm E.P.M. do número de células positivas. * $p < 0,05$ em relação ao grupo veículo (salina e DMSO) (ANOVA de duas vias).

TÁLAMO

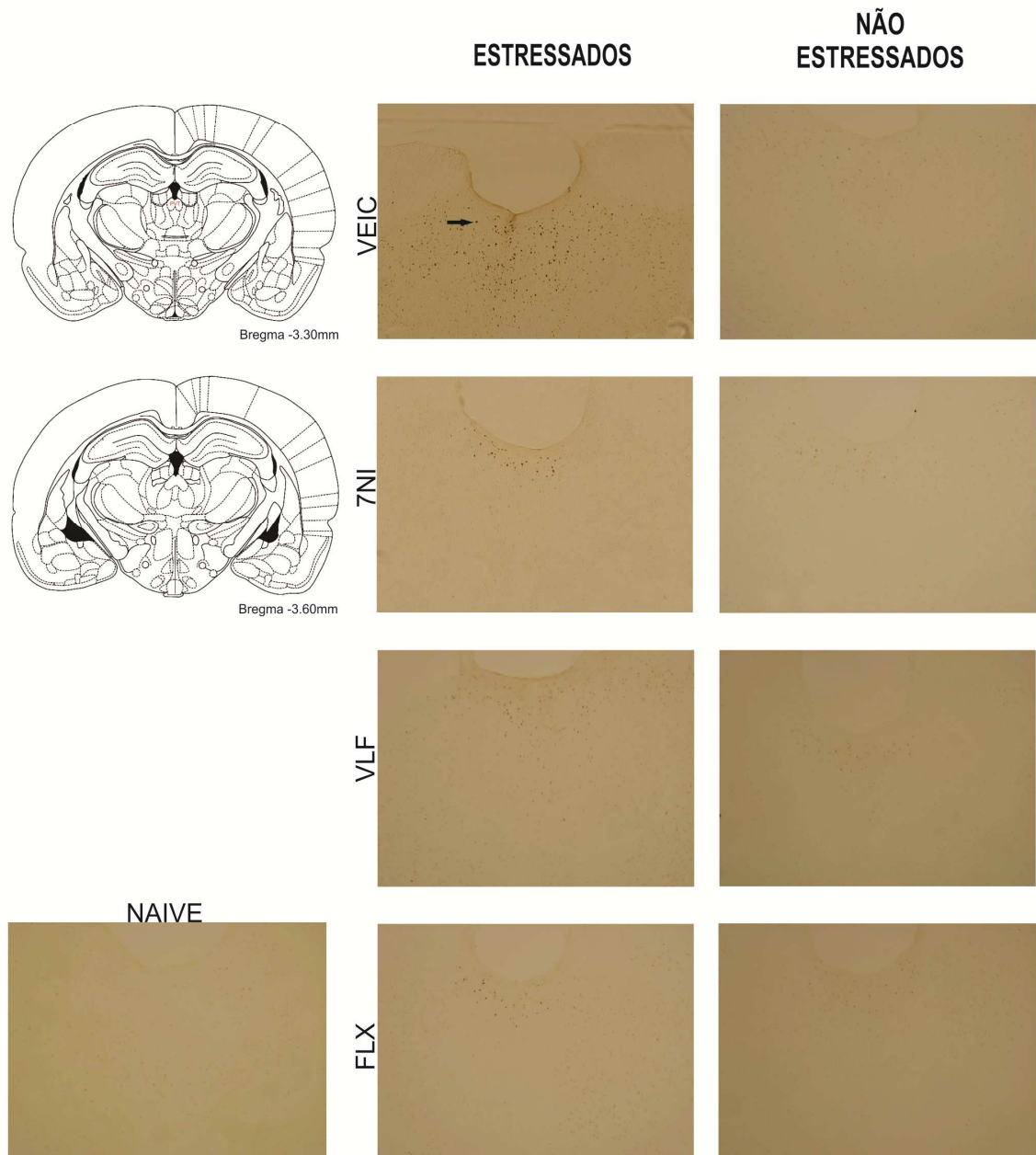


Figura 7B: Fotomicrografias representativas de secções coronais (40 μ m) do tálamo de um animal naive, de animais submetidos ao FST e tratados com FLX, VLF, 7-NI ou veículo e de animais somente tratados com FLX, VLF, 7-NI ou veículo, processadas para imunohistoquímica para a detecção da proteína Fos. A seta preta indica uma célula positiva para Fos.

O núcleo paraventricular do hipotálamo (PVN), também apresentou interação entre os fatores estresse e tratamento, na ANOVA de duas vias: ($F_{(4,52)} = 4,95$ $p < 0,05$), como também do fator tratamento: ($F_{(4,52)} = 6,49$ $p < 0,05$) e fator estresse: ($F_{(1,52)} = 7,23$ $p < 0,05$). Diante dos resultados obtidos com a ANOVA de duas vias, foi realizada uma segunda análise estatística empregando-se uma ANOVA de uma via, para comparar os efeitos dos tratamentos nos animais estressados e não estressados. Nos animais estressados verificamos diferenças significativas entre os tratamentos ($F_{(4,48)} = 12,25$ $p < 0,05$). Nos animais não estressados também não foram observadas diferenças significativas entre os tratamentos: ($F_{(4,30)} = 2,33$ $p > 0,05$). Os resultados estão representados na Figura 8A.

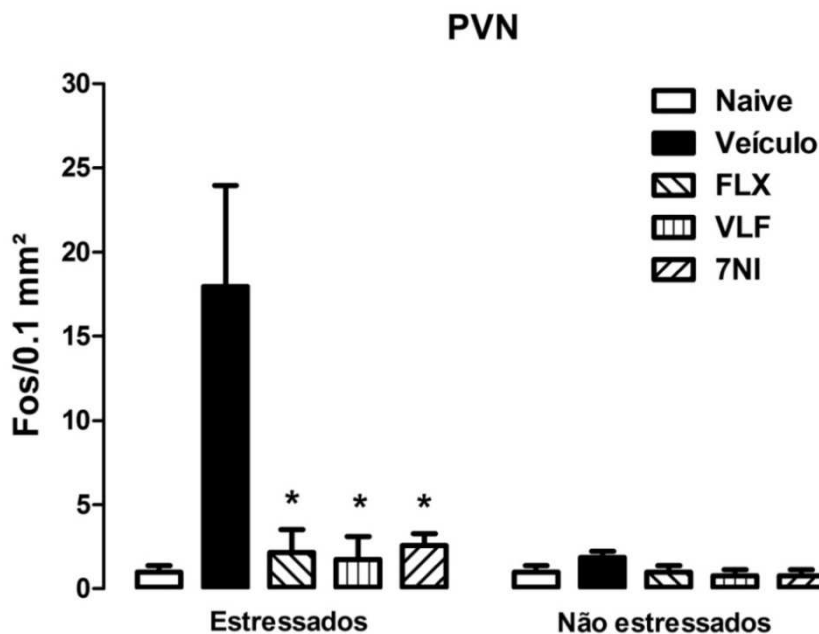


Figura 8A: Efeito dos tratamentos com (FLX-10 mg/kg), VLF (10mg/kg) ou 7-NI (30mg/kg) sobre o número de células Fos positivas no PVN de ratos ($n = 4-8$) submetidos ao teste do nado forçado ou somente tratados. Os animais naives não foram manipulados, nem submetidos ao nado. Os resultados representam média \pm E.P.M. do número de células positivas. * $p < 0,05$ em relação ao grupo veículo (salina e DMSO) (ANOVA de duas vias).

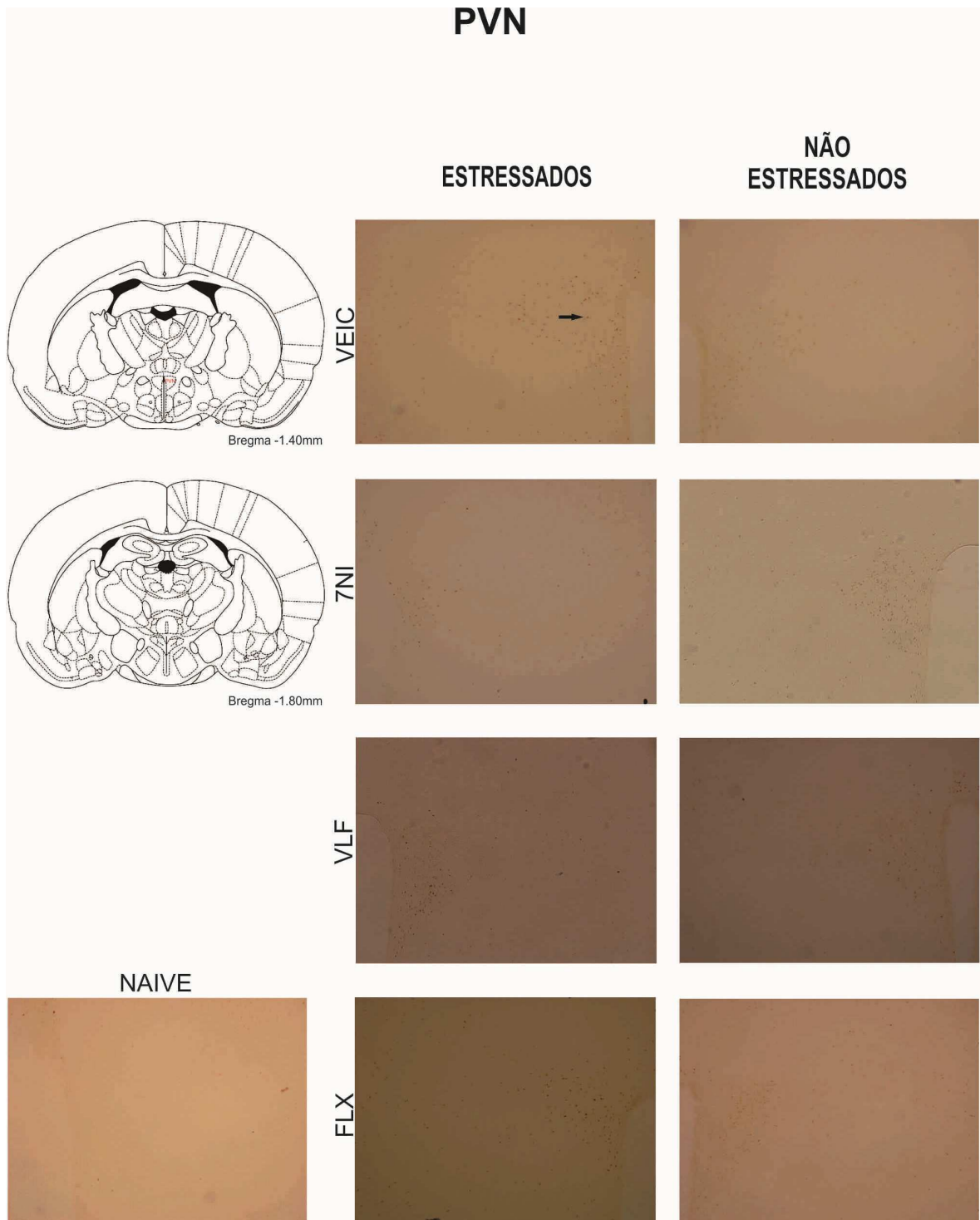


Figura 8B: Fotomicrografias representativas de secções coronais (40 μ m) do PVN de um animal naive, de animais submetidos ao FST e tratados com FLX, VLF, 7-NI ou veículo e de animais somente tratados com FLX, VLF, 7-NI ou veículo, processadas para imunistoquímicas para a detecção da proteína Fos. A seta preta indica uma célula positiva para Fos.

O hipocampo dorsal, não apresentou interação entre os fatores estresse e tratamento diante da realização da análise estatística ANOVA de duas vias, em nenhuma das porções analisadas: giro denteado (GD) ($F_{(4,41)} = 0,90$ $p > 0,05$), CA3 ($F_{(4,40)} = 0,59$ $p > 0,05$) e CA1 ($F_{(4,40)} = 0,47$ $p > 0,05$), como também não foi significativa para o fator tratamento: GD ($F_{(4,41)} = 2,46$ $p > 0,05$), CA3 ($F_{(4,40)} = 0,52$ $p > 0,05$) e CA1 ($F_{(4,40)} = 1,10$ $p > 0,05$) nem para o fator estresse: GD ($F_{(1,41)} = 3,22$ $p > 0,05$), CA3 ($F_{(1,40)} = 4,01$ $p > 0,05$) e CA1 ($F_{(1,40)} = 4,01$ $p > 0,05$). Diante dos resultados obtidos com a ANOVA de duas vias, não foi realizada uma segunda análise estatística (ANOVA de uma via). Os resultados estão representados na Figura 9A.

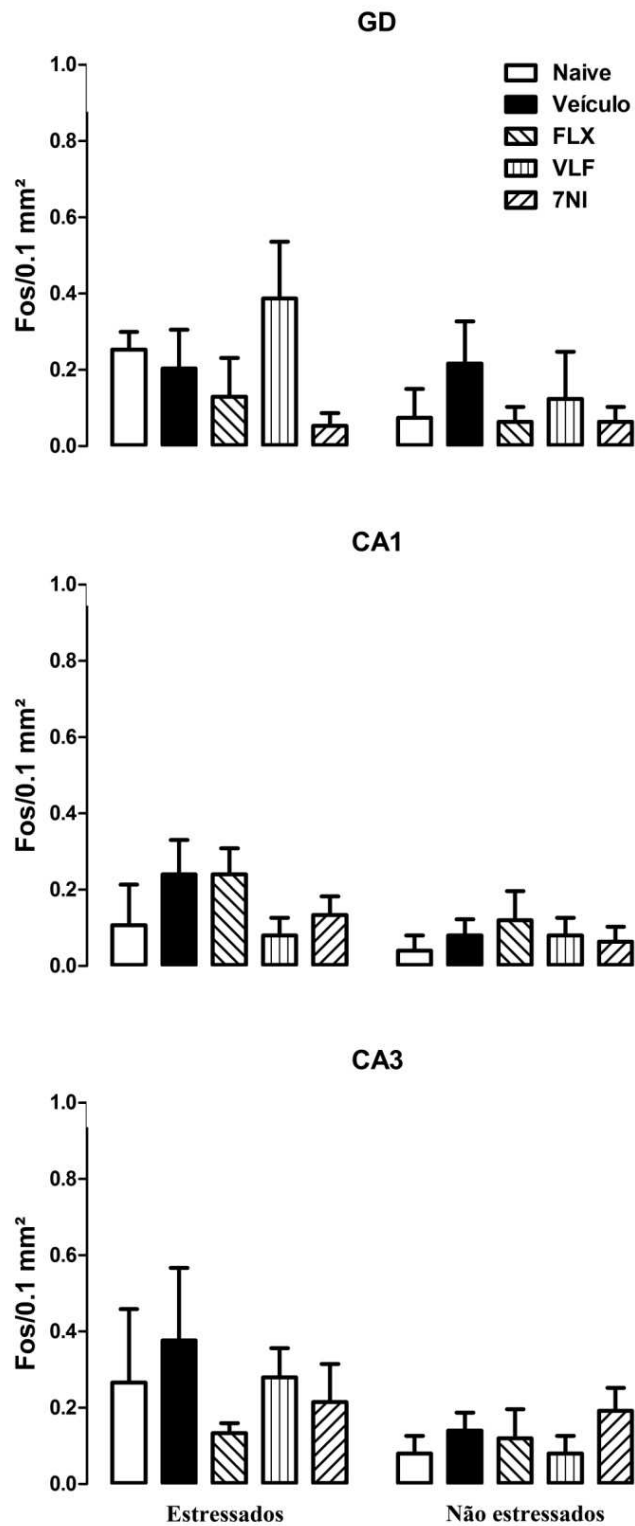


Figura 9A: Efeito dos tratamentos com FLX (10 mg/kg), VLF (10mg/kg) ou 7-NI-(30mg/kg) sobre o número de células Fos positivas nas porções GD, CA1 e CA3 do hipocampo dorsal de ratos (n= 3-7) submetidos ao FST ou somente tratados. Os animais naives não foram manipulados, nem submetidos ao nado. Os resultados representam média \pm E.P.M. do número de células positivas (ANOVA de duas vias).

HIPOCAMPO DORSAL-GD

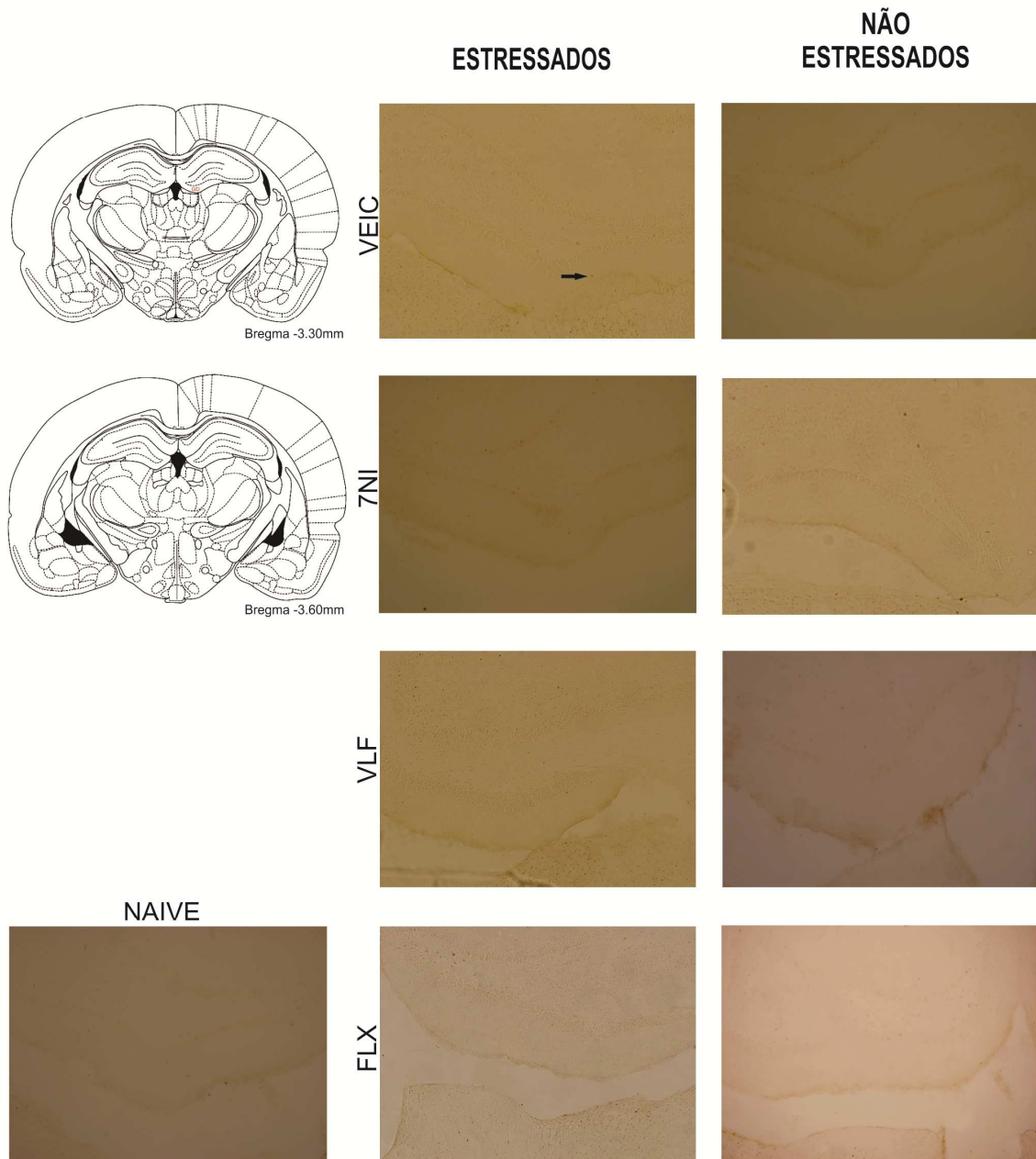


Figura 9B: Fotomicrografias representativas de secções coronais (40 μ m) da porção GD do hipocampo dorsal de um animal naive, de animais submetidos ao FST e tratados com FLX, VLF, 7-NI ou veículo e de animais somente tratados com FLX, VLF, 7-NI ou veículo, processadas para imunoistoquímicas para a detecção da proteína Fos. A seta preta indica uma célula positiva para Fos.

HIPOCAMPO DORSAL-CA1

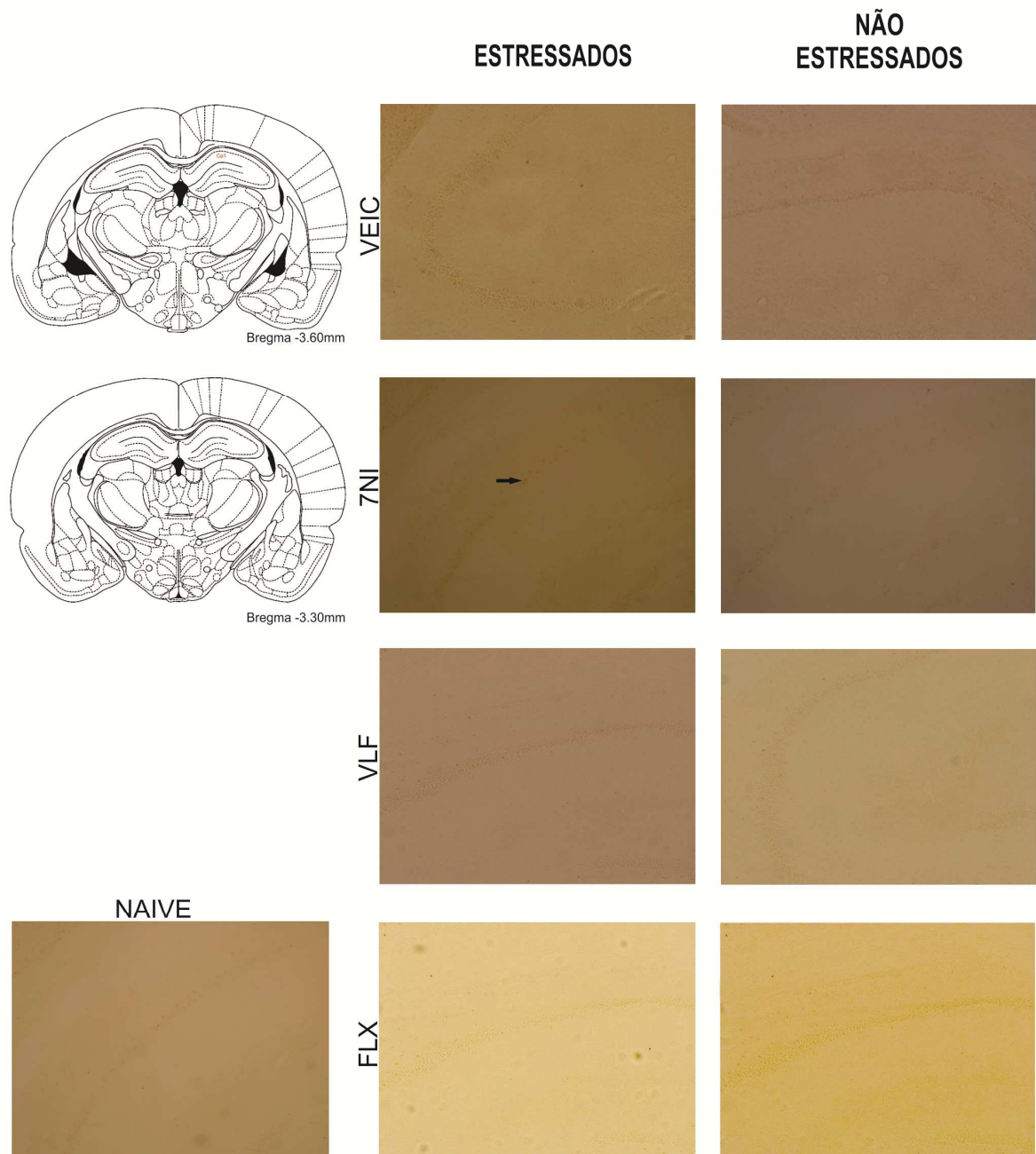


Figura 9C : Fotomicrografias representativas de secções coronais (40 μ m) da porção CA1 do hipocampo dorsal de um animal naive, de animais submetidos ao FST e tratados com FLX, VLF, 7-NI ou veículo e de animais somente tratados com FLX, VLF, 7-NI ou veículo, processadas para imunoistoquímicas para a detecção da proteína Fos. A seta preta indica uma célula positiva para Fos.

HIPOCAMPO DORSAL-CA3

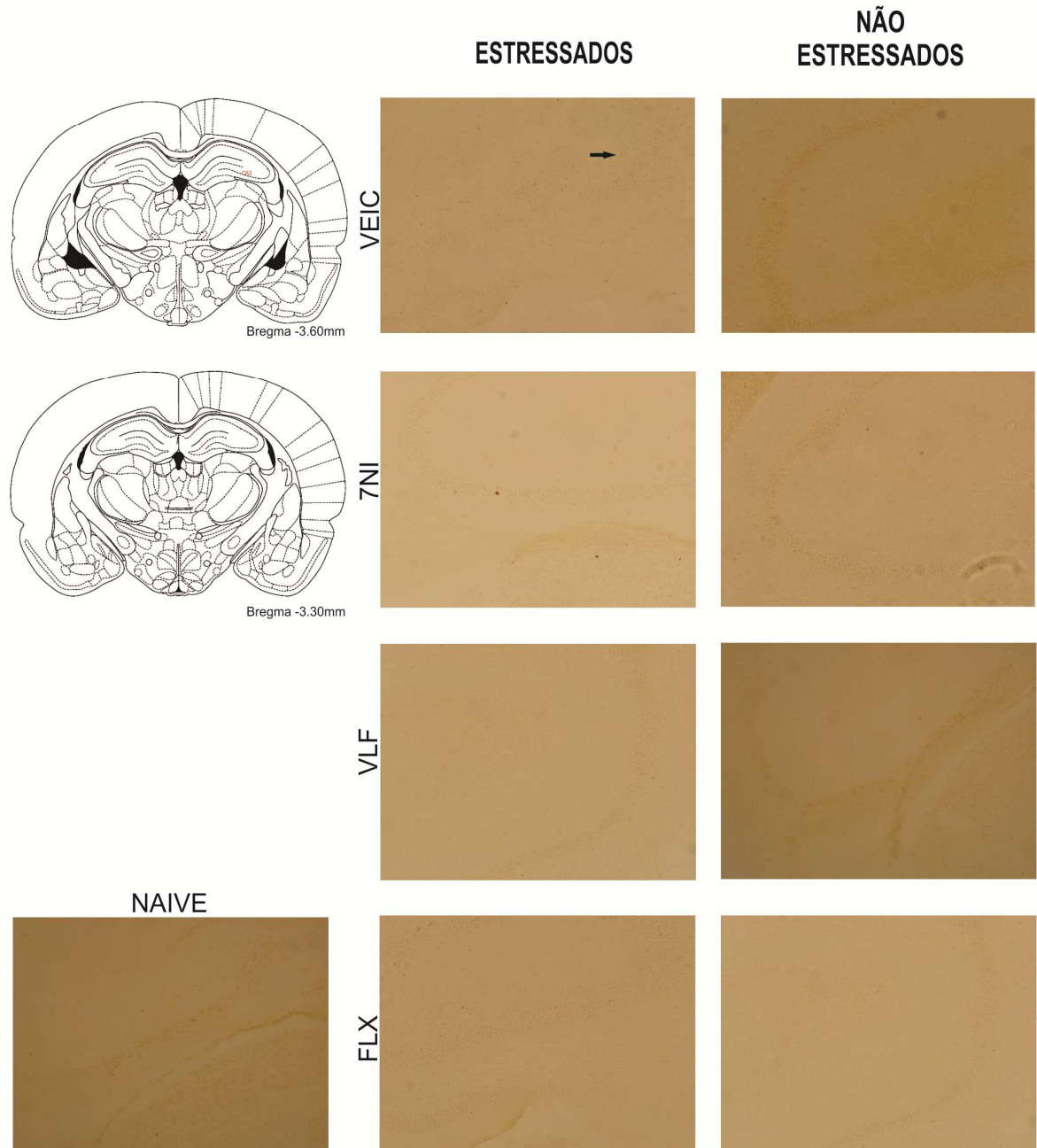


Figura 9D: Fotomicrografias representativas de secções coronais (40 μ m) da porção CA3 do hipocampo dorsal de um animal naive, de animais submetidos ao FST e tratados com FLX, VLF, 7-NI ou veículo e de animais somente tratados com FLX, VLF, 7-NI ou veículo, processadas para imunistoquímicas para a detecção da proteína Fos. A seta preta indica uma célula positiva para Fos.

O hipocampo ventral , assim como o dorsal não apresentou interação entre os fatores estresse e tratamento na ANOVA de duas vias, em nenhuma das porções analisadas: giro denteado GD ($F_{(4,22)} = 1,70$ $p>0,05$) e CA3 ($F_{(4,21)} = 0,46$ $p>0,05$) ,como também não foi significativa para o fator tratamento: GD ($F_{(4,22)} = 2,39$ $p>0,05$) e CA3 ($F_{(4,21)} = 1,22$ $p>0,05$) e nem para o fator estresse: GD ($F_{(1,22)} = 0,0002$ $p>0,05$) e CA3 ($F_{(1,21)} = 0,13$ $p>0,05$). Diante dos resultados obtidos com a ANOVA de duas vias, também não foi realizada uma segunda análise estatística (ANOVA de uma via) para o Hipocampo Ventral. Os resultados estão representados na Figura 10A.

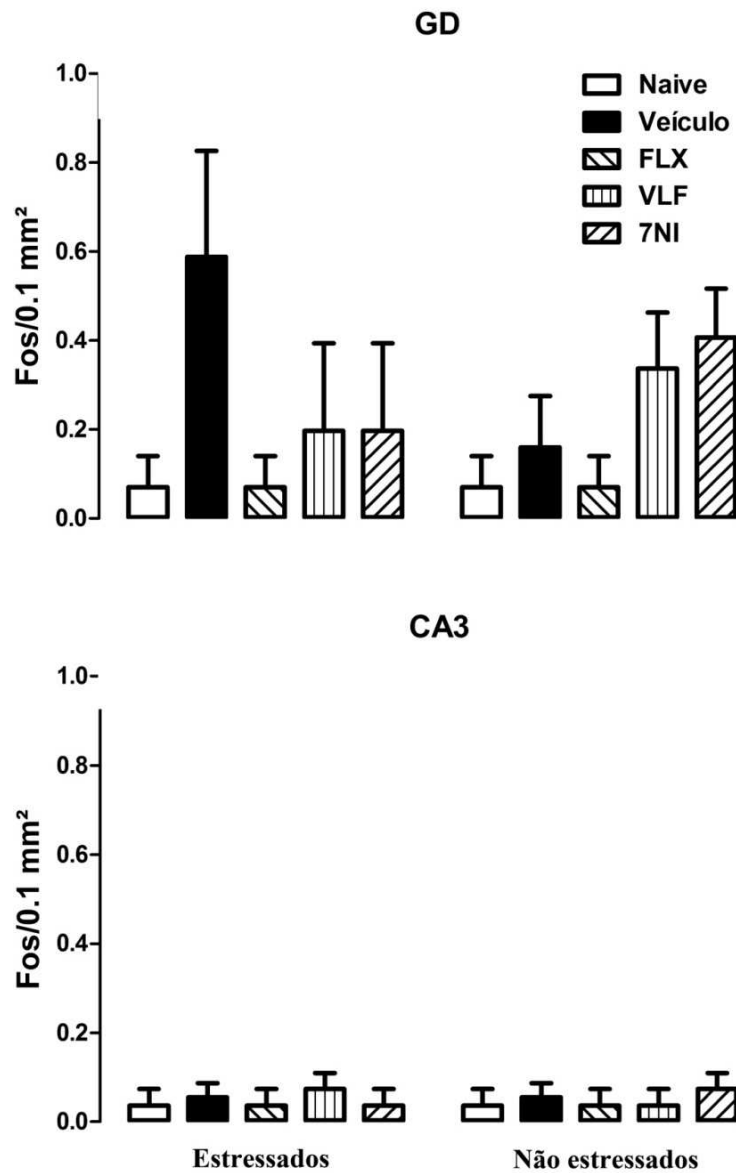


Figura 10A: Efeito dos tratamentos com FLX (10 mg/kg), VLF (10mg/kg) ou 7-NI (30mg/kg) sobre o número de células Fos positivas nas porções GD e CA3 do hipocampo ventral de ratos (n= 3-6) submetidos ao FST ou somente tratados. Os animais naives não foram manipulados, nem submetidos ao nado. Os resultados representam média \pm E.P.M. do número de células positivas (ANOVA de duas vias).

HIPOCAMPO VENTRAL-GD

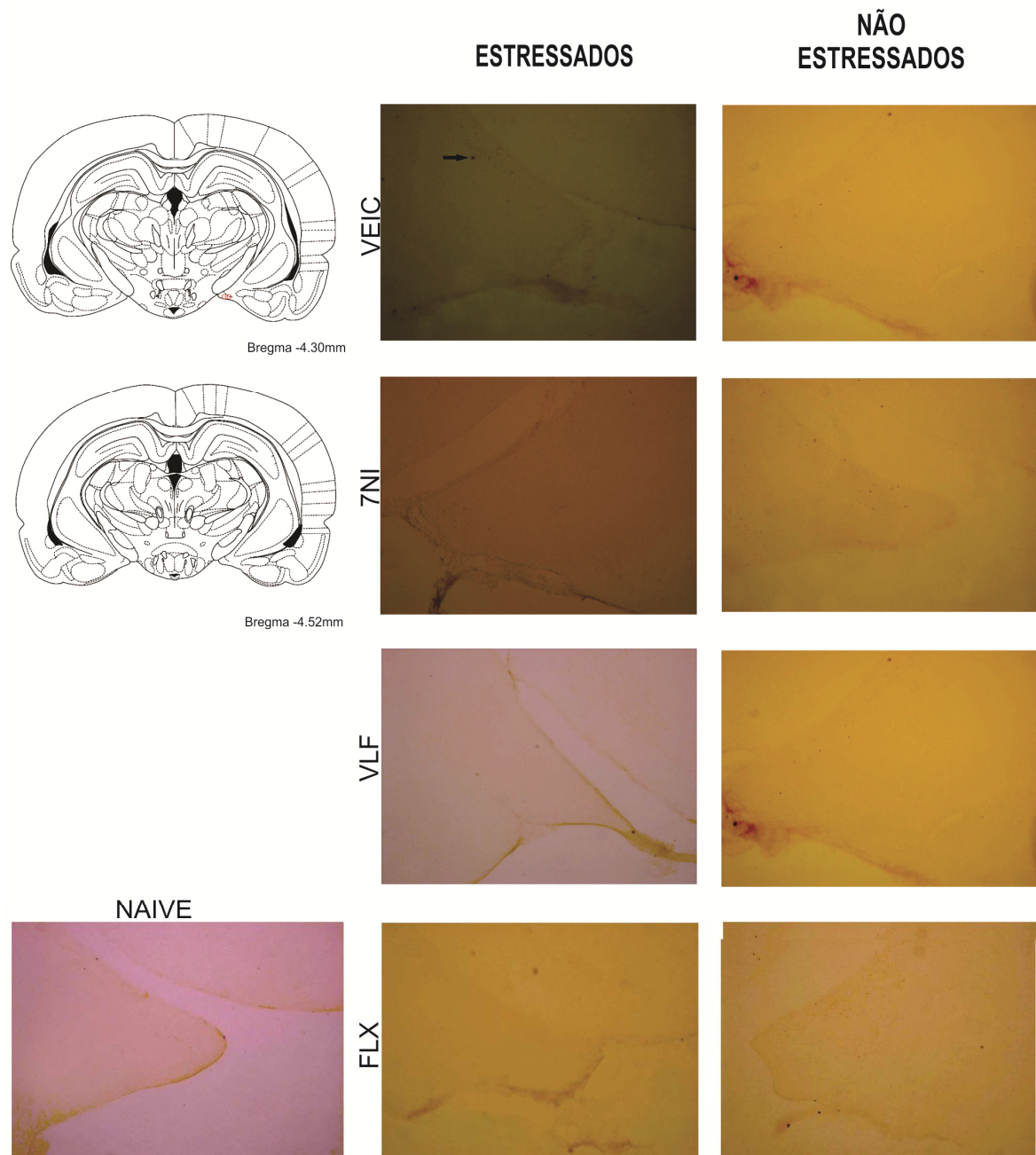


Figura 10B: Fotomicrografias representativas de secções coronais (40 μ m) da porção GD do hipocampo ventral de um animal naive, de animais submetidos ao FST e tratados com FLX, VLF, 7-NI ou veículo e de animais somente tratados com FLX, VLF, 7-NI ou veículo, processadas para imunoistoquímicas para a detecção da proteína Fos. A seta preta indica uma célula positiva para Fos.

HIPOCAMPO VENTRAL-CA3

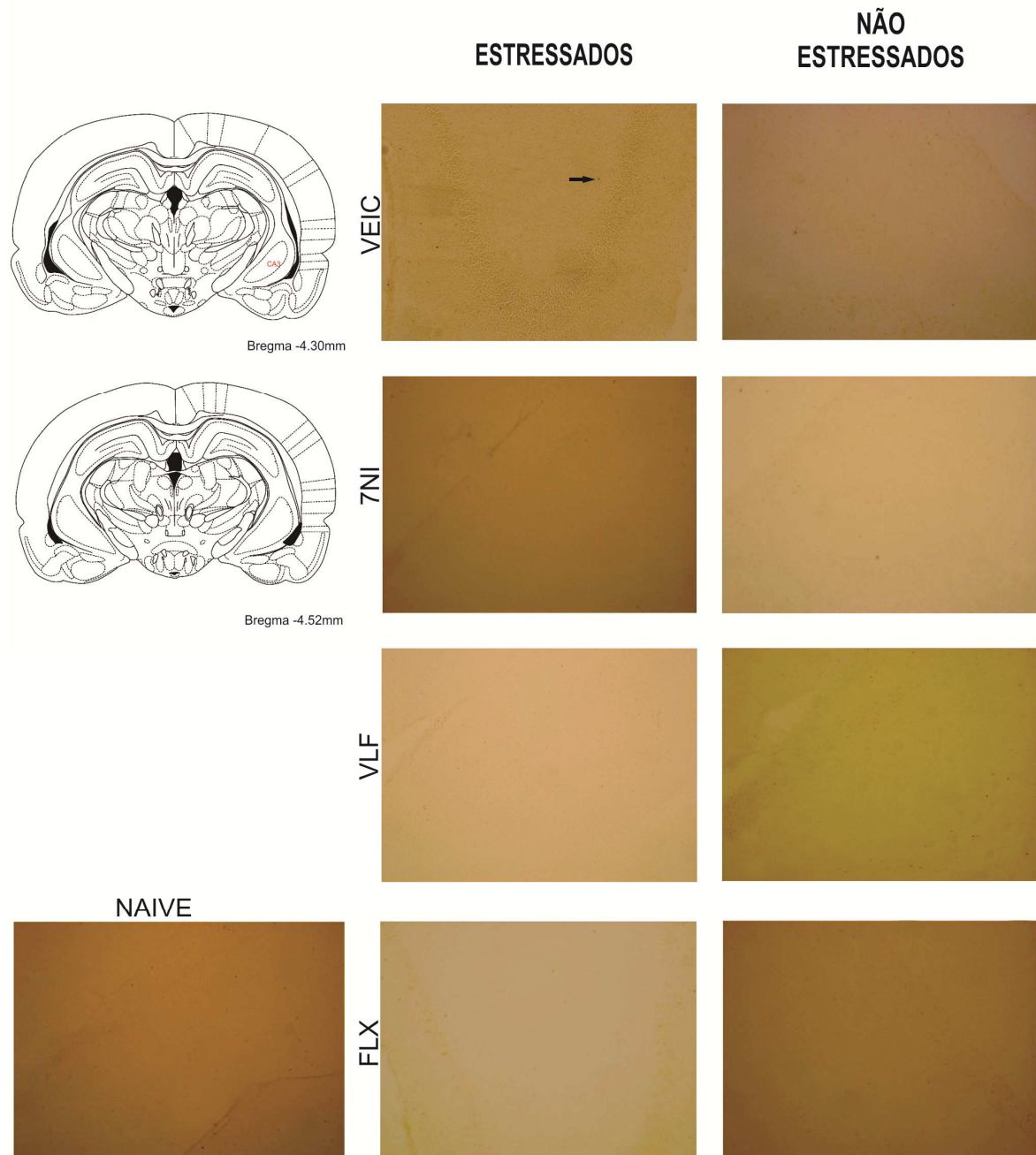


Figura 10C: Fotomicrografias representativas de secções coronais (40 μ m) da porção CA3 do hipocampo ventral de um animal naive, de animais submetidos ao FST e tratados com FLX, VLF, 7-NI ou veículo e de animais somente tratados com FLX, VLF, 7-NI ou veículo, processadas para imunistoquímicas para a detecção da proteína Fos. A seta preta indica uma célula positiva para Fos.

Na amígdala, também verificamos interação entre os fatores estresse e tratamento diante da realização da análise estatística ANOVA de duas vias, na porção Medial: ($F_{(4,51)} = 4,74$ $p < 0,05$), como também do fator tratamento: ($F_{(4,51)} = 6,56$ $p < 0,05$) e fator estresse ($F_{(1,51)} = 6,98$ $p < 0,05$). Diante dos resultados obtidos com a ANOVA de duas vias, foi realizada uma segunda análise estatística empregando-se uma ANOVA de uma via, para comparar os efeitos dos tratamentos nos animais estressados e não estressados. Nos animais estressados verificamos diferenças significativas entre os tratamentos: ($F_{(4,23)} = 4,631$ $p < 0,05$). Nos animais não estressados não foram observadas diferenças significativas entre os tratamentos ($F_{(4,28)} = 2,41$ $p > 0,05$). Não houve marcação de Fos nas porções lateral e basolateral da amígdala e por isso não foi realizada a análise estatística. Os resultados estão representados na Figura 11A.

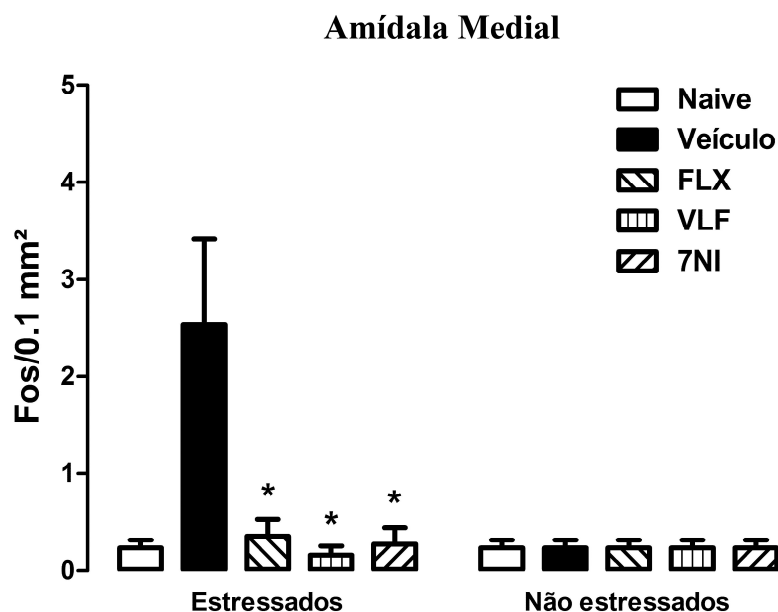


Figura 11A: Efeito dos tratamentos com FLX (10 mg/kg), VLF (10mg/kg) ou 7-NI (30mg/kg) sobre o número de células Fos positivas na amígdala de ratos (n= 4-9) submetidos ao FST ou somente tratados. Os animais naives não foram manipulados, nem submetidos ao nado. Os resultados representam média \pm E.P.M. do número de células positivas. * $p < 0,05$ em relação ao grupo veículo (salina e DMSO) (ANOVA de duas vias).

AMIDALA MEDIAL

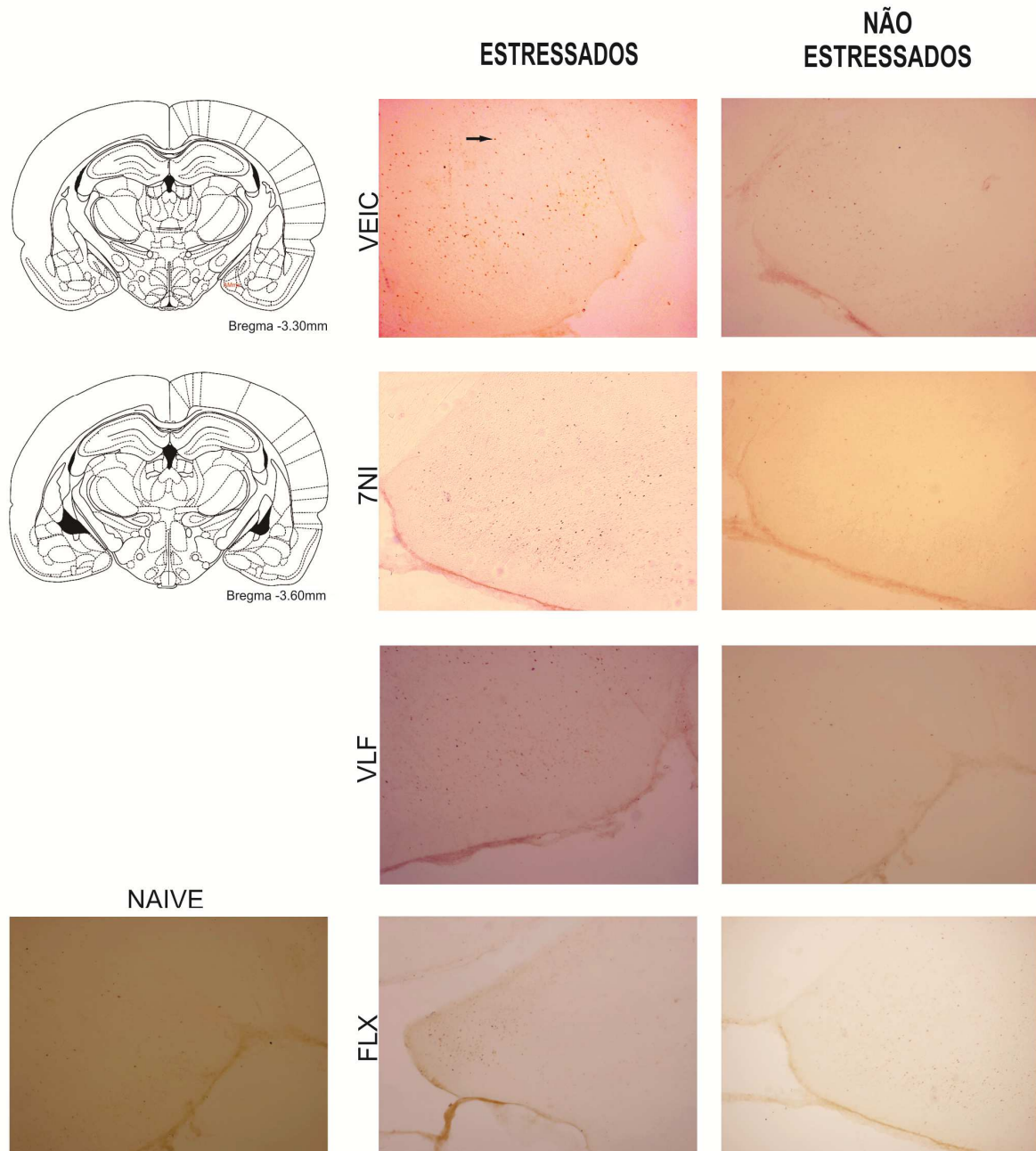


Figura 11B: Fotomicrografias representativas de secções coronais (40 μ m) da amídala medial de um animal naíve, de animais submetidos ao FST e tratados com FLX, VLF, 7-NI ou veículo e de animais somente tratados com FLX, VLF, 7-NI ou veículo, processadas para imunistoquímicas para a detecção da proteína Fos. A seta preta indica uma célula positiva para Fos

A substância cinzenta periaquedutal (SCP), apresentou interação entre os fatores estresse e tratamento nas porções dorsolateral e dorsal, na análise estatística ANOVA de duas vias: dorsolateral ($F_{(4,60)} = 5,94$ $p < 0,05$) e dorsal ($F_{(4,60)} = 2,64$ $p < 0,05$), como também do fator tratamento: dorsolateral ($F_{(4,60)} = 7,14$ $p < 0,05$) e dorsal ($F_{(4,60)} = 8,36$ $p < 0,05$) e fator estresse: dorsolateral ($F_{(1,60)} = 9,55$ $p < 0,05$) e dorsal ($F_{(1,60)} = 8,95$ $p < 0,05$). Diante dos resultados obtidos com a ANOVA de duas vias, foi realizada uma segunda análise estatística empregando-se uma ANOVA de uma via, para comparar os efeitos dos tratamentos nos animais estressados e não estressados. Nos animais estressados verificamos diferenças significativas entre os tratamentos: dorsolateral ($F_{(4,26)} = 6,800$ $p < 0,05$) e dorsal ($F_{(4,26)} = 6,872$ $p < 0,05$). Nos animais não estressados não foram observadas diferenças significativas entre os tratamentos: dorsolateral ($F_{(4,34)} = 1,53$ $p > 0,05$) e dorsal ($F_{(4,34)} = 1,41$ $p > 0,05$). Os resultados estão representados na Figura 12A.

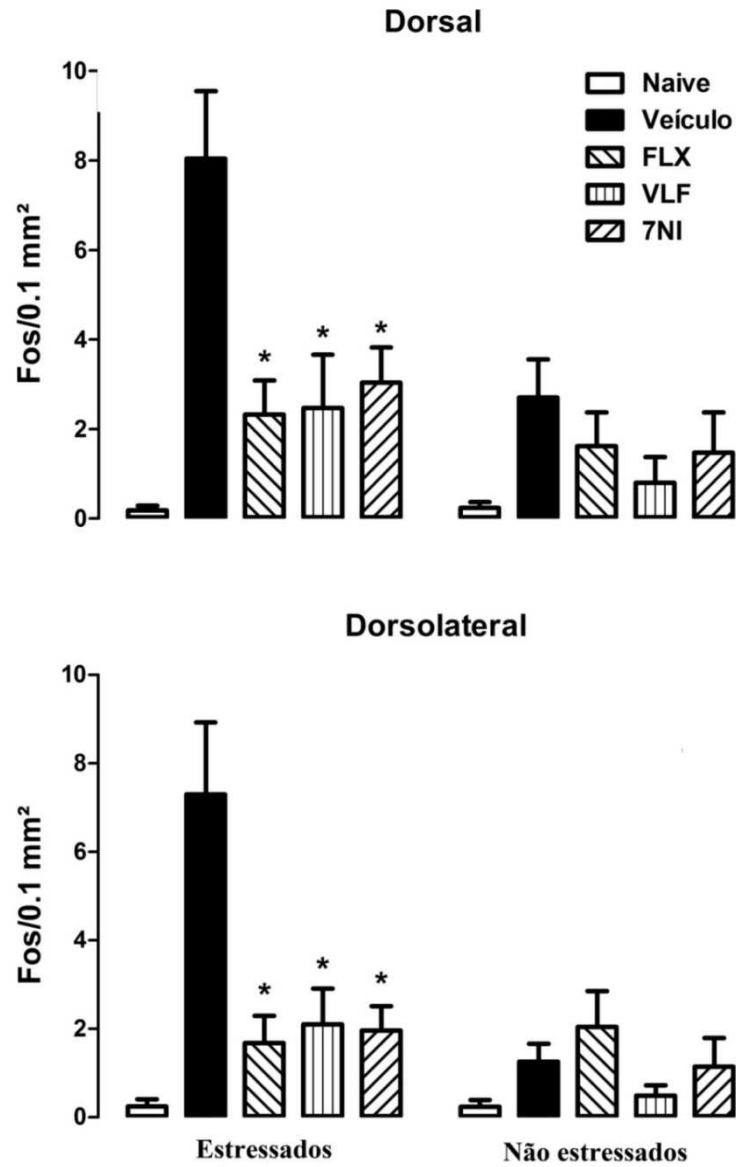


Figura 12A: Efeito dos tratamentos com FLX (10 mg/kg), VLF (10mg/kg) ou 7-NI (30mg/kg) sobre o número de células Fos positivas na SCP dorsolateral e dorsal de ratos (n= 4-10) submetidos ao FST ou somente tratados. Os animais naives não foram manipulados, nem submetidos ao nado. Os resultados representam média \pm E.P.M. do número de células positivas. * $p < 0,05$ em relação ao grupo veículo (salina e DMSO) (ANOVA de duas vias).

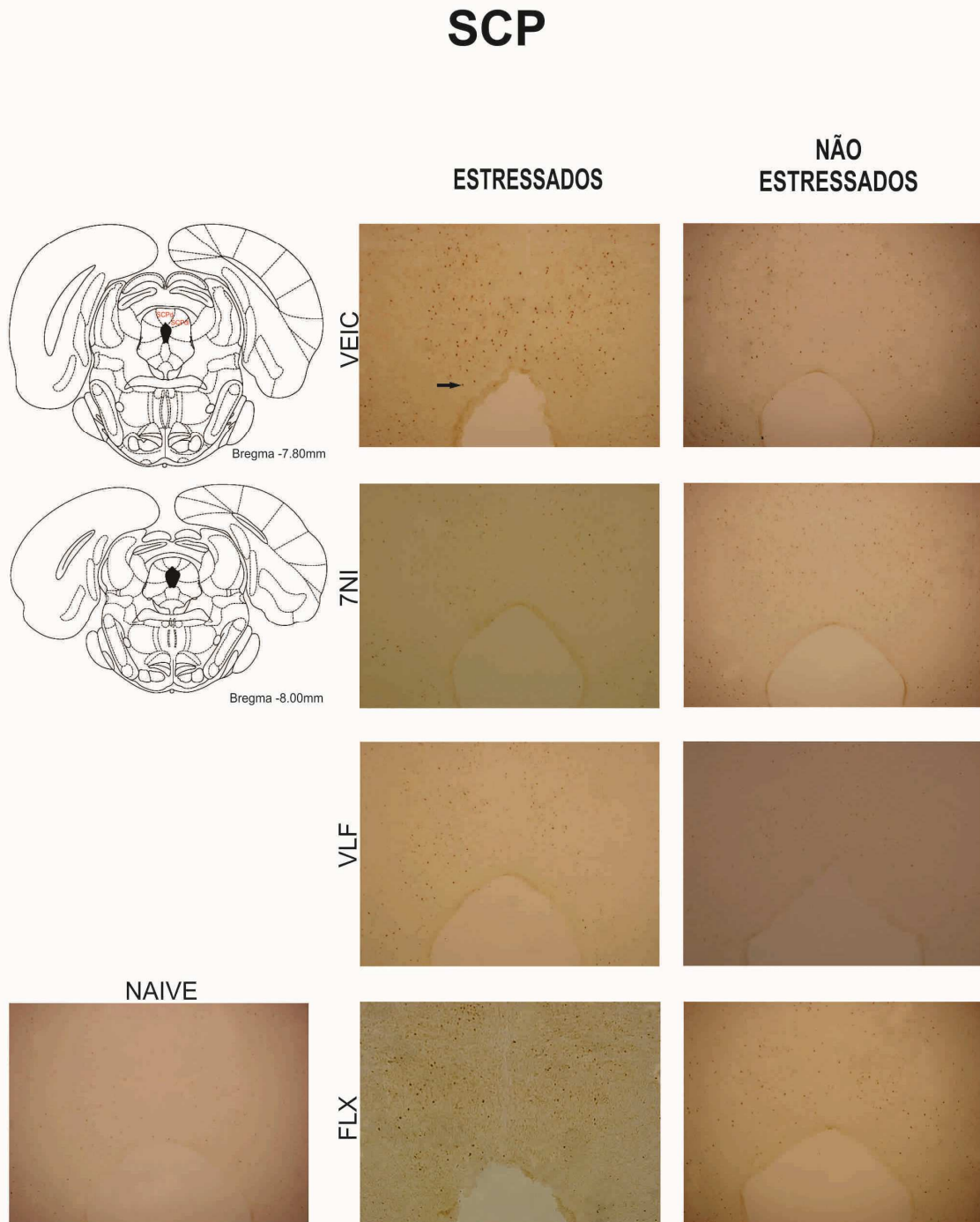


Figura 12B: Fotomicrografias representativas de secções coronais (40 μ m) das porções dorsal e dorso lateral da SCP de um animal naive, de animais submetidos ao FST e tratados com FLX, VLF, 7-NI ou veículo e de animais somente tratados com FLX, VLF, 7-NI ou veículo, processadas para imunistoquímicas para a detecção da proteína Fos. A seta preta indica uma célula positiva para Fos.

As porções dorsal (NDR) e mediana (NMR) da rafe apresentaram na ANOVA de duas vias, interação entre os fatores estresse e tratamento: NDR ($F_{(4,59)} = 13,84$ $p < 0,05$) e NMR ($F_{(4,59)} = 11,22$ $p < 0,05$); como também do fator tratamento: NDR ($F_{(4,59)} = 17,13$ $p < 0,05$) e NMR ($F_{(4,59)} = 15,38$ $p < 0,05$) e fator estresse: NDR ($F_{(1,59)} = 33,77$ $p < 0,05$) e NMR ($F_{(1,59)} = 31,18$ $p < 0,05$). Diante dos resultados obtidos com a ANOVA de duas vias, foi realizada uma segunda análise estatística empregando-se uma ANOVA de uma via para comparar os efeitos dos tratamentos entre animais estressados e não estressados. Nos animais estressados verificamos diferenças significativas entre os tratamentos nas três porções analisadas: NDR ($F_{(4,24)} = 11,69$ $p < 0,05$) e NMR ($F_{(4,24)} = 10,97$ $p < 0,05$). Nos animais não estressados não foram observadas diferenças significativas entre os tratamentos: NDR ($F_{(4,35)} = 1,65$ $p > 0,05$) e NMR ($F_{(4,35)} = 1,55$ $p > 0,05$). Os resultados estão representados na Figura 13A.

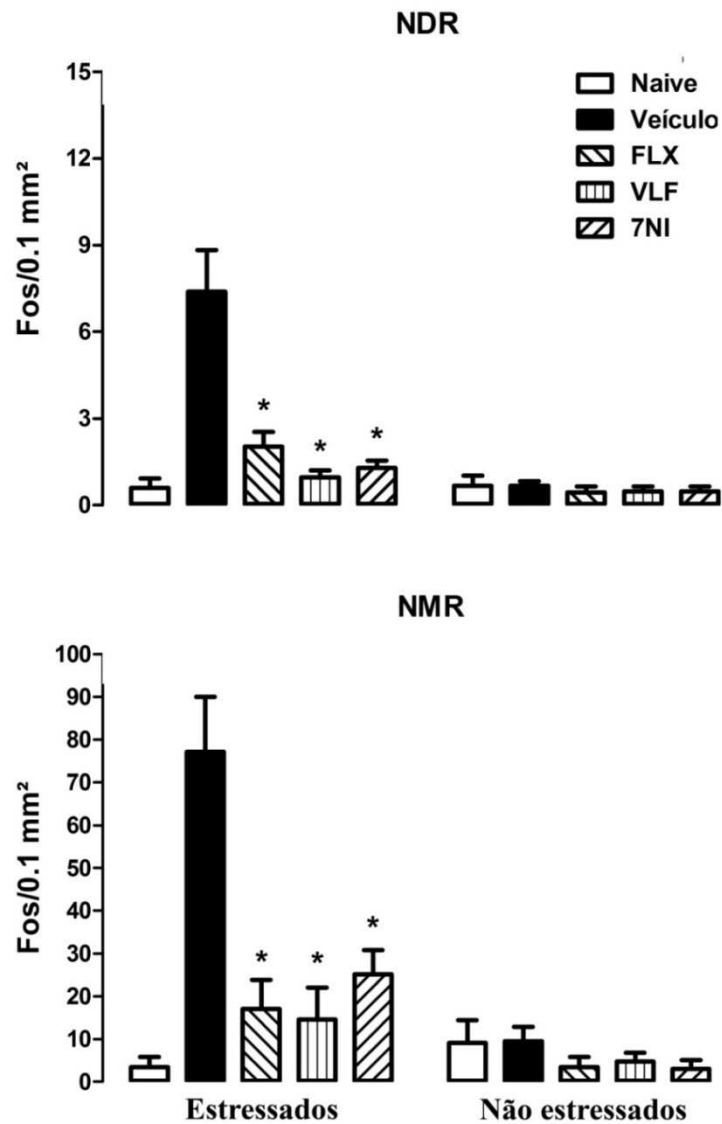


Figura 13A: Efeito dos tratamentos com FLX (10 mg/kg), VLF (10mg/kg) ou 7-NI (30mg/kg) sobre o número de células Fos positivas nas porções NRD e NRM de ratos (n= 4-10) submetidos ao FST ou somente tratados. Os animais naives não foram manipulados, nem submetidos ao nado. Os resultados representam média \pm E.P.M. do número de células positivas. * $p < 0,05$ em relação ao grupo veículo (salina e DMSO) (ANOVA de duas vias).

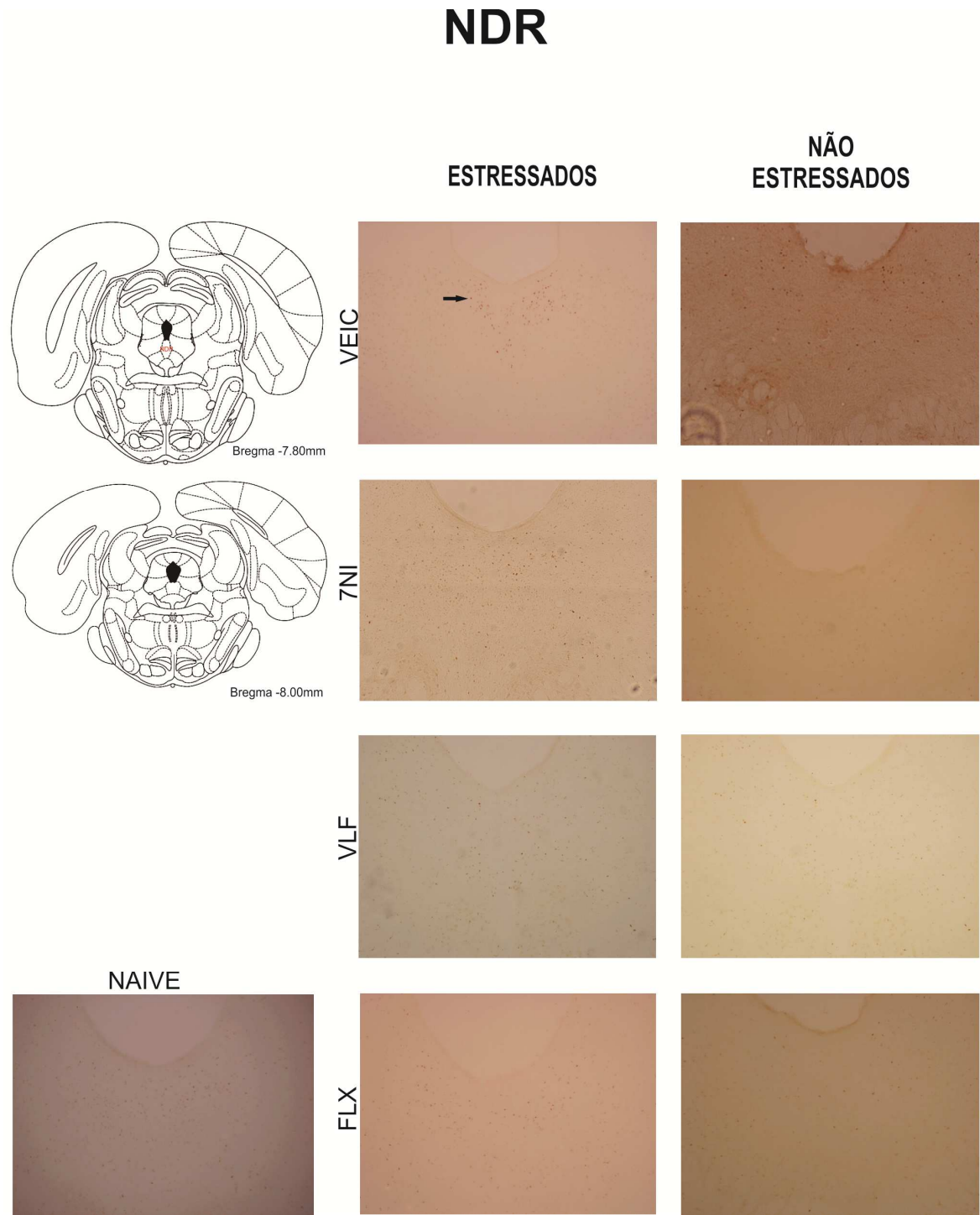


Figura 13B: Fotomicrografias representativas de secções coronais (40 μm) do núcleo dorsal da rafe de um animal naive, de animais submetidos ao FST e tratados com FLX, VLF, 7-NI ou veículo e de animais somente tratados com FLX, VLF, 7-NI ou veículo, processadas para imunistoquímicas para a detecção da proteína Fos. A seta preta indica uma célula positiva para Fos.

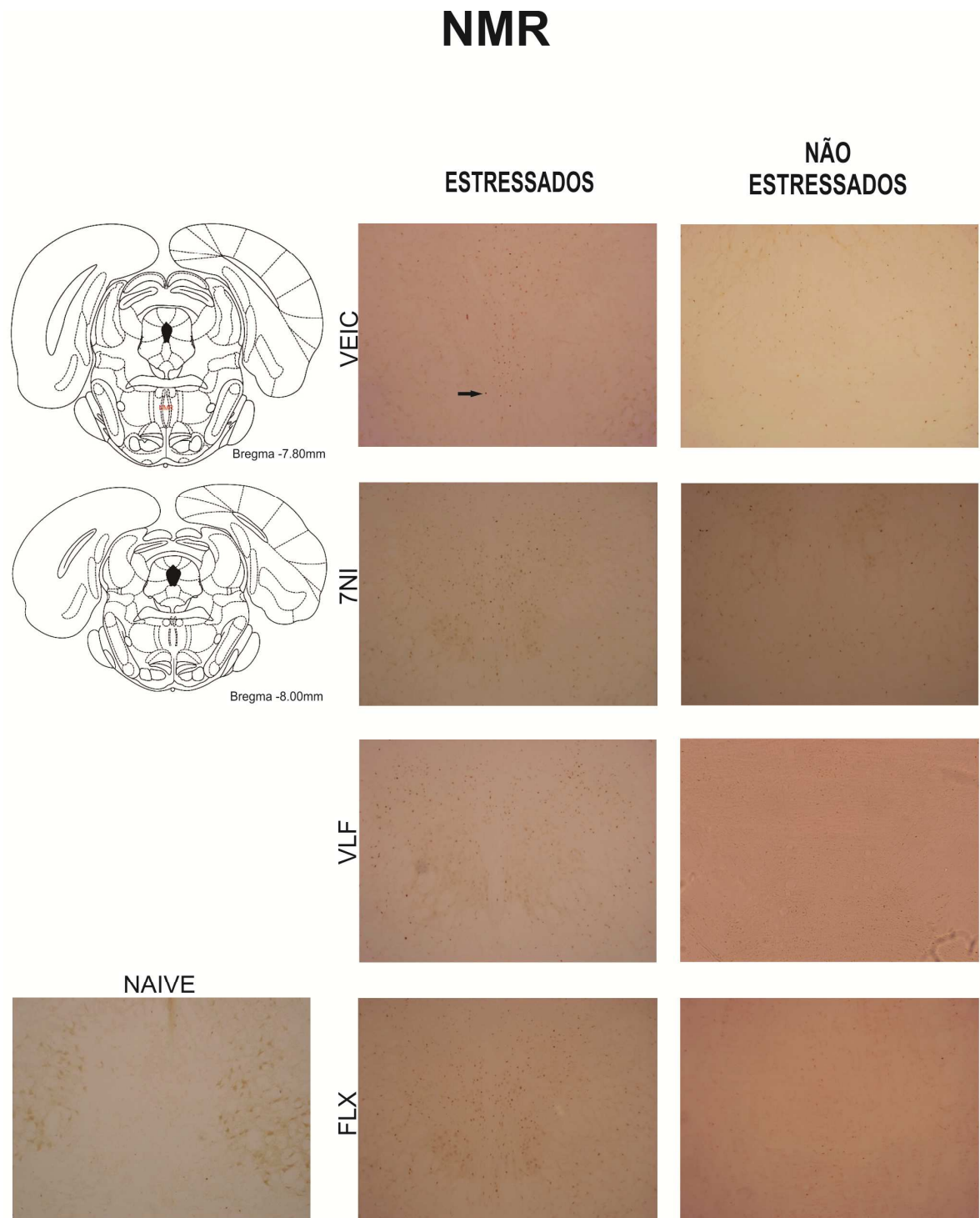


Figura 13C: Fotomicrografias representativas de secções coronais (40 μ m) do núcleo mediano da rafe de um animal naive, de animais submetidos ao FST e tratados com FLX, VLF, 7-NI ou veículo e de animais somente tratados com FLX, VLF, 7-NI ou veículo, processadas para imunistoquímicas para a detecção da proteína Fos. A seta preta indica uma célula positiva para Fos.

No locus coeruleus, verificamos interação entre os fatores estresse e tratamento diante da realização da análise estatística ANOVA de duas vias: ($F_{(4,57)} = 12,10$ $p < 0,05$), como também do fator tratamento: ($F_{(4,57)} = 11,93$ $p < 0,05$) e fator estresse: ($F_{(1,57)} = 60,31$ $p < 0,05$). Diante dos resultados obtidos com a ANOVA de duas vias, foi realizada uma segunda análise estatística empregando-se uma ANOVA de uma via para comparar os efeitos dos tratamentos entre animais estressados e não estressados. Nos animais estressados verificamos diferenças significativas entre os tratamentos: ($F_{(4,23)} = 8,220$ $p < 0,05$). Nos animais não estressados não foram observadas diferenças significativas entre os tratamentos: ($F_{(4,34)} = 0,23$ $p > 0,05$). Os resultados estão representados na Figura 14A.

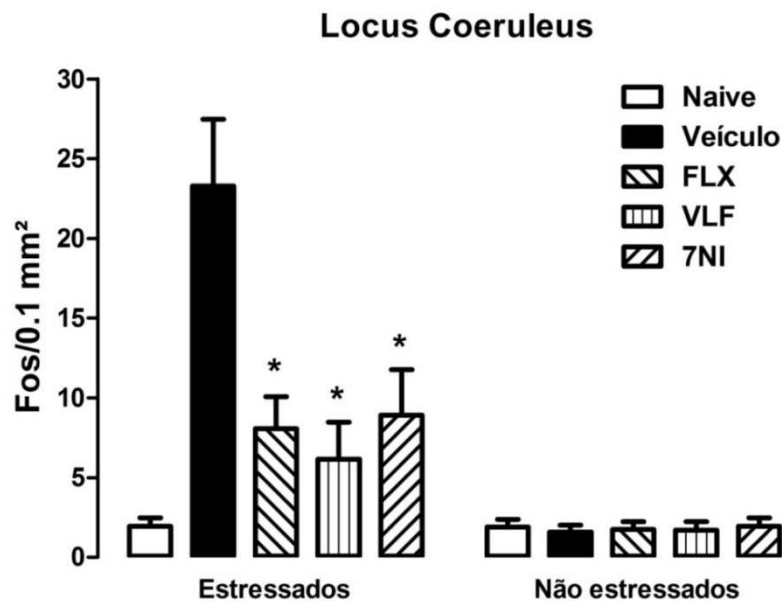


Figura 14A: Efeito dos tratamentos com FLX (10 mg/kg), VLF (10mg/kg) ou 7-NI (30mg/kg) sobre o número de células Fos positivas no locus coeruleus de ratos ($n = 4-10$) submetidos ao FST ou somente tratados. Os animais naives não foram manipulados, nem submetidos ao FST. Os resultados representam média \pm E.P.M. do número de células positivas. * $p < 0,05$ em relação ao grupo veículo (salina e DMSO) (ANOVA de duas vias).

LOCUS COERULEUS

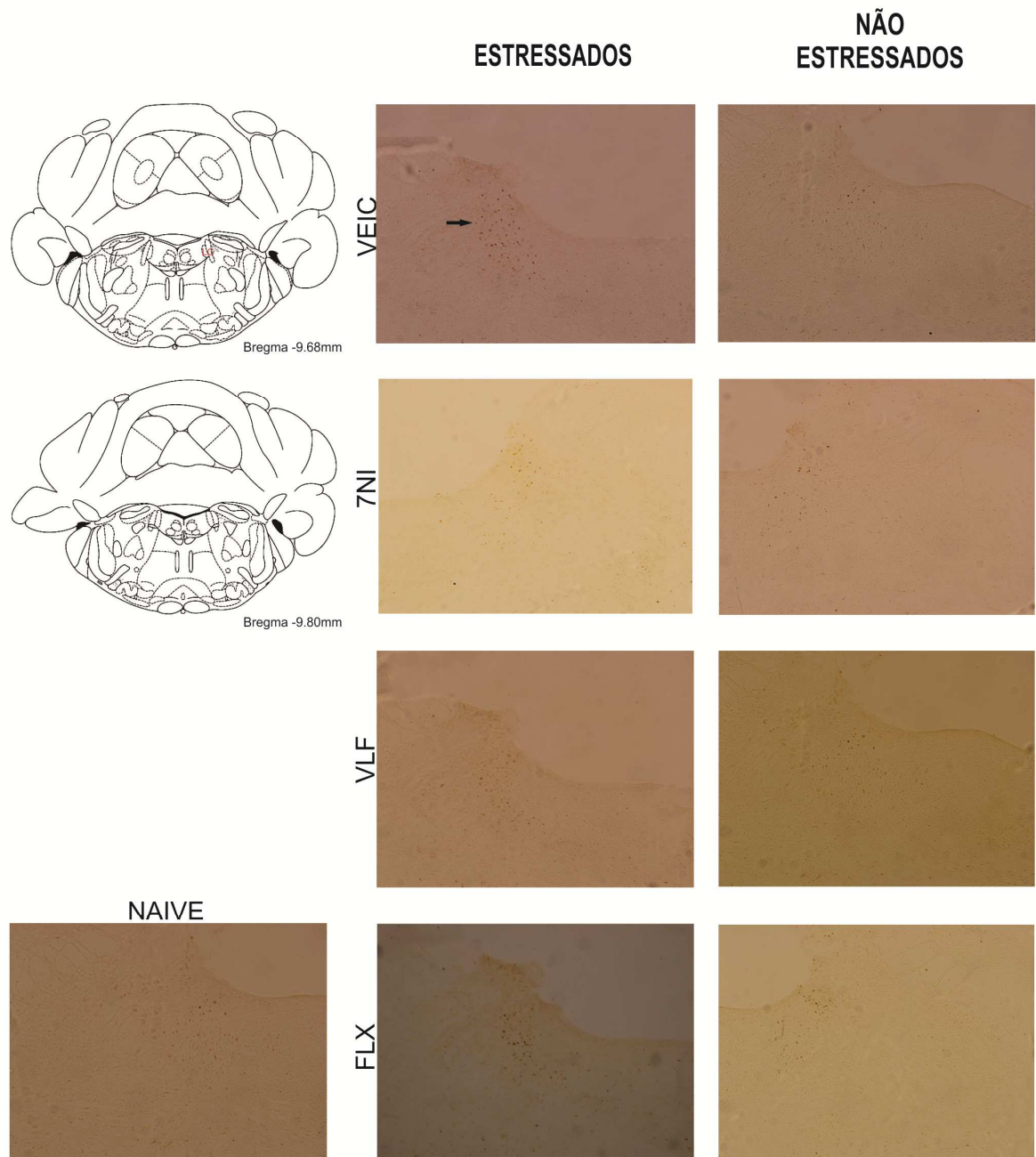


Figura 14B: Fotomicrografias representativas de secções coronais (40 μ m) do lócus coeruleus de um animal naive, de animais submetidos ao FST e tratados com FLX, VLF, 7-NI ou veículo e de animais somente tratados com FLX, VLF, 7-NI ou veículo, processadas para imunistoquímicas para a detecção da proteína Fos. A seta preta indica uma célula positiva para Fos.

DISCUSSÃO

Os resultados apresentados no presente trabalho demonstram que o tratamento com 7-NI, FLX ou VLF reduziu o tempo de imobilidade dos animais submetidos ao nado forçado, um efeito tipo-antidepressivo no modelo. Esse efeito foi acompanhado de redução na expressão da proteína Fos em diversas estruturas encefálicas de animais estressados: CPF, caudato putamen, núcleo acumbens, BNST, PVN, habênula, núcleo do tálamo, amígdala, SCP, núcleos da rafe e locus cerúleos.

O FST, assim como outros modelos, se mostra uma ferramenta experimental importante que pode auxiliar na identificação de novas drogas antidepressivas, bem como na elucidação da neurobiologia da depressão (Cryan et. al., 2002; Southwick et. al., 2005; Pittenger & Duman, 2008). O FST utiliza um tipo de estresse no qual o animal é submetido à natação forçada, sem a possibilidade de escapar, o que faz com que ele assuma uma postura de imobilidade quando reexposto ao nado, realizando apenas movimentos necessários para evitar o afogamento. Drogas antidepressivas, de maneira geral, diminuem o TI, promovendo redução nos efeitos comportamentais provocados pelo estresse, indicando que esses seriam efeitos tipo-antidepressivo no modelo (Porsolt et. al., 1977, Cryan et. al., 2002).

Embora a redução do TI seja um fator comum aos diferentes antidepressivos, ainda não há consenso na literatura sobre o que representa a imobilidade dos animais durante o teste. Enquanto alguns autores acreditam que o aumento da imobilidade represente um déficit motivacional imposto pelo estresse, outros acreditam que ele representaria apenas uma tentativa do animal de poupar energia frente a uma situação de estresse inescapável (Cryan et. al., 2002). De qualquer maneira, considerando que a redução do TI é conseguida apenas com tratamentos antidepressivos (com exceção de efeitos falso-positivos induzidos por drogas psicoestimulantes), há consenso no fato de que essa medida é confiável para indicar

um possível efeito antidepressivo, independente de qual seja seu significado comportamental.

Uma das causas de muitas discussões sobre o FST se faz diante do tratamento subagudo utilizado, pois, embora esse se mostre eficaz para o modelo, sabemos que os efeitos terapêuticos dos antidepressivos em humanos necessitam de algumas semanas para se tornarem aparentes (Cryan et. al., 2005; Detke et. al., 1995; Porsolt et. al., 1979). Apesar disso, o modelo se mostra confiável em identificar novos compostos com potencial efeito antidepressivo e para se estudar a neurobiologia da depressão, principalmente devido à sua alta preditibilidade farmacológica e reprodutibilidade dos resultados entre diferentes laboratórios (Cryan et. al., 2002, 2005). Esses fatores, associados à sua fácil execução e baixo custo experimental, fazem com que esse seja o modelo animal de depressão mais empregado atualmente.

Assim, os resultados obtidos no presente estudo, corroborando outros trabalhos já descritos na literatura (Jefferys e Funder, 1996; Harkin et. al., 1999; Yildiz et. al., 2000; Cryan et. al., 2002; Lino-de-Oliveira, 2006; Zhou et. al., 2007), demonstraram que a administração de VLF, FLX, dois antidepressivos convencionais, induziu efeito tipo-antidepressivo no modelo. Em relação ao NO, em particular, nossos resultados também corroboram outros descritos na literatura onde se observou efeito do tipo-antidepressivo no FST induzido pelo tratamento com inibidores da NOS (Jefferys & Funder, 1996; Yildiz et. al., 2000; Joca & Guimarães, 2006), dando, portanto, maior sustentação ao provável envolvimento do NO na neurobiologia da depressão.

Nesse sentido, há evidências de que o estresse promove aumento dos níveis de NO em diversas estruturas encefálicas envolvidas na neurobiologia da depressão (Madrgal et. al., 2001; Harvey et. al., 2005; Wegener & Volke, 2010). Há relatos de

que níveis elevados desse neurotransmissor poderiam induzir efeitos neurotóxicos (Dawson et. al., 1991; Dawson, 1995; Velardez et. al., 2004; Zhou et. al., 2007; Joca et. al., 2007) e provocar danos celulares e prejuízos funcionais ao SNC (Calabrese et. al., 2007). Tais danos, por sua vez, poderiam contribuir para o desenvolvimento das consequências comportamentais do estresse. Sendo assim, a inibição da síntese de NO poderia induzir efeito tipo-antidepressivo por impedir que o aumento de NO induzido pelo estresse inicie a cascata de eventos descrita acima.

Além do exposto acima, há evidências de que o NO possa modular a os níveis de outros neurotransmissores como serotonina, noradrenalina e dopamina (Kiss, 2000; Kiss & Vissi, 2001; Wegener & Volke, 2010). Acredita-se que tais efeitos neuroquímicos induzidos pelo NO sejam importantes na resposta comportamental/emocional ao estresse (e para a neurobiologia da depressão), uma vez que o efeito tipo-antidepressivo induzido por inibidores da nNOS no nado forçado pode ser abolido pelo pré-tratamento com inibidor da síntese de serotonina, mas não com inibidor da síntese de catecolaminas, sugerindo que os efeitos comportamentais promovidos pela inibição dessa enzima seriam mediados por facilitação na neurotransmissão serotoninérgica (Harkin et. al., 2003). Ainda, corroborando essa hipótese, foi demonstrado, que a inibição da nNOS com NG-nitro-L-arginina (L-NA) ou 1-(2 trifluoromethylphenyl)-imidazol (TRIM), potencializou o efeito de antidepressivos como Fluoxetina e Citalopram, que atuam seletivamente na via serotoninérgica, no modelo do nado forçado (Harkin et. al., 2004; Ulak et. al., 2008). Portanto, pode-se especular que níveis elevados de NO, induzidos pela exposição ao estresse, alterariam os níveis de monoaminas, em particular de serotonina, em estruturas onde essas seriam importantes na modulação da resposta comportamental ao estresse. Diante disso, é possível que o efeito tipo-antidepressivo induzido pelos inibidores da NOS ocorreria por impedir o

desenvolvimento de tais alterações neuroquímicas induzidas pelo NO.

Diante dessas evidências, o presente trabalho almejou avaliar se o efeito tipo antidepressivo induzido pela inibição da nNOS envolveria a participação de estruturas como córtex pré-frontal, hipocampo, estriado (CPu e NAc), habênula, SCP, núcleos amigalóides, tálamo, núcleos da rafe, área septal, LC e PVN. que são comumente envolvidas na resposta comportamental ao estresse (Nakane et. al., 1983; Vincent & Kimura, 1992; Rodrigo et. al., 1994; Iwase et. al., 1998; De Vente et. al., 1998). Nossos resultados demonstraram que o estresse de nado forçado promoveu aumento da atividade neuronal, evidenciada através do aumento da expressão de Fos, em todas essas estruturas, com exceção do hipocampo dorsal e hipocampo ventral, semelhante ao que já havia sido descrito por outros grupos de pesquisa (Duncan et. al., 1996; Salchner et. al., 2004; Lino-de-Oliveira et. al., 2006; Lino-de-Oliveira et. al., 2001; Melia et. al., 1994; Stone et. al., 2007). Além disso, foi demonstrado que o tratamento com inibidor da nNOS atenuou a expressão de Fos nessas estruturas em animais estressados, sem, contudo, induzir efeitos *por si* (em animais não estressados).

Um trabalho recente também buscou analisar a participação do NO presente em diferentes estruturas encefálicas na regulação de comportamentos observados no FST, com e sem antidepressivos (Salcher et. al., 2004). Esse estudo analisou a expressão de Fos no encéfalo de animais que não expressam a enzima nNOS (*knockout* - KO) após terem sido submetidos ao FST. Reforçando nossos achados, o estudo também demonstrou aumento na expressão de Fos induzida pelo estresse na maioria das estruturas analisadas, em relação aos controles não estressados, independente da linhagem. Porém, em contrapartida aos nossos dados, o padrão de ativação de estruturas como CPF, hipotálamo, amígdala medial e hipocampo, nos

animais KO estressados foi significativamente aumentada quando comparados aos selvagens (*wild-type* – WT) estressados, indicando que a ausência da nNOS intensificava a ativação dessas áreas em resposta ao estresse. Vários fatores podem ter contribuído para as diferenças observadas entre os dois estudos, tais como: o fato de se utilizar camundongos, ou seja, outra espécie de animal, também pode ter diferenciado os resultados, além disso, o protocolo de nado forçado utilizado para camundongos (1 sessão de nado e 1 injeção) é diferente do de ratos (2 sessões de nado e 3 injeções). Portanto, acreditamos que nosso estudo apresenta vantagens em relação ao estudo de Salcher et. al., (2004), uma vez que utilizou a inibição farmacológica da nNOS apenas durante a situação experimental, permitindo uma melhor correlação entre a inibição da NOS e os resultados observados durante o FST.

O tratamento com os antidepressivos convencionais promoveu efeitos semelhantes aos do 7-NI sobre a expressão de Fos, com redução do aumento induzido pelo estresse em quase todas as estruturas analisadas, o que também corrobora resultados já descritos na literatura (Duncan et. al., 1996; Muigg et. al., 2007). Como os efeitos induzidos pelo 7-NI foram semelhantes àqueles induzidos pelo tratamento com os antidepressivos convencionais que atuam por regular os níveis de serotonina e noradrenalina, esses dados dão maior sustentação à hipótese de que os efeitos antidepressivos induzidos pela inibição da nNOS envolveriam a regulação dos níveis desses neurotransmissores nas estruturas analisadas, como já mencionado anteriormente. Por outro lado, há evidências de que drogas antidepressivas, independente de classe farmacológica, reduzem a formação de NO no SNC, o que tem sido proposto como um efeito final comum a essas drogas responsável por seus efeitos comportamentais (Li et. al., 2006). Outra possibilidade

é que essas vias sejam comuns ao efeito comportamental induzido por diferentes drogas antidepressivas, independente de seu mecanismo de ação.

Embora muitas estruturas sejam comumente relacionadas à modulação de respostas adaptativas ao estresse e à neurobiologia da depressão, ainda não se sabe ao certo o papel desempenhado por cada uma dessas estruturas no desenvolvimento dessa desordem. Na verdade, ao que tudo indica, trata-se de um circuito bastante complexo com envolvimento de várias estruturas límbicas envolvidas na regulação do afeto e de processos cognitivos (como atenção, aprendizado e memória), no controle da ansiedade e do medo e na regulação endócrina (Nestler et. al., 2002; Krishan & Nestler, 2010). Além disso, há evidências do envolvimento importante de estruturas que controlam estados internos do organismo, tais como a atividade autonômica, ritmos circadianos e metabolismo (Krishan & Nestler, 2010). Assim, alterações nesses circuitos neurais parecem contribuir para o desenvolvimento das diferentes características presentes na depressão, como humor deprimido, anedonia, prejuízos cognitivos, alterações de ritmos circadianos e alterações endócrinas.

O CPF, por exemplo, é uma estrutura com reconhecido envolvimento na modulação de processos cognitivos, estando especialmente envolvido com a função de coordenar seqüências de pensamentos e ações direcionadas a atingir um determinado objetivo. A porção ventromedial (CPFMv), que compreende o IL e o PL, envia projeções para estruturas envolvidas com o controle autonômico da resposta emocional, como hipotálamo e substância cinzenta periaquedutal (SCP), e estruturas límbicas como o estriado ventral, que modula a atribuição de valor à recompensa e os processos de motivação (Vertes, 2006). Além disso, o CPFMv também está conectado com a amígdala, envolvida em processos de detecção de

ameaça e medo condicionado. Já a porção dorsolateral do CPF (CPFdl) está densamente conectada a áreas pré-motoras e sensoriais (Vertes, 2006). Assim, o CPFdl tem sido principalmente associado a funções cognitivas, enquanto o CPFvm é considerado responsável pela modulação de funções afetivas e emocionais (Vertes, 2006).

O CPFmv tem sido descrito como uma estrutura importante na regulação de resposta adaptativas ao estresse, de modo que sua disfunção parece contribuir para o desenvolvimento de distúrbios psiquiátricos, dentre eles a depressão (Egan & Weinberger, 1997; Kalia, 2005). Assim, estudos de neuroimagem demonstram, por exemplo, redução na atividade e diminuição de volume do CPFM em indivíduos deprimidos (Bremner et. al., 2002; Drevets et. al., 1997; Mayberg et. al., 1999), de maneira reversível pelo tratamento com antidepressivos (Goodwin et. al., 1993; Nobler et. al., 1994). Acredita-se que o CPFmv desempenhe um papel fundamental na geração de emoções negativas, uma vez que dados de imagem funcional indicam aumento nos níveis de atividade de repouso do CPFmv durante a experiência subjetiva de um afeto negativo (Price & Drevets, 2010). Assim, os níveis elevados de atividade no CPFM observados em estudos de neuroimagem em pacientes deprimidos poderiam estar relacionados com auto-avaliações negativas, gerando sentimentos de tristeza, baixa auto-estima, culpa, entre outros.

Nossos dados, portanto, corroboram a idéia acima ao demonstrar que animais submetidos a um modelo animal de depressão apresentam aumento da expressão de Fos no CPFM de maneira reversível pelo tratamento com antidepressivos. Nossos dados sugerem, ainda, que o NO possa participar desses processos, uma vez que o tratamento com 7-NI reduziu a ativação do CPFM nos animais estressados. Reforçando esses achados, dados recentes de nosso grupo de

pesquisa demonstram que a inativação temporária (Scopinho et. al., 2010), bem como o bloqueio de receptores NMDA, no CPFMV (Pereira & Joca, 2010 dados não publicados), induz efeito tipo-antidepressivo em ratos submetidos ao FST. Além disso, há evidências de aumento na expressão da nNOS no córtex prefrontal de ratos submetidos ao estresse de restrição (Madrgal et. al., 2001), sugerindo um aumento na síntese de NO nessa estrutura durante situações de estresse.

A área septal é dividida em duas principais regiões: o septo medial e o septo lateral. Esta última parece ter funções clinicamente relevantes em processos neuropsiquiátricos, tendo um papel importante na regulação afetiva, participando de processos emocionais e respostas ao estresse (Ebner et. al., 2008). Essa estrutura recebe inervação glutamatérgica do hipocampo (Carnes et al 1990), noradrenérgica do locus coeruleus (Antonopoulos et al, 2004) e serotoninérgica do núcleo dorsal da rafe (Vertes, 1991). Em geral, o septo lateral parece desempenhar uma função reguladora, integrando estímulos sensoriais e transmitindo informações a regiões responsáveis por promover comportamentos motivacionais, ajustando assim, as respostas comportamentais (Sheehan et. al., 2004). Reforçando esses dados, trabalhos mostram que o septo lateral seria importante na retransmissão de informações entre o hipotálamo e o hipocampo (Risold & Swanson, 1997). Também tem sido proposto que o septo lateral desempenhe um papel regulador na liberação de dopamina no núcleo acumbens (Louilot et. al., 1989).

Com relação à participação da ASL no desenvolvimento das consequências comportamentais do estresse em modelos animais de depressão, há evidências de aumento na atividade neuronal nessa estrutura em animais submetidos a esses modelos (Sheehan et. al., 2004). No modelo do nado forçado observa-se aumento da expressão de Fos na ASL que é atenuada por tratamento com antidepressivos

(Duncan et. al., 1993, 1996). Além disso, o aumento dos níveis de serotonina na ASL induz efeito tipo antidepressivo no modelo do nado forçado (Ebner et al., 2008). Sendo assim, nossos resultados corroboram os dados anteriores e sugerem que essa estrutura faça parte de um circuito neural que integra e transmite informações para regiões que estariam envolvidas nas respostas comportamentais observadas no FST. Além disso, nossos dados indicam que o efeito antidepressivo induzido pela inibição da síntese de NO possa envolver a participação de neurônios presentes na ASL, já que a administração de 7-NI também reduziu a expressão de Fos nessa estrutura. Contudo, embora não haja estudo a respeito do envolvimento direto do NO na ASL na regulação de comportamentos defensivos relacionados à neurobiologia da depressão, há evidências de que a inibição da síntese de NO nessa estrutura prejudica a aquisição de memória aversiva e induz efeito do tipo-ansiolítico em modelo animal (Calixto et. al., 2008).

Outra estrutura relacionada aos efeitos do estresse e sintomas depressivos é o estriado, incluindo o núcleo acumbens e caudato putamen. O núcleo acumbens está dividido em duas porções (*core e shell*) e estudos recentes indicam que a porção *core* estaria envolvida no controle da impulsividade e em processos de aprendizado (Ito et. al., 2004, Jentsch & Taylor et. al., 1999) enquanto a porção *shell* com comportamentos de motivação (Conrad et. al., 2008; Kourrich et. al., 2007). Evidências sugerem um papel importante do núcleo acumbens no desenvolvimento de sintomas como anedonia, frequentemente observado no distúrbio depressivo (DiChiara et. al., 1999; Yadid et. al., 2001). Além disso, a exposição ao estresse, um dos fatores que podem levar a depressão, promove esse sintoma tanto em seres humanos quanto em roedores (Barr et. al., 2002; Willner et. al., 1992). Assim como nosso trabalho, outros estudos evidenciaram a ativação dessa estrutura pelo

estresse (Amir et. al., 1997; Shoji et. al., 2010). Sendo assim, a redução da ativação dessa estrutura em resposta ao tratamento antidepressivo poderia contribuir para a redução da anedonia apresentada por esses indivíduos. O NO poderia desempenhar um papel importante nesses processos, uma vez que: 1. estresse aumenta a expressão de nNOS no NAc (Liu et. al., 2008); 2. NO regula os níveis de dopamina no NAc (Kiss 2000), onde níveis reduzidos desse neurotransmissor são frequentemente relacionados à anedonia (Shirayama & Chaki, 2006); 3. a administração sistêmica de fluoxetina reduz a produção de NO no estriado em resposta à administração local de NMDA (Crespi, 2009). Contudo, permanece não investigado o envolvimento do NO no NAc na modulação de comportamentos relacionados à neurobiologia da depressão, como o aumento da imobilidade no nado forçado.

O caudato putamen também foi uma região analisada, pois trata-se de uma complexa estrutura envolvida em processos de aprendizagem e recompensa, os quais estão prejudicados na depressão (Atallah et. al., 2007; Pizzagali et. al., 2009). Trabalhos mostraram que o uso crônico de FLX promoveu sensibilização dos locais de captação de serotonina e sugeriram que isso poderia estar relacionado com o efeito antidepressivo da droga (Hrdina & Vu, 1993). Pacientes suicidas com diagnóstico de depressão apresentaram redução dos níveis de ácido dihidroxifenilacético (DOPAC), um metabólito da dopamina, no Caudato Putamen (Bowden et. al., 1997). Assim como para o NAc, também não há evidências do envolvimento do NO presente no CPu na modulação de respostas adaptativas ao estresse. Contudo, nossos resultados sugerem que esta estrutura faça parte de um circuito neural envolvido com a resposta a drogas antidepressivas, incluindo inibidor da nNOS.

O PVT tem projeções para o CPF, amígdala e núcleo acumbens (Otake et. al., 2002), formando um circuito cujo funcionamento inadequado parece contribuir para a ocorrência de alterações emocionais e cognitivas que estão presentes na depressão (Clark et. al., 2009). Corroborando essa idéia, há evidências de que o tálamo é ativado durante situações de estresse (Otake et. al., 2002), de maneira sensível ao tratamento antidepressivo (Beck & Fibiger, 1995), e que essa estrutura modula respostas comportamentais, endócrinas e/ou autonômicas frente ao mesmo (Spencer et. al., 2004). Nossos resultados, portanto, corroboram os dados anteriores, sugerindo que a ativação do tálamo participa da resposta emocional ao estresse e do efeito tipo-antidepressivo induzido por drogas, incluindo os inibidores da nNOS.

Outra estrutura tradicionalmente envolvida na neurobiologia da depressão é o hipocampo (Nestler, 2002; Castren, 2005). Diversos trabalhos mostram, por exemplo, que há uma diminuição no volume dessa estrutura em pacientes deprimidos (Sheline, 2000; Malykhin et. al., 2010) e aumento da atividade em indivíduos que não respondem ao tratamento antidepressivo (Mayberg et. al., 2000). Evidências também demonstram que o tratamento crônico com diferentes antidepressivos promove alterações plásticas no hipocampo caracterizadas pelo aumento da expressão de BDNF (*brain derived neurotrophic factor*) e da neurogênese, processos que são necessários para o efeito comportamental dessas drogas (Pittenger & Duman, 2008). Embora alguns trabalhos tenham demonstrado que o estresse seja capaz de promover aumento da expressão de Fos no hipocampo (Guimarães et. al., 1993; Beck & Fibiger, 1995), isso não foi observado no presente trabalho. De acordo com nossos dados, Duncan e colaboradores (1994) também não observaram expressão de Fos em animais submetidos ao FST. Tais

discrepâncias podem estar relacionadas à intensidade do estresse (Beck & Fibiger, 1995) e/ou ao fato de existirem diferenças temporais na expressão de Fos no hipocampo em relação a outras estruturas (Bekinschtein, 2007; Hanson & Fuxe, 2008; Bekinschtein, 2008).

Corroborando um provável envolvimento do hipocampo na neurobiologia da depressão, dados do nosso grupo demonstram que a administração de inibidor seletivo da receptação de serotonina (Joca et. al., 2003), de antagonista NMDA (Padovan & Guimarães, 2004) ou de inibidor da nNOS (Joca & Guimarães, 2006; Joca et. al., 2007) Portanto, embora não tenhamos observado alterações na expressão de Fos em animais submetidos ao FST e tratados com antidepressivos, os dados descritos acima permitem sugerir que a formação de NO no hipocampo desempenhe um importante papel na mediação de respostas adaptativas ao estresse.

A habênula é uma estrutura que consiste em um par de pequenos núcleos localizados acima do PVT (Concha & Wilson, 2001; Butler & Hodos, 2005). Trabalhos recentes utilizando animais e seres humanos sugerem que essa estrutura estaria envolvida no controle do comportamento motivacional (Sutherland 1982; Klemm, 2004; Lecourtier & Kelly 2007; Geisler & Trimble 2008) e que sua hiperatividade conduziria a mudanças de atividades mesencéfalicas presentes durante estados depressivos (Sartorius & Henn, 2007; Hikosaka et. al., 2008). Lesões nessa estrutura bloquearam o efeito antidepressivo da Nomifensina (inibidor da recaptção de dopamina) no FST (Thornton et. al., 1985), indicando que ela seja um substrato para o efeito comportamento de drogas antidepressivas. Contudo, não há evidências a cerca da participação do NO na habênula na regulação da resposta comportamental ao estresse.

Em relação aos núcleos hipotalâmicos, esses fazem parte de um circuito que integra várias respostas autonômicas, endócrinas e comportamentais relacionadas a reações de defesa (Canteras, 2002). A desregulação na organização e funcionamento desse circuito pode contribuir para o surgimento de sintomas físicos e endócrinos presentes em transtornos afetivos, como a depressão (Farmularo et. al., 1992; Fava & Kendler, 2000; Kerman, 2008; Nestler et. al., 2002; Caspi et. al., 2003).

Dentre os núcleos hipotalâmicos envolvidos na elaboração de respostas relacionadas ao estresse está o PVN, uma estrutura complexa e necessária para desencadear respostas autonômicas e endócrinas responsáveis pela secreção de hormônios que irão ajudar na manutenção da homeostasia do organismo e adaptação ao estresse (Benarroch, 2005; Harbuz & Lightman, 1992; Sawchenko & Swanson, 1983). O PVN secreta um fator de liberação de corticotrofina, que por sua vez, promove a síntese e liberação de glicocorticóides, os quais agem periféricamente e em diversas regiões encefálicas exercendo efeitos no metabolismo e afetando respostas comportamentais (Fuxe et. al., 1996; Carrasco & Van de Kar, 2003). Trabalhos sugerem que a hiperativação desse eixo denominado hipotálamo-hipófise-adrenal (HPA), frente ao estresse, promove algumas alterações que contribuem para o processo depressivo (Tsigos & Chrousos 2002, Keller et. al., 2005). Por exemplo, em humanos deprimidos a ativação excessiva do eixo HPA é observada frequentemente, com manifestação de hipercortisolemia e ausência de supressão com corticóide sintético (Gold et. al., 1995; Keller et. al., 2006). A expressão (De oliveira et. al., 2000). O excesso de glicocorticóide tem sido proposto como um dos principais mecanismos responsáveis por induzir alterações plásticas no hipocampo, como redução da expressão de fatores tróficos e redução da

neurogênese, o que prejudica a adaptação ao estresse e parece contribuir para o desenvolvimento de conseqüências comportamentais relacionadas à neurobiologia da depressão (Pittenger e Duman, 2008). Tais lesões hipocâmpais intensificariam ainda mais a hiperatividade do eixo HPA, uma vez que o hipocampo controla inibitoriamente a atividade do eixo (Herman et. al., 2005).

De fato, diferentes tipos de estresse ativam o eixo HPA, e isso pode ser atenuado pelo tratamento com drogas antidepressivas (Duncan et. al., 1994; Herman & Cullinan, 1997; Pakac & Palkovits, 2001). Trabalhos recentes sugerem que o NO seja um importante modulador da atividade do eixo HPA durante situações de estresse, promovendo aumento da atividade do eixo em situações de estresse intenso (Rivier, 2001; Mancuso et. al., 2010). Nossos dados corroboram tais trabalhos ao demonstrar que o tratamento com antidepressivos ou a redução da formação de NO atenuam o aumento da atividade do PVN em resposta ao estresse.

A amígdala também parece ser um excelente candidato para ação de antidepressivos (Balu et. al., 2009; Matsuzawa-Yanagida et. al., 2008, Muigg et. al., 2007), tendo seu papel bem conhecido na mediação da formação de memórias aversivas e de respostas defensivas relacionadas ao medo e à ansiedade (Ledoux, 1998; Ledoux, 2003). Em humanos deprimidos (Price & Drevets, 2010), e em animais submetidos a estresse (Rosenkranz et. al., 2010), observa-se aumento da atividade da amígdala, o que se acredita estar relacionado ao aumento de ansiedade observado nesses pacientes. Além disso, como a amígdala é uma estrutura envolvida com a ativação do eixo HPA, sua hiperatividade poderia contribuir para a hipercortisolemia observada em indivíduos deprimidos (Herman & Cullinan, 1997)

Dados mostram que a amígdala contém abundante presença de NOS (Bredt et. al., 1991; Vicent & Kimura, 1992; Tanaka et. al., 1997). Em nosso trabalho observamos marcação significativa apenas na porção medial da amígdala, corroborando estudos que sugerem um importante papel dessa porção em resposta a estímulos agudos (Vinkers et. al., 2009). Outros trabalhos também verificaram aumento na expressão de Fos na amígdala medial frente a estressores emocionais como, estresse de restrição (Chen & Hebert, 1995; Bhatnagar & Dallman 1998, De Oliveira et. al., 2001), exposição ao gato (Dielenberg et. al., 2001; Beijamini e Guimarães, 2006b), exposição ao labirinto em cruz elevado (Beijamini e Guimarães, 2006a) e também ao FST (Cullinan et. al., 1995). Além disso, há evidências de que a exposição ao estresse promove aumento da expressão de Fos em neurônios produtores de NO na amígdala medial (Beijamini e Guimarães, 2006a e 2006b) e que a administração de inibidores da NOS nessa estrutura induz efeito do tipo ansiolítico em modelos animais (Forestiero et. al., 2004). Esses dados sugerem que a produção de NO na amígdala medial durante situações aversivas inescapáveis desempenhe um papel importante na modulação da resposta emocional ao estresse, promovendo, por exemplo, aumento de ansiedade. Diante dessa perspectiva, a diminuição da produção de NO na amígdala medial poderia diminuir o impacto emocional do estresse durante a sua exposição e, assim, facilitar a adaptação a eventos aversivos subsequentes, como no caso do teste do nado forçado. Sendo assim, podemos especular que as drogas antidepressivas utilizadas nesse estudo tenham atenuado a ativação de neurônios nitrérgicos na amígdala medial e, conseqüentemente, a produção de NO, facilitando a adaptação ao estresse e induzindo efeitos do tipo-antidepressivos.

Apesar de a amígdala basolateral também apresentar-se como uma estrutura importante na modulação da resposta emocional ao estresse (Salm et. al., 2004, Shelton, 2004), não observamos marcação significativa, de modo que não foi realizada a quantificação de Fos nessa estrutura.

O BNST também é uma importante região envolvida na modulação do comportamento defensivo (Lee & Davis, 1997; Sullivan et. al., 2004b; Meloni et. al., 2006) e na mediação de respostas autonômicas e endócrinas ao estresse (Casada & Dafny, 1991; Hammack et. al., 2004, Crestani et. al., 2009; Hammack et. al., 2009). Essa estrutura se conecta a regiões subcorticais e corticais (Dong et. al., 2001; Dong et. al., 2004; McDonald, 1983), além disso, recebe inervação serotoninérgica do núcleo dorsal da rafe e expressa vários receptores 5-HT (Vertes 1991, Halberstadt & Balaban 2008), estando envolvido em muitos processos autonômicos, neuroendócrinos e motivacionais relacionados ao estresse (Sullivan et. al., 2004b; Schulz & Canbeyli, 1999; Onaka & Yagi, 1998). Além disso, o BNST se mostra criticamente envolvido em muitos aspectos de memória e aprendizagem (McEwen, 2000; Holsboer, 2000; Herman et. al., 1994). Muito importante é sua participação na regulação do eixo HPA, integrando vias provenientes do CPF, do hipocampo e da amígdala na modulação da atividade do eixo (Herman et. al., 2005). Estudo recente demonstra que a inativação temporária do BNST induziu efeito antidepressivo no modelo do nado forçado (Crestani et. al., 2010), indicando que sua ativação prejudique o desenvolvimento de respostas adaptativas ao estresse. Esses dados são coerentes com relatos de que o estresse aumenta a ativação dessa estrutura e que isso é sensível ao tratamento com drogas antidepressivas (Duncan et. al., 1996; presente trabalho). Portanto, disfunções no BNST poderiam contribuir

para o desenvolvimento de consequências comportamentais do estresse através de diferentes mecanismos.

A SCP é uma região encefálica tradicionalmente envolvida nas respostas comportamentais ao estresse incontrolável agudo, facilitando comportamentos defensivos relacionados ao medo e à ansiedade (Guimarães et. al., 1994; De Oliveira & Guimarães, 1999). Mais recentemente, tem sido proposto que essa estrutura também esteja envolvida na neurobiologia da depressão, uma vez que o tratamento com antidepressivos diminuiu a expressão de Fos na SCP de animais submetidos ao FST (Lino-de-Oliveira et. al., 2006). Trabalhos também mostraram um aumento na expressão de Fos em ratos expostos a situações de perigo iminente (Beijamini & Guimarães, 2006; Canteras & Goto, 1999; Dielenberg et. al., 2001; McGregor et. al., 2002), e que sua estimulação elétrica promoveu aumento na expressão dessa proteína em regiões como hipotálamo, amígdala, estriado, tálamo e habênula (Lim et. al., 2009), mostrando que a SPC estaria integrada a um circuito neural que desencadearia algumas das respostas comportamentais observadas no FST, tais como as tentativas de esquivas observadas durante o teste. Embora não haja evidências da participação do NO nesses comportamentos, a nNOS está presente em grandes quantidades na SCP e sua inativação atenua a resposta emocional ao estresse agudo (Guimarães et. al., 1994, 2005).

O locus coeruleus e os núcleos da rafe fazem parte dos denominados núcleos encefálicos monoaminérgicos (Cryrak & Chocyk, 2001), pois dos núcleos da rafe saem às projeções serotoninérgicas e do locus coeruleus as noradrenérgicas que se encaminham para as demais estruturas encefálicas anteriores (Cryrak & Chocyk, 2001). Tanto o locus coeruleus como os núcleos da rafe enviam projeções para regiões envolvidas na neurobiologia da depressão como CPF (Drevets et. al., 2002;

Loughlin et. al., 1986; Moore et. al., 1978; Swanson, 1982) e hipocampo (Jay, 2003; Mongeau et. al., 1997; Sapolsky 2000). Essas estruturas também já foram indicadas como alvo de ação de antidepressivos (Nutt, 2002). Evidências mostram que, tanto o *locus coeruleus* como a porção dorsal da rafe exibem mudanças neuroquímicas e moleculares em pacientes deprimidos vítimas de suicídio (Bach-Mizrachi et. al., 2006, Lowry 2002).

Deakin e Graeff (Deakin & Graeff, 1991; Graeff et. al., 1996) sugeriram que os núcleos da rafe e suas projeções constituiriam sistemas envolvidos com a modulação de respostas defensivas ao estresse agudo (NDR) e crônico (NMR). Enquanto o NDR parece modular comportamentos relacionados à ansiedade, o NMR, através de suas projeções para o hipocampo, parece estar mais envolvido com a mediação de respostas adaptativas ao estresse crônico. Assim, falhas nessa via facilitariam o desenvolvimento das conseqüências comportamentais do estresse, tais como desamparo em animais e a depressão em humanos. Estudos de imunohistoquímica demonstram que o NO está presente grande parte dos neurônios serotoninérgicos do NDR e do NMR (Jonhson & Ma, 1993; Wang, 1994). Apesar disso, há evidências apenas de que a inativação dessa enzima no NDR induz efeito tipo antidepressivo no modelo do nado forçado (Spiacci et. al., 2008). Não há evidências da participação do NO no NMR na regulação dessa via durante situações de estresse relacionadas à neurobiologia da depressão. De qualquer maneira, é possível que o NO regule os níveis de serotonina em outras estruturas onde ela é importante para a adaptação estresse, tais como CPF e hipocampo, por modular a atividade dos neurônios serotoninérgicos do NDR e/ou do NMR.

O *locus coeruleus* (LC) é uma estrutura de onde saem às projeções noradrenérgicas para muitas estruturas do SNC, sendo assim, quando sua atividade

está aumentada ocorre à liberação de noradrenalina em diversas estruturas encefálicas (Itoi & Sugimoto, 2010). Diferentes tipos de estresse promovem aumento da atividade neuronal no LC evidenciada através do aumento na expressão de Fos (Cullinan et. al., 1995, Senba et. al., 1993). Em modelos como estresse de restrição e FST ocorre aumento da expressão de Fos no LC (Chen et. al., 1995; Smith et. al., 1991), o que é atenuado pelo tratamento com antidepressivos reduz a expressão de Fos no LC (Stone et. al., 2010). Há evidências de que o aumento da atividade do LC, e conseqüentemente liberação de noradrenalina em suas regiões de projeção, durante situações de estresse atue como um sistema de alerta que inicia respostas emocionais, autonômicas e endócrinas e facilita a consolidação de memórias aversivas (Morilak et. al., 2005; Tully & Bolshakov, 2010). Dessa maneira, o aumento da atividade do LC durante o estresse pode contribuir para o desenvolvimento de conseqüências comportamentais, de modo que drogas antidepressivas facilitariam a adaptação ao estresse por diminuir a ativação dessa estrutura.

Em resumo, foi verificado aumento da expressão da proteína Fos em diversas estruturas encefálicas analisadas, sugerindo que as mesmas participem da resposta comportamental no FST (Herrera et. al., 1996; Senba & Ueyama, 1997; Hoffman & Lyo, 2002). Além disso, o fato dessa expressão ser reduzida por antidepressivos sugere também a participação dessas estruturas na mediação dos efeitos comportamentais dessas drogas, corroborando seu envolvimento na neurobiologia da depressão. Em adição, o fato de um inibidor da nNOS ter induzido efeitos semelhantes aos antidepressivos convencionais indica que o NO tenha uma participação importante na regulação dessas estruturas diante de situações aversivas relacionadas à neurobiologia da depressão.

Recentemente, foi proposto um circuito neural envolvido na neurobiologia da depressão, em que as diferentes estruturas analisadas nesse estudo aparecem integradas para regular diferentes aspectos dessa desordem (Price e Drevets, 2009; Krishnan e Nestler, 2010). Contudo, nossos resultados não permitem maiores conclusões a respeito dessas vias, mas indicam que o NO poderia ter um papel importante na modulação das funções mediadas por tais estruturas.

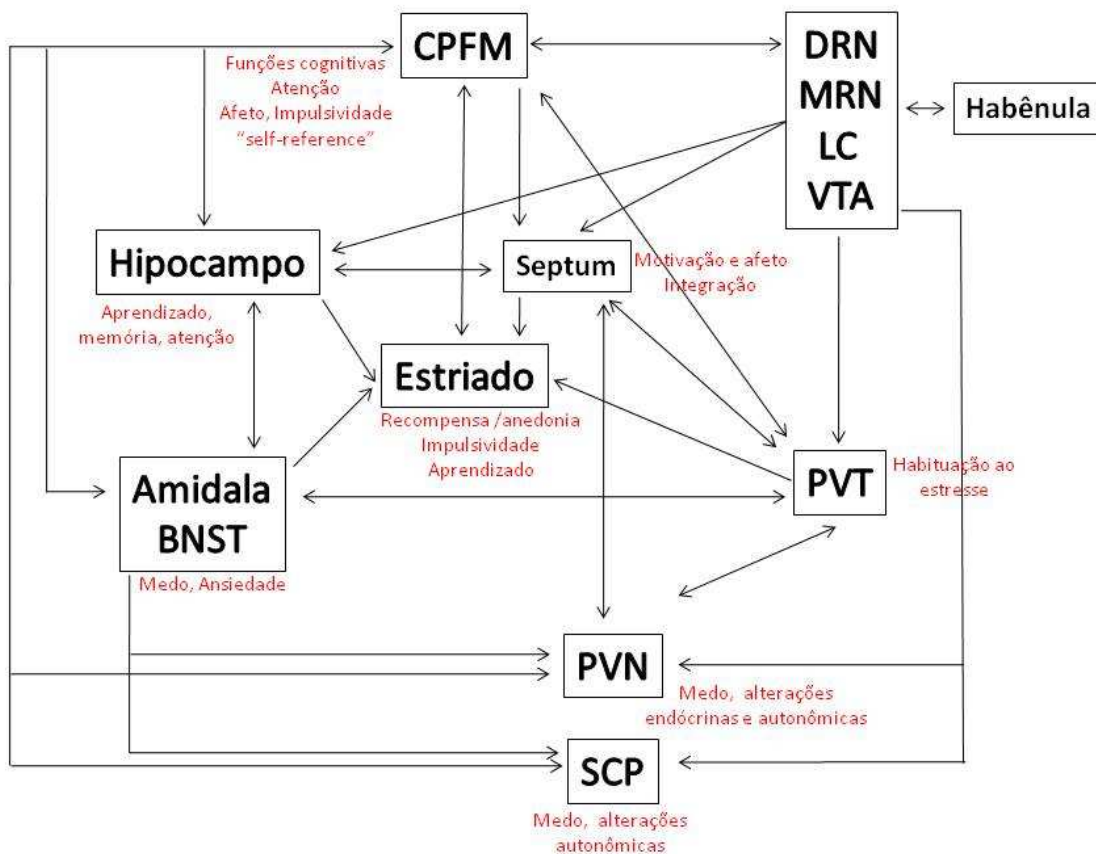


Figura 15: Diagrama adaptado de Price e Drevets (2010), propondo um circuito neural relacionado à neurobiologia da depressão.

CONCLUSÃO

Os resultados do presente trabalho permitem as seguintes conclusões:

- A inibição da síntese de NO através de um inibidor preferencial de nNOS promoveu efeito tipo-antidepressivo no FST;
- Esses efeitos foram acompanhados de redução na expressão da proteína Fos em diversas estruturas encefálicas (CPF, Núcleos da Rafe, Locus coeruleus, PT, Caudato Putamen, SCP, PVN, Habênula, BNST e Amígdala), quando comparados ao grupo controle, sugerindo que o NO seria importante na modulação da atividade dessas estruturas durante situações de estresse.
- O tratamento com antidepressivos convencionais induziu efeitos semelhantes aos do 7-NI, sugerindo que essas drogas, embora com mecanismos de ação diferentes, parecem compartilhar as mesmas vias neurais envolvidas em seus efeitos comportamentais (antidepressivos).
- Os resultados, em conjunto, corroboram o provável envolvimento do NO na neurobiologia da depressão.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AGUIAR DC (2008). Envolvimento das neurotransmissões glutamatérgica e nitrérgica da substância cinzenta periaquedutal dorsolateral e do núcleo prémamilar dorsal na elaboração de respostas defensivas. Tese (Doutorado em Ciências) – Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto; Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 145f.
- AKAZAWA K, CUI Y, TANAKA M, KATAOKA Y, YONEDA Y, WATANABE Y (2010). Mapping of regional brain activation in response to fatigue-load and recovery in rats with c-Fos immunohistochemistry. **Neuroscience Research** 66, 372–379.
- AMIR S, RACKOVER M, FUNK D (1997). Blockers of oxide nitric syntase inhibit stress activation of c-fos expression in neurons of the hypothalamic paraventricular nucleus in the rat. **Neuroscience**, 77(3):623-7.
- AMERICAN PSYCHIATRIC ASSOCIATION (1994). Diagnostic and statistical Manual of mental disorders (DSM IV). 4.Ed, Washington DC, American Psychiatric Press.
- ANGST J, GAMMA A (2008). Diagnostic and course of affective psychoses: was Kraepelin right? **Eur Arch Psychiatry Clin Neurosci**, 258(Suppl 2):107-110.
- ANTONOPOULOS J, LATSARI M, DORI I, CHIOTELLI M, PARNAVELAS JG, DINOPOULOS A (2004). Noradrenergic innervation of the developing and mature septal area of the rat. **J Comp Neurol**, 476,80–90.
- ATALLAH HE, LOPEZ-PANIAGUA D, RUDY JW, O'REILLY RC (2007). Separate neural substrates for skill learning and performance in the ventral and dorsal striatum. **Nature Neuroscience**, 10(1):126–131
- AXELROD J, INSCOE JK (1963). The Uptake And Binding Of Circulating Serotonin And The Effect Of Drugs. **J Pharmacol Exp Ther**, 141, 161-5.
- AZIMA H, VISPO RH (1958). Imipramine: a potent new anti-depressant compound. **Clin. Notes**, 245-6.
- BACH-MIZRACHI H, UNDERWOOD MD, KASSIR SA, BAKALIAN MJ,

- SIBILLE E, TAMIR H, MANN JJ, ARANGO V (2006). Neuronal tryptophan hydroxylase mRNA expression in the human dorsal and median raphé nuclei: major depression and suicide. **Neuropsychopharmacology**, 31, 814–824.
- BALU DT, HODES GE, ANDERSON BT, LUCKI I (2009). Enhanced sensitivity of the MRL/MpJ mouse to the neuroplastic and behavioral effects of chronic antidepressant treatments. **Neuropsychopharmacology**, 34,1764–1773.
- BARR AM, MARKOU A, PHILIPS AG (2002). A ‘crash’ course on psychostimulant withdrawal as a model of depression. **Trends Pharmacol Sci**,23, 475–482.
- BECK C H, FIBIGER HC (1995). Chronic desipramine alters stress-induced behaviors and regional expression of the immediate early gene, c-fos. **Pharmacol Biochem Behav**, 51:331–338.
- BEIJAMINI V, GUIMARÃES FS (2006b). C-Fos expression increase in NADPH-diaphorese positive neurons after exposure to a live cat. **Behav Brain Res**, 170, 52-61.
- BEIJAMINI V, GUIMARÃES FS (2006a). Activation of neurons containing the enzyme nitric oxide synthase following exposure to an elevated plus maze. **Brain Research Bulletin**, 69, 347-355.
- BEKINSCHTEIN P (2007). Persistence of long-term memory storage requires a late protein synthesis- and BDNF- dependent phase in the hippocampus. **Neuron**, 53, 261-277.
- BEKINSCHTEIN P (2008). BDNF is essential to promote persistence of long-term memory storage. **Proc Natl Acad Sci USA**,105, 2711–2716.
- BENARROCH EE (2005). Paraventricular nucleus, stress response, and cardiovascular disease. **Clin Auton Res**, 15(4): 254-63.

BERNSTEIN HG, HEINEMANN A, KRELL D, DOBROWOLNY H, BIELAU H, KEILHOFF G, BOGERTS B (2005). Hypothalamic nitric oxide synthase in affective disorder: Focus on the suprachiasmatic nucleus. **Cell Mol Biol**, 51,279-284.

BHATNAGAR S, DALLMAN M (1998). Neuroanatomical basis for facilitation of hypothalamic-pituitary-adrenal responses to a novel stressor after chronic stress. **Neuroscience**, 84(4):1025-39.

BLIER P & WARD NM (2003). Is there a role for 5-HT_{1A} agonists in the treatment of depression? **Biol Psychiatry**, 53(3):193-203.

BONDI CO, BARRERA G, DANET MSL, BERDARD T, MAHAN A, MORILAK DA (2007). Noradrenergic facilitation of shock-probe defensive burying in lateral septum of rats, and modulation by chronic treatment with desipramine. **Progress in Neuro-Psychopharmacology & Biological Psychiatry**, 31, 482–495.

BOWDEN C, CHEETHAM SC, LOWTHER S, KATONA CL, CROMPTON MR, HORTON RW (1997). Dopamine uptake sites, labelled with [³H]GBR12935, in brain samples from depressed suicides and controls. **Eur Neuropsychopharmacol**, 7(4):247-52.

BRADY LS (1994). Stress, antidepressant drugs and the locus coeruleus. **Brain Res Bull**, 35, 545-556.

BRETT DS, GLATT CE, HWANG PM, FOTUHI M, DAWSON TM, SNYDER SH (1991). Nitric oxide synthase protein and mRNA are discretely localized in neuronal populations of the mammalian CNS together with NADPH diaphorase. **Neuron**, 7, 615–624.

BRETT DS & SNYDER SH. (1994). Nitric oxide: a physiologic messenger molecule. **Ann Rev Biochem**, 63: 175-95.

BREMNER JD et al (2002). Reduced volume of orbitofrontal cortex in major depression. **Biol Psychiatry**, 51, 273–279.

BUTLER AB, HODOS W (2005). Comparative Vertebrate Neuroanatomy: Evolution and Adaptation. **Wiley-Liss; Hoboken, New Jersey.**

CANTERAS NS, CHIAVEGATTO S, VALLE LE, SWANSON LW (1997). Severe reduction of rat defensive behavior to a predator by discrete hypothalamic chemical lesions. **Brain Research Bulletin**, 44(3):297-305.

CANTERAS NS, GOTO M (1999). Fos-like immunoreactivity in the periaqueductal Gray of rats exposed to a natural predator. **Neuroreport**, 10(2): 413-8.

CANTERAS NS (2002). The medial hypothalamic defensive: hodological organization and functional implications. **Pharmacol Biochem Behav**, 71(3): 481-91.

CALABRESE V, MANCUSO C, CALVANI M, RIZZARELLI E, BUTTERFIELDS DA, STELLA AMG (2007). Nitric oxide in the central nervous system: neuroprotection versus neurotoxicity. **Nature Rev Neuroscience**, 8: 766-773.

CARRASCO GA, VAN DE KAR LD (2003). Neuroendocrine pharmacology of stress. **Eur J Pharmacol**, 463(1-3):235-72.

CASADA, DAFNY N (1991). Restraint and stimulation of bed nucleus of the stria terminalis produce similar stress-like behaviors. **Brain Res Bull**, 27, 207–212.

CASPI A, SUGDEN K, MOFFITT TE, TAYLOR A, CRAIG IW, HARRINGTON H, McCLAY J, MILL J, MARTIN J, BRAITHWAITE A, POULTON R (2003). Influence of life stress on depression: moderation by a polymorphism in the 5-HTT gene. **Science**, 301, 386–389.

CASTRÉN E (2005). Is mood chemistry? **Nature Rev Neuroscience**, 6:241-246.

CHEN X, HERBERT J (1995). Regional changes in c-fos expression in the basal forebrain and brainstem during adaptation to repeated stress: correlations with cardiovascular, hypothermic and endocrine responses. **Neuroscience** 64, 675-685.

CONCHA ML, WILSON SW (2001). Asymmetry in the epithalamus of vertebrates. **J Anat**, 199(Pt 1-2):63-84.

CRESPI F (2009). The selective serotonin reuptake inhibitor fluoxetine reduces striatal in vivo levels of voltammetric nitric oxide (NO): a feature of its antidepressant activity? **Neurosci Lett**, 470(2):95-9.

CRESTANI CC, BUSNARDO C, TAVARES RF, ALVES FH, CORREA FM (2009). Involvement of hypothalamic paraventricular nucleus non-N-methyl-D-aspartate receptors in the pressor response to noradrenaline microinjected into the bed nucleus of the stria terminalis of unanesthetized rats. **Eur J Neurosci**, 29(11):2166-76.

CRESTANI CC, ALVES FHF, CORREA FMA, GUIMARÃES FS, JOCA SRL (2010). Acute reversible inactivation of the bed nucleus of stria terminalis induces antidepressant-like effect in the rat forced swimming test. **Behavioral and Brain Functions**, 6:30.

CRYAN JF, MARKOU A, LUCKI I (2002). Assessing antidepressant activity in rodents: recent developments and future needs. **Trends Pharmacol Sci**, 23(5): 238-245.

CRYAN JF, PAGE ME, LUCKI I. (2005). Differential behavioral effects of the antidepressants reboxetine, fluoxetine, and moclobemide in a modified forced swim test following chronic treatment. **Psychopharmacology**, 182, 335-344.

CRYAN JF, VALENTINO RJ, LUCKI I (2005). Assessing substrates underlying the behavioral effects of antidepressants using the modified rat forced swimming test. **Neurosci Biobehav Rev**, 29, 547-69.

CZYRAK A, CHOCHYK A (2001). Search for the presence of glucocorticoid receptors in dopaminergic neurons of rat ventral tegmental area and substantia nigra. **Pol J Pharmacol**, 53, 681-684.

CULLINAN WE, HERMAN JP, BATTAGLIA DF, AKIL H, WATSON SJ (1995). Pattern and time course of immediate early gene expression in rat brain following acute stress. **Neuroscience**, 64 (2): 477-505.

DAWSON VL (1995). Nitric oxide: role in neurotoxicity. **Clin Exp Pharmacol Physiol**, 22(4):305-8.

DAWSON VL, DAWSON TM, LONDON ED, BREDT DS, SNYDER SH (1991). Nitric oxide mediates glutamate neurotoxicity in primary cortical cultures. **Proc Natl Acad Sci USA**, 88:6368–6371.

DEAKIN JFW, GRAEFF FG (1991). 5-HT and mechanisms of defence. **Journal Psychopharmacology**, 5, 305-315.

DELGADO PL, CHARNEY DS, PRICE LH, AGHAIANIAN GK, LANDIA H, HENINGER GR (1990). Serotonin function and the mechanism of antidepressant action. Reversal of antidepressant-induced remission by rapid depletion of plasma tryptophan. **Arch Gen Psychiatry**, 47(5):411-8.

De OLIVEIRA RMW, GUIMARÃES FS (1999). Anxiolytic effect of methylene blue microinjected into the dorsal periaqueductal gray. **Braz J Med Biol Res**, 32:1529–1532

De OLIVEIRA RMW, DEAKIN JF, GUIMARÃES FS (2000). Neuronal nitric oxide synthase (NOS) expression in the hippocampal formation of patients with schizophrenia and affective disorder. **J Psychopharmacol**, 14:8 (suppl).

De OLIVEIRA RW, DEL BEL EA, GUIMARÃES FS (2001). Effects of excitatory amino acids and nitric oxide on flight behavior elicited from the dorsal periaqueductal gray. **Neurosci Biobehav Rev**, 25, 679–685.

DETKE MJ, RICKELS M, LUCKI I (1995). Active behaviors in the rat forced swimming test differentially produced by serotonergic and noradrenergic antidepressants. **Psychopharmacology**, 121, 66-72.

De VENTE J, HOPKINS DA, MARKERINK-VAN IM, EMSON PC, SCHMIDT HH, STEINBUSCH HW (1998). Distribution of nitric oxide synthase and nitric-receptive, cyclic GMP-producing structures in the rat brain. **Neuroscience**, 87, 207-241.

Di CHIARA G, LODDO P, TANDA G (1999). Reciprocal changes in prefrontal and limbic dopamine responsiveness to aversive and rewarding stimuli after chronic mild stress: implications for the psychobiology of depression. **Biol Psychiatry**, 46, 1624–1633.

DIELENBERG RA, HUNT GE, MCGREGOR IS (2001). “When a rat smells cat”: the distribution of Fos immunoreactivity in rat brain following exposure to a predatory odor. **Neuroscience**, 104, 1085-97.

DONG HW, PETROVIC GD, SWANSON LW (2001). Topography of projections from amygdala to the bed nuclei of the stria terminalis, **Brain Res Rev**, 38, 192–246.

DONG HW, SWANSON LW (2004). Projections from the bed nuclei of the stria terminalis, posterior division: implications for cerebral hemisphere regulation of defensive and reproductive behaviors. **J Comp Neurol**, 471, 396–433.

DREVETS WC, PRICE JL, SIMPSON Jr JR, et al (1997). Subgenual prefrontal cortex abnormalities in mood disorders. **Nature**, 386 (6627):824–827.

DREVETS WC, BOGERS W, RAICHLE ME (2002). Functional anatomical correlates of antidepressant drug treatment assessed using PET measures of regional glucose metabolism. **Eur Neuropsychopharmacol**, 12, 527–544.

DUNCAN GE, KANAPP DJ, JOHNSON KB, BREESE GR (1996). Functional Classification of Antidepressants Based on Antagonism of Swim Stress-Induced Fos-Like Immunoreactivity. **The American Society for Pharmacology and Experimental Therapeutics**. 277, 1076-1089.

EBNER K, SINGEWALD GM, WHITTLE N, FERRAGUTIZ F, SINGEWALD N (2008). Neurokinin 1 Receptor Antagonism Promotes Active Stress Coping Via Enhanced Septal 5-HT Transmission. **Neuropsychopharmacology** 33, 1929–1941.

EGAN MF, WEINBERGER DR (1997). Neurobiology of schizophrenia. **Curr Opin Neurobiol**, 7(5):701-7.

EREN I, NAZIROGLU M, DEMIRDAS A, CELIK O, UGUZ AC, ALTUNBASAK A, OZMEN I, UZ E (2007). Venlafaxine modulates depression-induced oxidative stress in brain and medulla of rat. **Neurochem Res**, 32(3):497-505.

EROGLU L, ÇAGLAYAN B (1997). Anxiolytic and antidepressant properties of methylene blue in animal models. **Pharmacol Res**, 36(5):381-5.

FARIVAR R, ZANGENEHPUR S, CHAUDHURI A (2004). Cellular-resolution activity mapping of the brain using immediate-early gene expression. **Frontiers in Bioscience**, 1(9):104-9.

FAVA M & KENDLER KS (2000). Major depressive disorder. **Neuron**, 28(2):335-41.

FRIEBE A, KOESLING D (2003). Regulation of nitric oxide-sensitive guanylyl cyclase, **Circ Res**, 93(2):96-105.

FURCHGOTT RF, ZAWADZKI JV (1980). The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine. **Nature**, 288(5789):373-6.

FUXE K, DIAZ R, CINTRA A, BHATNAGAR M, TINNER B, GUSTAFSSON JA, OGREN SO, AGNATTI LF (1996). On the role of glucocorticoid receptors in brain plasticity. **Cell Mol Neurobiol**, 16(2):239-58.

GARTHWAITE J, CHARLES SL, CHESS-WILLIAMS R (1988). Endothelium-derived relaxing factor release on activation of NMDA receptors suggests role as intercellular messenger in the brain. **Nature**, 336(6197):385-8.

GEISLER S, TRIMBLE M (2008). The lateral habenula: No longer neglected. **CNS Spectr**, 13, 484–489.

GLOWSINSKI J, AXELROD J (1964). Inhibition of uptake of tritiated-noradrenaline in the intact rat brain by imipramine and structurally related compounds. **Nature**, 204, 1318-19.

GOLD PW, LICINIO J, WONG ML, CHROUSOS GP (1995). Corticotropin releasing hormone in the pathophysiology of melancholic and atypical depression and in the mechanism of action of antidepressant drugs. **Ann NY Acad Sci**, 771, 716-29.

GOODWIN GM, AUSTIN MP, DOUGALL N, ROSS M, MURRAY C, et al (1993). State changes in brain activity shown by the uptake of ^{99m}Tc-exametazime with single photon emission tomography in major depression before and after treatment. **J Affect Disord**, 29(4):243-53.

GRAEFF FG, SILVEIRA MC, NOGUEIRA RL, OLIVEIRA RM (1993). Role amygdala and periaqueductal Gray in anxiety and panic. **Behavioral Brain Research**, 58, 123-131.

GRAEFF FG, GUIMARÃES FS (1999). Medicamentos Antidepressivos e Estabilizadores do Humor. **Fundamentos de Psicofarmacologia**, Editora Atheneu, São Paulo.

GRAEFF FG, GUIMARÃES FS, De ANDRADE TG, DEAKIN JF (1996). Role of 5-HT in stress, anxiety, and depression. *Pharmacol Biochem Behav*, 54(1):129-41

GUIMARAES FS, BEIJAMINI V, MOREIRA FA, AGUIAR DC, de LUCCA AC (2005). Role of nitric oxide in brain regions related to defensive reactions. **Neurosci Biobehav Rev**, 29:1313–1322.

GUIMARÃES FS, DEL BEL EA, PADOVAN CM, MENDONÇA NETTO S (1993). Titz-de-Almeida, R. Hippocampal 5-HT receptors and consolidation of stressful memories. **Behav Brain Res**, 58:133–139.

GUIMARÃES FS, DE AGUIAR JC, DEL BEL EA, BALEJJO G (1994). Anxiolytic effect of nitric oxide synthase inhibitor microinjected into the dorsal central grey. **Neuroreport**, 5,1929–1932.

GUIX FX, URIBESALGO I, COMA M, MUNOZ FJ (2005). The physiology and pathophysiology of nitric oxide in the brain. **Progress in Neurobiology**, 76, 126-152.

HALBERSTADT AL, BALABAN CD (2008). Selective anterograde tracing of nonserotonergic projections from dorsal raphe nucleus to the basal forebrain and extended amygdala, **J Chem Neuroanat**, 35, 317–325.

HAMMACK SE, GUO JD, HAZEA R, DABROWSKA J, MYERS KM, RAINNIE DG (2009). The response of neurons in the bed nucleus of the stria terminalis to serotonin: implications for anxiety, **Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry**, 33,1309–1320.

HAMMACK SE, RICHEY KJ, WATKINS LR, MAIER SF (2004). Chemical lesion of the bed nucleus of the stria terminalis blocks the behavioral consequences of uncontrollable stress. **Behav Neurosci**, 118, 443–448.

HANSSON AC & FUXE K (2008). Time-course of immediate early gene expression in hippocampal subregions of adrenalectomized rats after acute corticosterone challenge. **Brain Res**,18(1215)1-10.

HARBUS MS, LIGHTMAN SL (1992). Stress and the hypothalamo-pituitary-adrenal axis: acute, chronic and immunological activation. **J Endocrinol**, 134(3): 327-9.

HARKIN AJ, BRUCE KH, CRAFF B, PAUL IA (1999). Nitric oxide synthase inhibitors have antidepressant-like properties in mice: 1-acute treatments are effective in the forced swimming test. **Eur J Pharmacol**, 372,207–213.

HARKIN AJ, CONNOR TJ, BURNS MP, KELLY JP (2004). Nitric oxide synthase inhibitors augment the effects of serotonin re-uptake inhibitors in the forced swimming test. **Eur Neuropsychopharmacol**, 14(4):274-81.

HARKIN AJ, CONNOR TJ, WALSH M, ST JOHN N, Kelly JP (2003). Serotonergic mediation of the antidepressant-like effects of nitric oxide inhibitors. **Neuropharmacology**, 44, 616-623.

HARVEY BH, BOTHMA T, NEL A, WEGENER G, STEIN DJ (2005). Involvement of the NMDA receptor, NO-cyclic GMP and nuclear factor K-beta in an animal model of repeated trauma. **Hum Psychopharmacol**, 20(5):367-73.

HEIBERG IL, WEGENER G, ROSENBERG R (2002). Reduction of cGMP and nitric oxide has antidepressant-like effects in the forced swimming test in rats. **Behav Brain Res**, 134(1-2):479-84.

HENINGER GR, DELGADO PL, CHARNEY DSN (1996). The revised monoamine theory of depression: a modulatory role for monoamines, based on new findings from monoamine depletion experiments in humans. **Pharmacopsychiatry**, 29(1):2-11.

HERDEGEN T, LEAH JD (1998). Inducible and constitutive transcription factors in the mammalian nervous system: control of gene expression by Jun, fos and Krox, and CREB/ATF proteins. **Brain Research Reviews**, 28: 370-490.

HERMAN JP, CULLINAN WE, WATSON SJ (1994). Involvement of the bed nucleus of the stria terminalis in tonic regulation of paraventricular hypothalamic CRH and AVP mRNA expression. **J Neuroendocrinol**, 6, 433-442.

HERMAN JP, CULLINAN WE (1994). Neurocircuitry of stress: central control of the hypothalamo-pituitary-adrenocortical axis. **Trends neurosci**, 20, 78-84.

HERMAN JP, OSTRANDER MM, MUELLER NK, FIGUEIREDO H (2005). Limbic system mechanisms of stress regulation: hypothalamo-pituitary-adrenocortical axis. **Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry**, 29(8):1201-13.

HERRERA DG, ROBERTSON AH (1996). Activation of c-fos in the brain. **Prog Neurobiol**, 50:83-107.

HIKOSAKA O, SESACK SR, LECOURTIER L, SHEPARD PD (2008). Habenula: Crossroad between the basal ganglia and the limbic system. **J Neurosci**, 28,11825–11829.

HOFFMAN GE, LYO D (2002). Anatomical Markers of Activity in Neuroendocrine Systems: Are we all 'Fos-ed out'? **Journal of Neuroendocrinol**, 14,259–268.

HOLSBOER F (2000). The corticosteroid receptor hypothesis of depression, **Neuropsychopharmacology**, 23, 477–501.

HRDINA PD, VU TB (1993). Chronic fluoxetine treatment upregulates 5-HT uptake sites and 5-HT₂ receptors in rat brain: an autoradiographic study. **Synapse**, 14(4):324-31.

HUGHES P, LAWLOR P, DRAGUNOW M (1994). Basal expression of Fos, Fos-related, Jun and Krox 24 proteins in rat hippocampus. **Brain Research and Molecular Brain Research**, 13(4):355-7.

IGNARRO LJ, BYRNS RE, BUGA GM, WOOD KS (1987). Endothelium-derived relaxing factor from pulmonary artery and vein possesses pharmacologic and chemical properties identical to those of nitric oxide radical. **Circ Res**, 61(6):866-79.

ISHIZUKA Y, ISHIDA Y, JIN Q, KATO K, KUNITAKE T, MITSUYAMA Y, KANNAN H (2000). Differential profiles of nitric oxide and norepinephrine releases in the paraventricular nucleus region in response to mild footshock in rats. **Brain Res**, 862(1-2):17-25.

ITO R, ROBBINS TW, EVERITT BJ (2004). Differential control over cocaine-seeking behavior by nucleus accumbens core and shell. **Nat Neurosci**, 7, 389–397.

ITOI K, SUGIMOTO N (2010). The brainstem noradrenergic systems in stress, anxiety and depression. **J Neuroendocrinol**, 22(5):355-61

IWASE K, IVAMA K, AKAGI K, YANO S, et. al., (1998). Precise distribution of neuronal nitric oxide synthase mRNA in the rat brain revealed by non-radioisotopic in situ hybridization. **Brain Res Mol Brain Res**, 53(1-2):1-12.

JAY TM (2003). Dopamine: a potential substrate for synaptic plasticity and memory mechanisms. **Progr Neurobiol**, 69, 375–390.

JEFFERYS D, FUNDER J (1996). Nitric oxide modulates retention of immobility in the forced swimming test in rats. **Eur J Pharmacol**, 295,131-35.

JENTSCH JD, TAYLOR JR (1999). Impulsivity resulting from frontostriatal dysfunction in drug abuse: implications for the control of behavior by reward-related stimuli. **Psychopharmacology**, 146, 373–390.

JOCA SR, FERREIRA FR, GUIMARÃES FS (2007). Modulation of stress consequences by hippocampal monoaminergic, glutamatergic and nitrenergic neurotransmitter systems. **Stress**,10(3):887-49.

JOCA SRL, GUIMARÃES FS (2006). Inhibition of neuronal nitric oxide synthase in the rat hippocampus induces antidepressant-like effects. **Psychopharmacology**, 185(3): 298-305.

JOCA SRL, GUIMARÃES FS, DEL BEL EA (2007). Inhibition of nitric oxide synthase increases synaptophysin mRNA expression in the hippocampal formation of rats. **Neuroscience Letters**, 421, 72–76.

JOCA SR, PADOVAN CM, GUIMARÃES FS (2003). Activation of post-synaptic 5-HT(1A) receptors in the dorsal hippocampus prevents learned helplessness development. **Brain Res**, 978(1-2):177-84.

JOCA SRL, STANQUINI LL, FERREIRA FR, GUIMARÃES FS (2008). Chronic, but not acute, inhibition of NO synthesis prevents learned helplessness development in rats. In: XXVI Colegium Internacionale Neuro-psychopharmacologicum (CINP) Congress, 2008, Munique. **The International Journal of Neuropsychopharmacology**, Suppl 1:122.

JOHNSON MD & MA PM (1993). Localization of NADPH diaphorase activity in monoaminergic neurons of the rat brain. **J. Comp. Neurol**, 332, 391-406.

KALIA M (2005). Neurobiological basis of depression: an update. **Metabolism**, 54(5 Suppl 1):24-7.

KELLER MB, KRYSTAL JH, HEN R, NEUMEISTER A, SIMON NM (2005). Untangling depression and anxiety: clinical challenges. **J Clin Psychiatry**, 66(11):1477-84.

KELLER J, FLORES B, GOMEZ RG, SOLVASON HB, et.al., (2006). Cortisol circadian rhythm alterations in psychotic major depression. **Biol Psychiatry**, 60,275-281.

KENDLER KS (1990). Familial risk factors and the familial aggregation of psychiatric disorders. **Psychol Med**, 20(2):311-9.

KENDLER KS, KESSLER RC, WALTERS EE, MACLEAN C, NELAE MC, HESTH AC, EAVES LJ (1995). Stressful life events, genetic liability, and onset of an episode of major depression in women. **Am J Psych**, 152(6): 833-842.

KERMAN IA (2008). Organization of brain somatomotor-sympathetic circuits. **Exp Brain Res**, 187,1-16.

KESSLER RC, BERGLUND P, DEMLER O, et al (2003). The epidemiology of major depressive disorder: results from the National Comorbidity Survey Replication (NCS-R). **Jama**, 289, 3095-105.

KISS JP (2000). Role of nitric oxide in the regulation of monoaminergic neurotransmission. **Brain Res Bull** 52(6):459–466.

KISS JP (2008). Theory of active antidepressants: a nonsynaptic approach to the treatment of depression. **Neurochem Int**, 52, 34-9.

KISS JP, VIZI ES (2001). Nitric oxide: a novel link between synaptic and nonsynaptic transmission. **Trends Neurosci**, 24(4):211-5.

KITAYAMA IT, OTANI M, MURASE S (2008). Degeneration of the locus ceruleus noradrenergic neurons in the stress-induced depression of rats. **Ann N Y Acad Sci**, 1148:95-8.

KLEMM WR (2004). Habenular and interpeduncularis nuclei: shared components in multiple-function networks. **Med Sci Monit**, 10, 261–273.

KLERMAN GL, COLE JO (1965). Clinical Pharmacology Of Imipramine And Related Antidepressant Compounds. **Pharmacol Rev.** 17,101-41.

KOURRICH S, ROTHWELL PE, KLUG JR, THOMAS MJ (2007). Cocaine experience controls bidirectional synaptic plasticity in the nucleus accumbens. **J Neurosci**, 27, 7921–7928.

KOUTCHEROV Y, MAI JK, ASHWELL KW, PAXINOS G (2002). Organization of human hypothalamus in fetal development, **J Comp Neurol**, 446,301–324.

KOVACS KJ (1998). c-fos as transcription factor: a stressful (re)view from a functional map. **Neurochemistry International**, 33, 287-297.

KOZISEK ME, MIDDLEMAS D, BYLUND DB (2008a). Brain-derived neurotrophic factor and its receptor tropomyosin-related kinase B in the mechanism of action of antidepressant therapies. **Pharmacol Ther**, 117,30-51.

KRISHNAN V, NESTLER EJ (2010). Linking molecules to mood: new insight into the biology of depression. **AJP in Advance**, 15 (doi:10.1176/appi.ajp.2009.10030434).

KUHN R (1957). Treatment of depressive states with an iminodibenzyl derivative (G 22355). **Schweiz Med Wochenschr**, 87, 1135-40.

KUHN R. (1958). Treatment of depressive states with G 22355 (Imipramine hydrochloride). **Am J Psychiatry**, 11, 459-64.

LAPIN IP, OXENKRUG GF (1969). Intensification of the central serotonergic processes as a possible determinant of the thymoleptic effect. **Lancet**, 1,132-6.

LECOUTIER L, KELLY PH (2007). A conductor hidden in the orchestra? Role of the habenular complex in monoamine transmission and cognition. **Neurosci Biobehav Rev**, 31, 658–672.

LEDOUX J (1998). Fear and the brain: where have we been, and where are we going? **Biol Psychiatry**, 44,1229–1238.

LEDOUX J (2003). The emotional brain, fear, and the amygdala. **Cell Mol Neurobiol**, 23,727–738.

LEE BH, LEE SW, YOON D, LEE HJ, YANG JC, SHIM SH, KIM DH, RYU SH, HAN C, KIM YK (2006). Increased plasma nitric oxide metabolites in major depressive disorder. **Biol. Psychiatry**, 56, 129-134.

LEE YL, DAVIS M (1997). Role of the hippocampus, the bed nucleus of the stria terminalis, and the amygdala in the excitatory effect of corticotropin-releasing hormone on the acoustic startle reflex, **J Neurosci**, 17,6434–6446.

LI YF, ZHANG YZ, LIU YQ, WANG HL, CAO JB, GUAN TT, LUO ZP (2006). Inhibition of N-methyl-D-aspartate receptor function appears to be one of the common actions for antidepressants. **J Psychopharmacol**, 20(5):629-35.

LIM LW, TEMEL Y, VISSER-VANDEWALLE V, BLOKLAND A, STEINBUSCH H (2009). Fos immunoreactivity in the rat forebrain induced by electrical stimulation of the dorsolateral periaqueductal gray matter. **J Chem Neuroanat**, 38(2):83-96.

LINO-DE-OLIVEIRA C, SALES AJ, DEL BEL E A, SILVEIRA MCL, GUIMARÃES FS (2001). Effects of acute and chronic fluoxetine treatments on restraint stress-induced Fos expression. **Brain Res Bull**, 55,747-754.

LINO-DE-OLIVEIRA C, OLIVEIRA RMW, CAROBREZ AP, LIMA TCM, DEL BEL E A, GUIMARÃES FS. (2006). Antidepressant treatment reduces Fos-like immunoreactivity induced by swim stress in different columns of the periaqueductal gray matter. **Brain Res. Bull.** 70, 414-421.

LIU HY, JIN J, TANG JS, CUI JM (2008). Chronic fatigue stress leads to up-regulation of nitric oxide synthase in the rat nucleus accumbens. **Scand J Med Sci Sports**,18(6):715-8.

LOOMER H.P, SAUNDERS JC & KLINE NS (1957). A clinical and pharmacodynamic evaluation of iproniazid as a psychic energizer. **Psychiatr Res Rep Am Psychiatr Assoc**, 8, 129-41.

LOUGHLIN SE, FOOTE SL, GRZANNA R (1986). Efferent projections of nucleus locus coeruleus: morphologic subpopulations have different efferent targets. **Neuroscience**, 18,307–319.

LOWRY C (2002). Functional subsets of serotonergic neurones: implications for control of the hypothalamic–pituitary–adrenal axis. **J Neuroendocrinol**, 14, 911–923.

MADR GAL JL, MORO MA, LIZASOAIN I, LORENZO P, CASTRILLO A, BOSCA L, LEZA JC (2001). Inducible nitric oxide synthase expression in brain cortex after acute restraint stress is regulated by nuclear factor kappaB-mediated mechanisms. **J Neurochem**, 76(2):532-8.

MAENG S, ZARATE CA Jr (2007). The role of glutamate in mood disorders: results from the ketamine in major depression study and the presumed cellular mechanism underlying its antidepressant effects. **Curr Psychiatry Rep**, 9(6):467-74.

MALYKHIN NV, CARLER R, SERES P, COUPLAND NJ (2010). Structural changes in the hippocampus in major depressive disorder: contributions of disease and treatment. **J Psychiatry Neurosci**, 35(5):337-43.

MANCUSO C, NAVARRA P, PREZIOSI P (2010). Roles of nitric oxide, carbon monoxide, and hydrogen sulfide in the regulation of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis. **J neurochem**, 113(3):563-75.

MATSUZAWA-YANAGIDA K, NARITA M, NAKAJIMA M, KUZUMAKI N, NIIKURA K, et al (2008). Usefulness of antidepressants for improving the neuropathic pain-like state and pain-induced anxiety through actions at different brain sites. **Neuropsychopharmacology**, 33, 1952–1965.

MATTHEWS K, CHRISTMAS D, SWAN J, SORRELL E (2005). Animal models of depression: navigating through the clinical fog. **Neuroscience Biobehav**, 29: 503–513.

MAYBERG HS, LIOTTI M, BRANNAN SK, MCGINNIS S, MAHURIN RK et al (1999). Reciprocal limbic-cortical function and negative mood: converging PET findings in depression and normal sadness. **Am J Psychiatry**, 156(5):675-82.

MAYBERG HS, BRANNAN SK, TEKELL JL, SILVA JA et. al., (2000). Regional metabolic effects of fluoxetine in major depression: serial changes and relationship to clinical response. **Biol Psychiatry**, 48(8):830-43.

McARTHUR R, BORSINI F (2006). Animal models of depression in drug discovery: A historical perspective. **Pharmacol Biochem Behav**, 84: 436–452.

McDEVITT RA, SZOT P, BARATTA MV, BLAND ST, WHITE SS, MAIER SF, NEUMAIER JF (2009). Stress-induced activity in the locus coeruleus is not sensitive to stressor controllability. **Brain Res**, 1285:109-18.

McDONALD A (1983). Neurons of the bed nucleus of the stria terminalis: a golgi study in the rat, **Brain Res Bull**,10,111–120.

McEWEN BS (2000). Allostasis and allostatic load: implications for neuropsychopharmacology. **Neuropsychopharmacology**, 22,108–124.

McEWEN BS (2004). Protection and damage from acute and chronic stress: allostasis and allostatic overload and relevance to the pathophysiology of psychiatric disorders. **Ann N Y Acad Sci**, 1032:1-7.

MELIA KR, RYABININ AE, SCHROEDE R, BLOOM FE, WILSON MC (1994). Induction and habituation of immediate early gene expression in rat brain by acute and repeated restraint stress. **J Neurosci**, 14, 5929-5938.

MELONI EG, GERETY LP, COHEN BM, CARLEZON WA (2006). Anxiety-like effects of corticotropin-releasing factor (CRF) are reduced by 6-hydroxydopamine lesions of the bed nucleus of the stria terminalis (BNST). **Neuropsychopharmacology**, 31, S109.

MONGEAU R, BLIER P, DeMONTIGNY C (1997). The serotonergic and noradrenergic systems of the hippocampus: their interactions and the effects of antidepressant treatments. **Brain Res Ver**, 23,145–195.

MOORE RY, HALARIS AE, JONES BE (1978). Serotonin neurons of the midbrain raphe: ascending projections. **J Comp Neurol**, 180, 417–438.

MORGAN JI, CURRAN T (1991). Proto-oncogene transcription factors and epilepsy. **Trends Pharmacol Sci**, 12(9):343-9.

MORILAK DA, BARRERA G, ECHEVARRIA DJ, GARCIA AS, HERNANDEZ A, MASS, PETRE CO (2005). Role of brain norepinephrine in the behavioral response to stress. **Progress in Neuro-Psychopharmacology & Biological Psychiatry**, 29, 1214 – 1224.

MUIGG P, HOELZL U, PALFRADER K, NEUMANN I, WIGGER A, et al (2007). Altered brain activation pattern associated with drug-induced attenuation of enhanced depression-like behavior in rats bred for high anxiety. **Biol Psychiatry**, 61,782–796.

NAKANE M, ICHIKAWA M, DEGUCHI T (1983). Light and electron microscopic demonstration of guanylate cyclase in rat brain. **Brain Res**, 273(1):9-15.

NAYLOR GJ, SMITH AH, CONNELLY P (1987). A controlled trial of methylene blue in severe depressive illness. **Biol Psychiatry**, 22(5):657-9.

NESTLER EJ, BARROT M, DILEONE RJ, EISCH AJ, GOLD SJ, MONTEGGIA LM (2002). Neurobiology of depression. **Neuron**. 34,13–25.

NOBLER MS, SACKEIM HA, PROHOVNIK I, MOELLER JR, et al (1994). Regional cerebral blood flow in mood disorders, III. Treatment and clinical response. **Arch Gen Psychiatry**, 51(11):884-97.

NUTT D (2002). The neuropharmacology of serotonin and noradrenaline in depression. **Int Clin Psychopharmacol**, 17,1–12.

OLIVEIRA RM, GUIMARÃES FS, DEAKIN JF (2008). Expression of neuronal nitric oxide synthase in the hippocampal formation in affective disorders. **Braz J Med Biol Res**, 41(4):333-41.

ONAKA T & YAGI K (1998). Role of noradrenergic projections to the bed nucleus of the stria terminalis in neuroendocrine and behavioral responses to fear-related stimuli in rats. **Brain Res**, 788,287–293.

OTAKE K, KIN K, NAKAMURA Y (2002). Fos expression in afferents to the rat midline thalamus following immobilization stress. **Neurosci Res**, 43, 269–282.

PACÁK K, PALKOVITS M (2001). Stressor specificity of central neuroendocrine responses: implications for stress-related disorders. **Endocr Rev**, 22(4):502-48.

Paxinos G, Watson C (1997). The rat brain in stereotaxic coordinates. New York: Academic Press.

PADOVAN CM & GUIMARÃES FS (2004). Antidepressant-like effects of NMDA-receptor antagonist injected into the dorsal hippocampus of rats. **Pharmacol Biochem Behav**, 77(1):15-9.

PETRIE RX, REID IC, STEWART CA (2000). The N-methyl-D-aspartate receptor, synaptic plasticity, and depressive disorder. **A critical review Pharmacol**, 87(1):11-25.

PINDER R (2001). On the feasibility of designing new antidepressants. **Hum Psychopharmacol Clin Exp**, 16,53-9.

PITTENGER C, DUMAN RS (2008). Stress, depression, and neuroplasticity: a convergence of mechanisms. **Neuropsychopharmacology**, 33(1):88-109.

PIZZAGALLI DA, HOLMES AJ, DILLON DG et. al., (2009). Reduced caudate and nucleus accumbens response to rewards in unmedicated individuals with major depressive disorder. **Am J Psychiatry**, 166 (6):702-10.

PORSOLT RD, PICHEN MLE, JAFRE M (1977). Depression : a new animal model sensitive to antidepressant treatments. **Nature**, 266,730-732.

PORSOLT RD, BERTIN N, BLAVET N, DENIEL M, JAFRE M (1979). Immobility induced by forced swimming in rats : effects of agents which modify central catecholamine and serotonin activity. **European Journal of Pharmacology**, 57,201-210.

PRICE JL, DREVETS WC (2010). Neurocircuitry of mood disorders. **Neuropsychopharmacology**, 35(1):192-216.

RÉNÉRIC JP, LUCKI I (1998). Antidepressant behavioral effects by dual inhibition of monoamine reuptake in the rat forced swimming test. **Psychopharmacology (Berl)**, 136(2):190-7.

RIVIER C (2001). Role of gaseous neurotransmitters in the hypothalamic-pituitary-adrenal axis. **Ann N Y Acad Sci**, 933,254-64.

RISOLD PY & SWANSON LW (1997). Connections of the rat lateral septal complex, *Brain Res.-Brain Res. Rev.* 24, 115– 195.

RODRIGO J, SPRINGALL DR, UTTENTHAL O, BENTURA ML, ABADIA-MOLINA F, RIVEROS-MORENO V, MARTINEZ-MURILLO R, POLAK JM, MONCADA S (1994). Localization of nitric oxide synthase in the adult rat brain. **Philos. Trans. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci.**, 345, 175-221.

ROSENKRANZ JA, VENHEIM ER, PADIVAL M (2010). Chronic stress causes amygdale hyperexcitability in rodents. **Biol Psychiatry**, 67(12):1117-9.

SALCHNER P, LUBEC G, ENGELMANN M, ORLANDO GF, WOLF G, SARTORI SB, HOEGER H, SINGEWALD N (2004). Genetic functional inactivation of neuronal nitric oxide synthase affects stress-related Fos expression in specific brain regions. **CMLS Cell Mol Life Sci**, 61,1498–1506.

SALM AK, PAVELKO M, KROUSE EM, WEBSTER W, KRASZPULSKI M, BIRKLE DL (2004). Lateral amygdaloid nucleus expansion in adult rats is associated with exposure to prenatal stress. **Brain Res Dev Brain Res.** 148(2):159–67.

SANDNER G, Di SCALA G, ROCHA B, ANGST MJ (1992). C-fos immunoreactivity in the brain following unilateral electrical stimulation of the dorsal periaqueductal gray in freely moving rats. **Brain Res**, 573(2): 276-83.

SANDNER G, OBERLING P, SILVEIRA MC (1993). What brain structures are active during emotions? Effects of brain stimulation elicited aversion on c-fos immunoreactivity and behavior. **Behavioral Brain Research**, 58(1-2): 9-18.

SAPOLSKY RM (2000). Glucocorticoids and hippocampal atrophy in neuropsychiatric disorders. **Arch Gen Psych**, 57,925–935.

SARTORIUS N (2001). Concepts of depression: sporadic revolutions of continuous evolution. **Hum Psychopharmacol Clin Exp**, 16:S3-6.

SARTORIUS A & HENN FA (2007). Deep brain stimulation of the lateral habenula in treatment resistant major depression. **Med Hypotheses**, 69,1305–1308.

SAWCHENKO PE, SWANSON LW (1983). The organization of forebrain afferents to the paraventricular and supraoptic nuclei of the rat. **J Comp Neurol**, 218(2):121-44.

SCHILDKRAUT JJ (1965). The catecholamine hypothesis of affective disorders: a review of supporting evidence. **Am J Psychiatry**, 122, 509-22.

SCHILDKRAUT JJ, KETY SS. (1967). Biogenic amines and emotion. **Science**, 156,21-37.

SCHULZ D, CANBEYLI RS (1999). Freezing behavior in BNST-lesioned Wistar rats. **Ann NY Acad Sci**, 877,728–731.

SCOPINHO AA, SCOPINHO M, LISBOA SF, CORREA FMA, GUIMARÃES FS, JOCA SRL (2010). Acute reversible inactivation of the ventral medial prefrontal cortex induces antidepressant-like effects in rats. **Behavioural Brain Research**, 214, 437–442

SELIKOFF IJ, ROBITZEK EH (1952). Tuberculosis chemotherapy with hydrazine derivatives of isonicotinic acid. **Dis Chest**, 21, 385-438.

SENBA E, MATSUNAGA K, TOHYAMA M, NOGUCHI K (1993). Stress-induced expression in the rat brain: activation mechanism of sympathetic pathway. **Brain Res Bull**, 31, 329-344.

SENBA E, UEYAMA E (1997). Stress-induced expression of immediate early genes

in the brain and peripheral organs of the rat. **Neuroscience Research**, 29:183-207.

SHEEHAN TP, CHAMBERS RA, RUSSELL DS (2004). Regulation of affect by the lateral septum: implications for neuropsychiatry. **Brain Res Brain Res Rev** 46, 71–117.

SHELIN YI (2000). 3D MRI studies of neuroanatomic changes in unipolar major depression: the role of stress and medical comorbidity. **Biol Psychiatry**, 48(8):791-800.

SHELTON CI (2004). Diagnosis and management of anxiety disorders. **J Am Osteopath Assoc**, 104(3 Suppl 1):S2–5.

SHIRAYAMA Y & CHAKI S (2006). Neurochemistry of the nucleus accumbens and its relevance to depression and antidepressant action in rodents. **Current Neuropharmacology**, 4, 277-291.

SHOJI H, MIZOGUCHI K (2010). Acute and repeated stress differentially regulates behavioral, endocrine, neural parameters relevant to emotional and stress response in young and aged rats. **Behav Brain Res**, 211(2):169-77.

SMITH MA, BRADY LS, GLOWA J, GOLD PW, HERKENHAM M (1991). Effects of stress and adrenalectomy on tyrosine hydroxylase mRNA levels in the locus ceruleus by in situ hybridization. **Brain Res**, 544, 26-32.

SNYDER SH, FERRIS CD (2000). Novel neurotransmitters and their neuropsychiatric relevance. **Am J Psychiatry**, 157(11):1738-51.

SOUTHWICK SM, VYTHILINGAM M, CHARNEY DS (2005). The psychobiology of depression and resilience to stress: implications for prevention and treatment. **Annu Rev Clin Psychol**, 1,255-91.

SPENCER SJ, FOX JC, DAY TA (2004). Thalamic paraventricular nucleus lesions facilitate central amygdala neuronal response to acute psychological stress. **Brain Res**, 997,234–237.

SPIACCI A Jr, KANAMARU F, GUIMARÃES FS, OLIVEIRA RM (1994). Nitric oxide-mediated anxiolytic-like and antidepressant-like effects in animal models of anxiety and depression. **Pharmacol. Biochem. Behav.**, 88, 247-255.

STONE EA, LEHMANN ML, LIN Y, QUARTERMAIN D (2007). Reduce evoked fos expression in activity-related brain regions in animal models behavioral depression. **Progress in neuro-Psychopharmacology & Biological Psychiatry**, 31,1196-1207.

STONE EA, LIN Y, SARFRAZ Y, QUARTERMAIN D (2010). Antidepressant-like action of intracerebral 6-fluoronorepinephrine, a selective full alpha-adrenoceptor agonist. **Int J Neuropsychopharmacol**, 12, 1-13.

SULLIVAN GM, APERGIS J, BUSH DE, JOHNSON LR, HOU M, LEDOUX JE (2004b). Lesions in the bed nucleus of the stria terminalis disrupt corticosterone and freezing responses elicited by a contextual but not by a specific cue-conditioned fear stimulus, **Neuroscience**, 128,7–14.

SULZER F, BICKEL MH & BRODIE BB (1964). The action of desmethylimipramine in counteracting sedation and cholinergic effects of reserpine-like drugs. **J Pharmacol Exp Therap**, 144.

SUTHERLAND RJ (1982). The dorsal diencephalic conduction system: a review of the anatomy and functions of the habenular complex. **Neurosci Biobehav Rev**, 6,1–13.

SUZUKI E, YAGI G, NAKAKI T, KANBA S, ASAI M (2001). Elevated plasma nitrate levels in depressive states. **J Affect Disord**, 63(1-3):221-4.

SWASON LW (1982). The projections of the ventral tegmental area and adjacent regions: a combined fluorescent retrograde tracer and Immunofluorescence study in the rat. **Brain Res Bull**, 9,321–353.

TANAKA M, IKEDA T, HAVASHI S, IIJIMA N, AMAYA F, HISA Y, IBATA Y (1997). Nitroergic neurons in the medial amygdala project to the hypothalamic paraventricular nucleus of the rat. **Brain Res**, 777(1-2):13-21.

THORNTON EW, EVANS JA, HARRIS C (1985). Attenuated response to nomifensine in rats during a swim test following lesion of the habenula complex. **Psychopharmacology (Berl.)**, 87,81–85.

TSIGOS C, CHROUSOS GP (2002). Hypothalamic-pituitary-adrenal axis, neuroendocrine factors and stress. **J Psychosom Res**, 53(4):865-71.

TULLY K & BOLSHAKOV VY (2010). Emotional enhancement of memory: how norepinephrine enables synaptic plasticity. **Molecular Brain**, 3:15.

ULAK G, MUTLU O, AKAR FY, KOMSUOGLU FI, TANYERI P, ERDEN BF (2008). Neuronal NOS inhibitor 1-(2-trifluoromethylphenyl)-imidazole augment the effects of antidepressants acting via serotonergic system in the forced swimming test in rats. **Pharmacol Biochem Behav**, in press .

URANI A, CHOURBAJI, GASS P (2005). Mutant mouse models of depression: candidate genes and current mouse lines. **Neurosci Biobehav Rev**, 29,805-28.

VELARDEZ MO, POLIANDRI AH, CABILLA JP, BODO CC, MACHIAVELLI LI, DUVILANSKI BH (2004). Long-term treatment of anterior pituitary cells with nitric oxide induces programmed cell death. **Endocrinology**, 145(4):2064-70.

VERTES RP (1991). A PHA-L analysis of ascending projections of the dorsal raphe nucleus in the rat, **J Comp Neurol**, 313,643–668.

VERTES RP (2006). Interactions among the medial prefrontal cortex, hippocampus and midline thalamus in emotional and cognitive processing in the rat. **Neuroscience**, 142,1-20.

VINCENT SR, KIMURA H (1992). Histochemical mapping of nitric oxide synthase in the rat brain. **Neuroscience**. 46(4):755-84.

VINKERS CH, BIJLSMA EY, HOUTEPEN LC, WESTPHAL KG, VEENING JG, GROENINK L, OLIVIER B (2009). Medial amygdala lesions differentially influence stress responsivity and sensorimotor gating in rats. **Physiol Behav**, 1-7.

WANG QP, NAKAI Y (1994). Dorsal raphe: An important nucleus in the pain modulation. **Brain Res Bull**, 34, 575-585.

WEGENER G & VOLKE V (2010). Nitric oxide synthase inhibitors as antidepressants. **Pharmaceuticals**, 3, 273-299.

WILLNER P (1985). Depression: A psychobiological synthesis. John Wiley & Sons, new york.

WILLNER P, MUSCAT R, PAPP M (1992). Chronic mild stress-induced anhedonia: a realistic animal model of depression. **Neurosci Biobehav Rev**, 16, 525–534.

YADID G, OVERSTREET DH, ZANGEN A (2001) . Limbic dopaminergic adaptation to a stressful stimulus in a rat model of depression. **Brain Res**, 896, 43–47.

YILDIZ F, ERDEN BF, ULAK G, UTKAN T, GACAR N (2000). Antidepressant-like effect of 7-nitroindazole in the forced swimming test in rats. **Psychopharmacology**, 149:41-44.

ZHOU QG, HU Y, HUA Y, HU M, LUO CX, HAN X, ZHU XJ, WANG B, XU JS, ZHU DY (2007). Neuronal nitric oxide synthase contributes to chronic stress-induced depression by suppressing hippocampal neurogenesis. **J Neurochem**, 103(5):1843-54.

Livros Grátis

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

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

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

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

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