

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO  
FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM SAÚDE MENTAL

**O papel de processos autofágicos nos efeitos comportamentais  
desencadeados pelo tratamento com canabinóides em animais cronicamente  
estressados.**

EDUARDO JUNJI FUSSE

RIBEIRÃO PRETO  
2019

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO  
FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM SAÚDE MENTAL

EDUARDO JUNJI FUSSE

**O papel de processos autofágicos nos efeitos comportamentais desencadeados pelo tratamento com canabinóides em animais cronicamente estressados.**

Dissertação apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo para obtenção do grau de Mestre em Ciências Biológicas. Área de concentração: Saúde Mental

**Orientadora:** Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Alline Cristina de Campos.

RIBEIRÃO PRETO  
2019

Autorizo a reprodução e divulgação total ou parcial deste trabalho, por qualquer meio convencional ou eletrônico, para fins de estudo e pesquisa, desde que citada a fonte.

Fusse, Eduardo Junji

O papel de processos autofágicos nos efeitos comportamentais desencadeados pelo tratamento com canabinóides em animais cronicamente estressados.. Ribeirão Preto, 2019.

P .: il. ; 30 cm

Dissertação de Mestrado, apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto/USP. Área de concentração: Saúde Mental.

Orientador: Campos, Alline Cristina de.

Estresse. Canabinoides. Ansiedade. Modelos animais. Autofagia. Via Akt/mTOR.

## FOLHA DE APROVAÇÃO

**Nome: FUSSE, Eduardo Junji**

**Título: O papel de processos autofágicos nos efeitos comportamentais desencadeados pelo tratamento com canabinóides em animais cronicamente estressados.**

Dissertação apresentada a Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo para obtenção do grau de Mestre em Ciências. Área de concentração: Saúde Mental

Aprovado em: \_\_\_/\_\_\_/2019

Banca examinadora

Profª. Drª. Alline Cristina de Campos:

FMRP/USP

Julgamento: \_\_\_\_\_

Assinatura: \_\_\_\_\_

Membro 1: \_\_\_\_\_

Instituição: \_\_\_\_\_

Julgamento: \_\_\_\_\_

Assinatura: \_\_\_\_\_

Membro 2: \_\_\_\_\_

Instituição: \_\_\_\_\_

Julgamento: \_\_\_\_\_

Assinatura: \_\_\_\_\_

Membro 3: \_\_\_\_\_

Instituição: \_\_\_\_\_

Julgamento: \_\_\_\_\_

Assinatura: \_\_\_\_\_

*Dedico este trabalho a meus pais, Jun e Sandra, que em todo momento da minha jornada de vida não mediram esforços para que eu pudesse caminhar, sempre me apoiando com todo seu amor, carinho e dedicação.*

*Aos meus padrinhos, Luiz e Marly, por todo seu suporte, carinho e amor.*

*Aos meus avós, Yukio e Kinoe (In memorian), Masaka (In memorian) e Fumie, que sonharam e fundaram suas raízes nessa maravilhosa terra longínqua.*

## **AGRADECIMENTOS**

Agradeço, primeiramente, a Deus e todos que me acompanham, por sempre me iluminarem e darem forças para continuar seguindo em frente apesar das circunstâncias.

A minha orientadora Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Alline Cristina de Campos, por sua orientação, competência, paciência e dedicação. “Ensinar não é transferir conhecimento, mas criar possibilidades para a sua própria produção ou construção” (Freire, P.). Obrigado por sempre nos inspirar a ser “arquitetos do nosso cérebro”. Agradeço não só pelo ensino acadêmico/profissional, mas também pelo ensino de vida que aprendi nesta etapa. Te admiro muito e acredito muito no seu trabalho como orientadora, pesquisadora e cientista, você traz uma centelha muito inspiradora para o cenário científico brasileiro. Obrigado por sua paciência e por não desistir de um aluno desvairado que esteve sob sua orientação. Muito obrigado por todo ensinamento. Mais que uma orientadora, você é uma grande mestra para todos que passam por sua tutoria.

A pós doutoranda Dr<sup>a</sup>. Maria Adriele Vicente, pelo seu carinho, apoio e incentivo. Obrigado por sua contribuição acadêmica e por me ajudar em diversas etapas que necessitei. Sem você nada disso seria possível.

A todos meus colegas de trabalho, membros do corpo técnico e pessoas que passaram pelo Laboratório de Farmacologia da Neuroplasticidade da FMRP: Franciele, Rafael, Paula, Mariana, Melissa, Davi, Gabriel, Karla, Jordan, Vinícius, Thamyris, Maria Adriele, Érika, Fernanda, Murilo, Giuliana, Graziele, Cláudia, Flávia,

Wilson e Marcela. Muito obrigado pelo convívio diário e aprendizado com cada um, que foi muito edificante para concluir esta etapa.

Ao Prof. Dr. Francisco Silveira Guimarães e todos os membros de seu laboratório. Obrigado por gentilmente nos ceder um espaço no seu laboratório quando precisamos. Obrigado por suas aulas maravilhosas que juntam arte para explicar ciência. Obrigado por todo seu suporte.

A doutoranda Franciele Franco Scarante, por sua competência, por toda sua ajuda técnica e intelectual e por sua amizade e companheirismo. Obrigado por sempre estar presente, seja na bancada ajudando com os experimentos e estatísticas, ou em uma mesa conversando e tomando café/cerveja. Obrigado por trazer sua luz (mesmo que você não acredite) em mundo tão carente de tal. É admirável e inspirador ver uma pessoa tão dedicada e amorosa em tudo que faz. Acredite sempre nessa pessoa maravilhosa que você é.

Ao doutorando Rafael Pazinatto Aguiar, por sua amizade, pelas ótimas conversas e por sempre trazer um sorriso para nós. Obrigado por toda sua ajuda, seja ela científica, espiritual ou filosófica. Obrigado por ser essa pessoa maravilhosa que traz luz pros lugares mais escuros (e quando é mais necessário). Obrigado por nossas ricas conversas e devaneios. Te carrego guardado a sete chaves, irmão. Muita gratidão e luz a você.

A mestrandona Melissa Ribeiro de Araújo, por seu conhecimento e senso crítico, e por sua amizade e companheirismo. Obrigado por nos trazer insights valiosos sobre os modelos que usamos. Obrigado por me acolher em um lar quando eu mais precisei.

Obrigado por nossas conversas e desabafos no caminho de casa. Não vamos esquecer de comer abacate porque faz bem.

A aluna de Iniciação Científica Mariana Mattos Marrubia, por sua competência e sua contribuição para que este trabalho fosse possível. Obrigado por sua ajuda e trabalho em toda essa etapa. Você é uma pessoa incrível, conquiste esse mundo, pois ele é seu.

A doutoranda Flávia Corrêa Turcato, por sua contribuição para este trabalho e pelos ensinamentos quando entrei no laboratório. Obrigado por tudo. Concordamos que Breaking Bad é o melhor seriado de todos os tempos.

Ao doutorando Gabriel Gripp Fernandes, por sempre estar disposto a compartilhar seus conhecimentos (científicos ou de trivias da Marvel), por sua amizade e bom humor (mesmo aturando meu humor azedo). Obrigado pelas risadas e nossas conversas nerds/geeks. Obrigado por me apoiar nessa fase tão importante.

Aos alunos de Iniciação Científica Davi Silveira Scomparim e Paula Carolina Duarte de Souza. Davi por sua competência técnica e ajuda nos Western Blots. Paula pelas nossas conversas e pelos seus ensinamentos valiosos sobre a vida.

Aos meus pais, Jun Fusse e Sandra Morise Fusse, que me trouxeram a esse mundo e sempre me cuidaram com muito carinho e amor. Obrigado por todo apoio e incentivo, sem vocês não disso seria possível. Obrigado, pai, por ser esse homem tão sábio que sempre acreditou e me incentivou na procura de ser quem eu sou de verdade. Obrigado, minha mãe, por ser essa mulher forte e batalhadora, que sempre zelou por mim e me ensinou todos os valores que carrego comigo.

A Marina Rodrigues Parizi, por sua amizade, companheirismo e por ser essa pessoa maravilhosa que me deu suporte nos momentos que mais precisei. Obrigado por toda nossa caminhada juntos. Obrigado por tudo que aprendi com você ao longo desses anos. Você é uma pessoa de muita luz que traz muita felicidade para este mundo.

Aos meus grandes amigos, a família que a vida me deu, por todo companheirismo e suporte. Aos membros da minha banda, por todos os bons momentos que passamos juntos. Sem vocês eu já teria enlouquecido nesse mundo. Obrigado por todos as boas risadas, conversas e momentos: Job, André, Thiago, King, Ana Carolina, Len, Malu, Obama, Martin, Padero e Caetano. Em especial, agradeço ao Job. Obrigado pelos 16 anos de amizade. Obrigado por nunca desistir de nossa amizade e por todo companheirismo e jogos de RPG. Agradeço também ao André, por nossas ricas conversas filosóficas pela madrugada, que me ajudaram muito a seguir em frente.

A Erika Ribeiro de Araujo, por nossas conversas e por me fornecer o necessário para não desistir em todo processo de luta pela vida.

Ao dirigente espiritual Reinaldo de Oliveira e todos os membros do CAE Filhos de Aruanda, por todos os ensinamentos e por me receberem de braços abertos quando mais precisei.

A todos os professores da Faculdade de Ciências Farmacêuticas por todas as aulas ao longo da minha graduação, que formaram a base para que eu pudesse buscar mais conhecimento. Sem vocês eu não estaria onde estou. Em especial, agradeço ao Prof. Dr. Marcelo Dias Baruffi, por suas aulas incríveis e por me contagiar com o amor que você tem pela ciência. Sou muito grato a você, professor Baruffi.

A todo corpo do Programa de Saúde Mental da FMRP e do Departamento de Farmacologia da FMRP. Em especial a Ivana Geraldo Faria Cintra e a Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Flávia de Lima Osório.

A todos os funcionários da Universidade de São Paulo de Ribeirão Preto, que são os responsáveis para que tudo funcione em nossa universidade. Em especial aos funcionários do restaurante universitário que me alimentaram durante esse tempo que permaneci no campus. Muito obrigado.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), a Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), a Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) e ao Prêmio L’Oreal-UNESCO-ABC pelo apoio financeiro.

*"At the center of your being you  
have the answer; you know who  
you are and you know what you  
want"*

*Lao Tzu*

## LISTA DE ABREVIATURAS

SAG: Síndrome da Adaptação Geral

HPA: eixo-Hipotálamo-Hipófise-Adrenal

SI: Sistema Imune

CRF: hormônio liberador de corticotropina

ACTH: hormônio adrenocorticotrófico

GR: receptores glicocorticoides

MR: receptores mineralocorticoides

GD: giro denteadoo

MDD: transtorno de depressão maior

AD: transtorno de ansiedade

AD's: doença de Alzheimer

PD: doença de Parkinson

THC: Δ9-tetrahidrocanabinol

CB<sub>1</sub>: receptor de canabinóide do tipo 1

eCB: endocanabinoides

AEA: araquidonoil etanolamida ou anandamida

2-AG: 2-araquidonoilglicerol

FAAH: amido hidrolase de ácido graxo

MAGL: monoacilglicerol lipase

SNC: Sistema Nervoso Central

mTOR: *mechanistic target of rapamycin*

CUS: estresse crônico imprevisível (do inglês *chronic unpredictable stress*)

SDS: estresse crônico por derrota social

SPT: Teste da Preferência pela Sacarose (do inglês *sucrose preference test*)

NSF: Teste da Supressão da Alimentação pela Novidade (do inglês *novelty suppressed feeding*),

BDNF: Fator Neurotrófico Derivado do Cérebro

FST: Teste do Nado Forçado

PI3K: fosfatidilinositol 3-quinase

EROs: espécies reativas de oxigênio

LCE:Teste do Labirinto em Cruz Elevado

DCX: doublecortina

LTP: *Long Term Potentiation*

## RESUMO

**Fusse, E.J. O papel de processos autofágicos nos efeitos comportamentais desencadeados pelo tratamento com canabinóides em animais cronicamente estressados.** 2019. Dissertação (Mestrado). Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2019.

Diante de uma situação estressante, o cérebro orquestra e ativa sistemas de adaptação com a finalidade de reagir ao estresse e promover a homeostasia. Entretanto, quando o estímulo é persistente ou existe uma incapacidade de desativar os sistemas de adaptação, danos e mudanças neuroplásticas podem ocorrer. Estas alterações podem vir a favorecer o surgimento de transtornos psiquiátricos como depressão e transtornos de ansiedade. Os antidepressivos são a primeira linha de tratamento para depressão e ansiedade. Porém, os antidepressivos apresentam entre inúmeros efeitos adversos e uma latência de três a quatro semanas para sua ação terapêutica. Os sistema endocanabinóide tem se demonstrado como candidato para a terapêutica de transtornos de ansiedade e depressão, visto que estudos em modelos animais e pacientes humanos demonstram que a modulação desse sistema tem efeitos antidepressivos e ansiolíticos. O mecanismo de ação para seus efeitos podem ser devidos a ativação de receptores CB1, por ação direta ou mobilização de agonistas endógenos, os endocanabinóides, ou pela facilitação da sinalização mediada por receptores serotoninérgicos do tipo 5-HT1A. Entretanto, existem outras vias de sinalização que estão sendo investigadas por quais o sistema endocanabinóide possa permear suas ações, como, por exemplo, a via de sinalização de mTOR. A via de mTOR culmina em síntese proteica e proliferação e crescimento celular, sendo importante para manutenção e desenvolvimento de neurônios. A via de mTOR também controla outras vias secundárias de grande importância como a autofagia. A autofagia é um processo catabólico celular de caráter evolutivo que participa na manutenção e homeostasia celular. Este processo é fundamental na fisiologia basal dos neurônios. Quando coibida, ocorre um acúmulo de proteínas e organelas defeituosas que prejudica o funcionamento neuronal e leva a uma consequente morte celular. Nos últimos anos os estudos com canabinóides têm se intensificado visto suas inúmeras terapêuticas. Trabalhos demonstraram que canabinóides e endocanabinóides atuam como agentes antineoplásicos através da via da autofagia e que esses canabinóides e endocanabinóides aumentam precursores autofágicos. Portanto, este trabalho tem como objetivo o estudo da participação da autofagia nos processos comportamentais que são desencadeados pelo tratamento com canabinóides.

**Palavras-chave:**Estresse; canabinóides; URB597; mTOR; autofagia

## ABSTRACT

Fusse, E.J. **Possible role for autophagy in the anti-stress effects of cannabinoids in mice.** Dissertation (Master). Ribeirão Preto Medical School– University of São Paulo, Ribeirão Preto, 2019.

Under stress, the brain orchestrates and activates adaptive systems in order to properly respond to stress and promote homeostasis. Notwithstanding, a persistent stress stimulus or an incapacity to turn off the adaptive responses could promote damage and neuroplastic changes. These alterations could precipitate the emergence of psychiatric disorders such as major depression or anxiety disorders. Antidepressants are indicated as first-line treatment for most of these stress-related psychiatric disorders. However, there are some limitations associated with antidepressant therapy, including the generation of severe adverse side effects and a late onset to promote its therapeutic actions. The endocannabinoid system appears as a potentially promising target for the treatment of stress-related psychiatric disorders. Pre-clinical and clinical studies have shown that the modulation of the endocannabinoid signalling might induce antidepressant- and anxiolytic-like effects. The mechanism related to these effects might involve the facilitation of the signaling pathway mediated by serotonergic 5-HT1A receptors or the activation of CB<sub>1</sub> receptors, either by direct activation or indirectly, through the mobilization of the endogenous ligands, the endocannabinoids. Nevertheless, there are other signaling pathways that are being investigated through which the endocannabinoid system can act. One of these pathways is the mTOR signalling pathway. This pathway culminates in protein synthesis and cellular proliferation and growth and it plays an important role for the maintenance and development of neurons. The mTOR pathway also controls other major cellular processes such as autophagy. Autophagy is an evolutionary cellular catabolic process that participates in cell homeostasis and maintenance. This process is fundamental in the basal physiology of neurons. When curbed, an accumulation of defective proteins and organelles occurs that impairs neuronal functioning and leads to a consequent cell death. In recent years, studies with cannabinoids have intensified in view of the broad therapeutic potential of these substances. Studies have shown that cannabinoids and endocannabinoids act as anti neoplastic agents through the autophagy pathway and that these cannabinoids and endocannabinoids increase autophagic precursors. Therefore, this study aims to study the participation of autophagy in the behavioral processes that are triggered by the treatment with cannabinoids in a social defeat stress model.

**Key-words:** Stress; cannabinoids; URB597; mTOR; autophagy

# SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO .....</b>	17
1.1 ESTRESSE E TRANSTORNOS PSIQUIÁTRICOS .....	17
1.2 TRANSTORNOS PSIQUIÁTRICOS E O SISTEMA ENDOCANABINOIDE .....	20
1.3 TRANSTORNOS PSIQUIÁTRICOS E VIAS INTRACELULARES .....	24
1.4 VIA PI3K/AKT/mTOR .....	26
1.5 CONTEXTUALIZAÇÃO E HIPÓTESE .....	30
<b>2 OBJETIVOS .....</b>	31
2.1 OBJETIVO GERAL .....	31
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	31
<b>3 MATERIAIS E MÉTODOS .....</b>	32
3.1 ANIMAIS .....	32
3.2 DROGAS E TRATAMENTO .....	32
3.3 MODELO DE ESTRESSE CRÔNICO: ESTRESSE POR DERROTA SOCIAL (SDS) .....	33
3.4 SUPRESSÃO DA ALIMENTAÇÃO PELA NOVIDADE (NSF) .....	34
3.5 TESTE DO NADO FORÇADO (TNF) .....	34
3.6 PROCEDIMENTOS EXPERIMENTAIS .....	35
3.6.1 Experimento I .....	35
3.6.2 Experimento II .....	35
3.6.3 Experimento III .....	35
3.6.4 Experimento IV .....	36
3.7 ANÁLISE DE EXPRESSÃO PROTEICA POR WESTERN BLOT .....	36
3.8 DETERMINAÇÃO DE CÉLULAS DOUBLECORTIN (DCX) POSITIVAS NO GIRO DENTEADO DO HIPOCAMPO .....	38
3.9 ANÁLISE ESTATÍSTICA .....	39
<b>4 RESULTADOS .....</b>	40
4.1 O TRATAMENTO COM URB597 INDUZ EFEITOS COMPORTAMENTAIS NO NSF, MAS NÃO NO NADO FORÇADO, DE MANEIRA DOSE DEPENDENTE E DEPENDENDO DE EXPERIÊNCIA PRÉVIA AO SDS .....	40
4.2 OS EFEITOS COMPORTAMENTAIS DO URB597 EM ANIMAIS ESTRESSADOS SÃO ATENUADOS PELO TRATAMENTO PRÉVIO COM A RAPAMICINA .....	42
4.3 O PAPEL DO RECEPTOR CB <sub>1</sub> NOS EFEITOS COMPORTAMENTAIS DO URB597 NÃO FOI ELUCIDADO EM ANIMAIS QUE FORAM SUBMETIDOS A MUDANÇA NA QUALIDADE DA RAÇÃO NOS BIOTÉRIOS DO CAMPUS DA USP RIBEIRÃO PRETO .....	43

4.4	O URB597 PROMOVE O AUMENTO NO NÚMERO ABSOLUTO E DE MIGRATÓRIAS DE NEURÔNIOS IMATUROS DOUBLECORTIN POSITIVOS NO GIRO DENTEADO DO HIPOCAMPO .....	44
4.5	O SDS E O TRATAMENTO COM URB597 INDUZEM MODIFICAÇÕES NA VIA AKT/mTOR E NA EXPRESSÃO DO FLUXO AUTOFÁGICO .....	45
<b>5</b>	<b>DISCUSSÃO</b> .....	<b>48</b>
<b>6</b>	<b>CONCLUSÃO</b> .....	<b>56</b>
<b>7</b>	<b>REFERÊNCIAS</b> .....	<b>57</b>

# **1 INTRODUÇÃO**

## **1.1 ESTRESSE E TRANSTORNOS PSIQUIÁTRICOS**

O estresse pode ser definido como todo e qualquer estímulo, seja ele de ordem física ou psicológica, que provoca um desafio a homeostasia e que é necessária uma adaptação para que esta seja retomada (MCEWEN, 2012). Homeostasia é um termo cunhado por Walter Cannon em 1929 para descrever o equilíbrio ideal de vários fatores fisiológicos que o organismo mantém para seu funcionamento adequado. Cannon baseou-se no “milieu intérieur” (ambiente interno) descrito por Claude Bernard em 1878. Bernard desenvolveu o conceito de que o organismo mantinha uma constância dos fluídos que envolviam as células independente das condições externas. Essa constância era essencial para a manutenção da vida (CANNON, 1929). Cannon propôs que, perante a uma ameaça a homeostasia, a medula adrenal e o sistema nervoso simpático seriam evocados para restaurar o equilíbrio (GOLDSTEIN; KOPIN, 2007). Entretanto, o próprio Cannon demonstrou que, em condições de temperatura e nutrientes controlados, os felinos eram capazes de sobreviver sem o sistema nervoso simpático intacto (CANNON, 1931).

Hans Selye foi responsável por popularizar o termo “Estresse” em 1946, ele o redefiniu como “uma resposta não específica do corpo a qualquer demanda, seja ela causada por, ou resultando, em condições favoráveis ou não favoráveis” (SELYE, 1946). Selye propôs a Síndrome da Adaptação Geral (SAG), dividida em três estágios, que seria a maneira universal como o corpo lida com o estresse. O primeiro estágio consiste num estado de alerta, no qual o organismo se mobiliza para enfrentar o agente estressor. Esta resposta seria mediada pelo Sistema Nervoso Autônomo Simpático. O segundo estágio é uma fase de resistência, no qual as respostas

fisiológicas e comportamentais estão no seu auge para neutralizar o agente estressor e retomar a homeostase. Estas respostas seriam regidas pelo Eixo Hipotálamo-Hipófise-Adrenal (HPA) através do hormônio esteróide cortisol. Por fim, o terceiro estágio consiste na exaustão dos sistemas caso estes falhem em neutralizar o agente estressor. Selye foi o pioneiro em associar o eixo-HPA a resposta do estresse e de considerar os efeitos prejudiciais da sobrecarga que essa resposta exacerbada teria (SELYE, 1946; SOUSA; SILVA; GALVÃO-COELHO, 2015).

Posteriormente às idéias de Bernard, Cannon e Selye, a alostasia foi descrita por Peter Sterling e Jonhathan Eyer, de modo a refinar a homeostasia e a resposta ao estresse. Para eles, o processo dinâmico de adaptação tem o cérebro como principal órgão a perceber, ponderar e orquestrar diversos sistemas efetores para manutenção da homeostase (STERLING; EVER; DICARLO, 1988). Diante de uma situação estressante, um fator muito importante na determinação da resposta fisiológica seria como o indivíduo percebe e analisa a situação. O modelo de processamento de estresse e *coping*, descrito por Lazarus e Folkman em 1984, descreve que, ao se deparar com um evento estressor em potencial, o indivíduo faz uma avaliação primária que classifica o evento como “Irrelevante”, “Estressante” ou “Benigno”. Na situação de um evento “Estressante”, o indivíduo irá avaliar o prejuízo, o desafio e a ameaça do evento, baseado nos seus processos de cognição, expectativas e em experiências prévias. Com base nessa avaliação e em recursos pessoais de *coping*, que são definidos como estratégias pessoais para adaptação a circunstâncias adversas, o cérebro irá orquestrar uma série de respostas comportamentais e fisiológicas a fim de promover a alostasia e consequente retomada da homeostase (ANTONIAZZI; DELL'AGLIO; BANDEIRA, 1998; MCEWEN; STELLAR, 1993).

O sistema simpático e o eixo-HPA são as principais vias ativadas durante esse processo, embora também haja a participação do Sistema Imune (SI) na alostasia (SAPOLSKY, 2002). O sistema simpático libera catecolaminas que vão se ligar a receptores adrenérgicos e produzem mudanças fisiológicas como: aumento da frequência cardíaca, aumento da disponibilidade energética (glicogenólise e lipólise) e aumento da taxa metabólica basal. A ativação do eixo-HPA produz o hormônio liberador de corticotropina (CRH) e vasopressina pelo hipotálamo, que estimulam a secreção do hormônio adrenocorticotrófico (ACTH) pela pituitária e que, por fim, será responsável por induzir liberação de glicocorticóides pelo córtex adrenal (NEMEROFF, 1996). Os glicocorticóides possuem receptores em diversos sistemas e induzem respostas fisiológicas, como transdução de sinal, aumento catabólico e remodelamento estrutural, destinadas a promover adaptação do organismo (DE KLOET, 1998). Os próprios glicocorticóides estão envolvidos no seu feedback através de receptores glicocorticóides (GR), expressos no hipotálamo, hipófise e hipocampo, e receptores mineralocorticóides (MR) expressos no hipocampo. Em níveis basais, o feedback é controlado pelo hipocampo através dos receptores MR, que possuem alta afinidade pelo seu ligante. Em situações de estresse, o feedback é regido pelos GR, menos sensíveis aos glicocorticóides (DE KLOET, 1998).

Quando o estímulo estressor é persistente ou existe uma inabilidade de se desativar os sistemas de alostasia, os sistemas recrutados podem ser danificados pela exacerbação de sua atividade (MCEWEN, 1998). Este fenômeno é chamado sobrecarga alostática. Um efeito proeminente dos glicocorticóides no cérebro é o remodelamento estrutural do hipocampo, região sensível e com alto nível de plasticidade (MCEWEN, 2007; MCEWEN; GIANAROS, 2011).

Foi demonstrado que o estresse crônico causa remodelamento e retração dos dendritos da região CA3 do hipocampo (MCEWEN, 1999; SOUSA et al., 2000) e, tanto o estresse crônico quanto o agudo, inibem a neurogênese de neurônios granulares na região do Giro Denteado (GD) (CHEN; HUANG; HSU, 2015). Quando o estresse é prolongado, as mudanças na estrutura hipocampal têm consequências na regulação do eixo-HPA. Danos ou redução da atividade do hipocampo causam deficiência na regulação do eixo-HPA, mais especificamente na terminação da resposta alostática, o que leva a um “*snowball effect*”, uma vez que a atividade do eixo-HPA não é cessada e os efeitos de longo prazo da carga alostérica são exacerbados (JURUENA, 2014; MCEWEN, 2007; MCEWEN; GIANAROS, 2011).

Por esse motivo, o surgimento de doenças neurodegenerativas e transtornos mentais são correlacionados ao estresse crônico não remediado. Estudos correlacionam o aumento da probabilidade do surgimento de transtorno de depressão maior (MDD), transtorno de ansiedade (AD), doença de Alzheimer (AD's), doença de Parkinson (PD) com as condições deletérias do estresse crônico (CHROUSOS, 2009; JURUENA, 2014; SWAAB; BAO; LUCASSEN, 2005; VYAS et al., 2016).

## 1.2 TRANSTORNOS PSIQUIÁTRICOS E O SISTEMA ENDOCANABINOIDE

A humanidade tem usado a *Cannabis sativa* com intuições terapêuticas e recreativas desde os tempos antigos (MECHOULAM; PARKER, 2013). No início dos anos 60, o grupo do Prof. Raphael Mechoulam isolou e determinou as estruturas químicas de mais de 60 compostos, chamados canabinóides, presentes na planta *C. sativa* (GAONI; MECHOULAM, 1964). Em seguida, foi demonstrado na década de 80 que os efeitos dos medicamentos cannabimiméticos eram mediados por sua interação

com sítios específicos, que levam à ativação da proteína G inibitória, com consequente, redução da atividade da enzima adenilato ciclase (HOWLETT, 1985; HOWLETT; QUALY; KHACHATRIAN, 1986). Mais tarde, em 1988, Devane e colaboradores (1988) identificaram um sítio de ligação específico para o Δ9-tetrahidrocannabinol (THC), o principal composto psicotomimético da planta, no cérebro de ratos (DEVANE et al., 1992). No início de 1990, esse local de ligação foi clonado e denominado de receptor de cannabinóide do tipo 1 (CB<sub>1</sub>) (MATSUDA, 1995). Alguns anos depois, um segundo receptor cannabinóide, CB<sub>2</sub>, também foi descrito (MUNRO; THOMAS; ABU-SHAAR, 1993). Em conjunto, esses achados forneceram a base para a elucidação de um novo sistema endógeno completo: o sistema endocannabinóide (eCBS). Em paralelo com a descoberta dos dois receptores cannabinóides, os primeiros ligantes endógenos foram também descritos, denominados endocannabinóides (eCB) (DEVANE et al., 1992; MECHOULAM et al., 1995). Até o momento, os eCBS mais estudados são os derivados dos fosfolipídios de membrana, particularmente a araquidonoil etanolamida ou anandamida (AEA) e 2-araquidonoilglicerol (2-AG) (MACCARRONE et al., 2014). Os endocannabinóides são reconhecidos como neuromoduladores sintetizados “sob demanda” após a despolarização celular ou estimulação do receptor (por exemplo, NMDA, mGlu5) por enzimas específicas (AEA: N-acil-fosfatidiletanolamina fosfolipase, D-NAPE-PLD; 2-AG: α e β isoformas diacilglicerol (DAGL) (SAITO et al., 2010). A amido hidrolase de ácido graxo (FAAH) e monoacilglicerol lipase (MAGL) são as principais enzimas que metabolizam AEA e 2-AG, respectivamente, encerrando ações eCB (CRAVATT et al., 1996; DINH; FREUND; PIOMELLI, 2002).

Os receptores CB<sub>1</sub> são amplamente distribuídos no Sistema Nervoso Central (SNC) e primariamente expressos em terminais pré-sinápticos, onde os eCBs podem

atuar como mensageiros retrógrados (MACCARRONE et al., 2014; WILSON; NICOLL, 2001). No SNC, esse receptor acoplado  $G_{i/o}$  é densamente expresso em neurônios. Uma vez ativado, ocorre a diminuição da probabilidade de liberação de neurotransmissores (GABA, glutamato, etc), via inibição dos canais de  $Ca^{2+}$  pré-sinápticos e ativação de canais de  $K^+$  (KREITZER; REGEHR, 2001; MACKIE et al., 1995).

Os eCBs estão envolvidos em mecanismos de plasticidade de curto e longo prazo em várias estruturas cerebrais, como a amígdala (AZAD et al., 2004) (Azad, et al. 2004), núcleo accumbens (ROBBE et al., 2002), estriado (GERDEMAN; RONESI; LOVINGER, 2002) e hipocampo (IZUMI; ZORUMSKI, 2012; OHNO-SHOSAKU et al., 2007; ZHU; LOVINGER, 2007). Apesar das vias de sinalização canônica, via receptores acoplados a  $G_{i/o}$ , estudos indicam a existência de receptores CB<sub>1</sub> acoplados a proteínas G<sub>q</sub> no hipocampo (LAUCKNER; HILLE; MACKIE, 2005) e astrócitos (NAVARRETE; ARAQUE, 2010). Os eCBs liberados pelos neurônios podem se ligar aos receptores CB<sub>1</sub> acoplados ao G<sub>q</sub> presentes nos astrócitos, promovendo assim, a liberação de glutamato dessas células gliais (NAVARRETE; ARAQUE, 2010).

Embora ainda em debate, alguns estudos também sugeriram a expressão neuronal dos receptores CB<sub>2</sub> (BRUSCO et al., 2008a, 2008b; LI; KIM, 2016; STEMPEL et al., 2016). No entanto, outros estudos relatam que a expressão do RNA mensageiro (mRNA) deste receptor canabinóide é insignificante (400 a 2000 vezes menor que o mRNA do receptor CB<sub>1</sub>) no SNC (MARCO et al., 2014). É bem aceito, no entanto, que o CB<sub>2</sub> é expresso em células microgliais primárias (NÚÑEZ et al., 2004), influenciando os fenótipos da microglia polarizando essas células para o tipo M<sub>2</sub>.

(alternativa / antiinflamatória) (LI; KIM, 2017; MECHA et al., 2015) através da via do AMPc / PKA (TAO et al., 2016).

A função fisiológica precisa dos eCBs permanece sob investigação. Evidências sugerem que as modificações negativas na modulação mediada por esses compostos estão associadas aos distúrbios neuropsiquiátricos, como transtornos depressivos maiores (MD), esquizofrenia e transtornos de ansiedade (HILLARD; WEINLANDER; STUHR, 2012; PACHER; KUNOS, 2013). Por exemplo, o rimonabant, um antagonista/agonista inverso do receptor CB<sub>1</sub>, que há anos era comercializado para o tratamento do abuso de tabaco, obesidade e distúrbios metabólicos associados, foi retirado do mercado devido aos seus severos efeitos adversos de ordem psiquiátrica (MOREIRA; CRIPPA, 2009). Além disso, situações estressantes induzem mudanças na sinalização de eCBs, aumentando a suscetibilidade e influenciando o aparecimento de transtornos psiquiátricos (HILL et al., 2010; HILLARD, 2014).

Vários estudos sugerem que os eCBs reduzem a ativação do eixo-HPA e facilitam a recuperação homeostática ao estresse (BALSEVICH et al., 2017; PATEL, 2004; PATEL et al., 2004, 2009). No entanto, o impacto de experiências estressantes nos eCBs parece ser bastante complexo, dependendo da intensidade, duração, natureza/tipo do estressor e região do cérebro investigada (CAMPOS et al., 2010; HILL et al., 2010; PATEL, 2004; PATEL et al., 2004; RUBINO et al., 2008).

O estresse crônico produz mudanças comportamentais e neuroquímicas em roedores que se assemelham aos encontrados na depressão humana. No sistema endocanabinóide, o estresse crônico resulta em reduções nos níveis de AEA, 2-AG, CB<sub>1</sub> e CB<sub>2</sub> no hipocampo (GARCÍA-GUTIÉRREZ et al., 2010; HILL et al., 2008; HILL; GORZALKA, 2005; REICH; TAYLOR; MCCARTHY, 2009; ZHONG et al., 2014), juntamente com a expressão aumentada da proteína FAAH nesta região (REICH;

TAYLOR; MCCARTHY, 2009). Dessa forma, podemos pensar que a inibição da FAAH poderia ser um alvo terapêutico interessante em situações de estresse incontrolável.

Não obstante, a ativação de receptores canabinóides pode levar ao recrutamento de várias vias intracelulares, que também estariam envolvidas nos transtornos psiquiátricos. Algumas delas, como a via da ERK<sub>1/2</sub> e Akt/mTOR estão particularmente afetadas durante situações de estresse crônico (FOGAÇA et al., 2014).

### 1.3 TRANSTORNOS PSIQUIÁTRICOS E VIAS INTRACELULARES

Estudos demonstram que o estresse crônico medeia efeitos na via de sinalização de mTOR (*mechanistic target of rapamycin*), via de sinalização que regula diversos fatores celulares relacionados a homeostasia como síntese protéica, manutenção e biogênese de organelas, metabolismo e sobrevivência celular. Um estudo realizado em 2013 revelou uma diminuição da sinalização de mTOR na amígdala de ratos submetidos ao paradigma de estresse crônico imprevisível (CUS, do inglês *chronic unpredictable stress*) com duração de oito semanas (CHANDRAN et al., 2013). Outro trabalho demonstrou que CUS de oito semanas e estresse crônico por derrota social (SDS) de 10 dias em camundongos C57BL/6 diminuiu a sinalização de mTOR no hipocampo (XU et al., 2017). Um estudo *postmortem* feito com cérebros de pacientes com MDD revelaram que havia uma deficiência da sinalização de mTOR no córtex pré-frontal em relação a pacientes que não apresentavam o transtorno (JERNIGAN et al., 2011). As regiões do cérebro como hipocampo, córtex pré-frontal e amígdala são regiões pertinentes a resposta do estresse e suscetíveis aos efeitos do estresse crônico, e a sinalização de mTOR se demonstra prejudicada nessas

regiões em situações prolongadas de estresse ou na presença de MDD (COSTA-MATTIOLI; MONTEGGIA, 2013; JERNIGAN et al., 2011; RYSKALIN et al., 2018).

Os antidepressivos são os primeiros fármacos de escolha para o tratamento de transtornos psiquiátricos como MDD e transtorno de ansiedade. O fármaco Ketamina, clinicamente utilizado como anestésico dissociativo, atua como antagonista dos receptores glutamatérgicos do tipo NMDA, interage com canais de cálcio, receptores muscarínicos, opioides e monoaminérgicos, e recentemente foi descrito efeito antidepressivo em sub doses (ABELAIRA et al., 2014). Um estudo feito por Li e colaboradores em 2011 demonstraram que a dose aguda de 10 mg/kg de Ketamina foi capaz de reverter os efeitos do paradigma de CUS de 21 dias em ratos. A dose aguda de Ketamina reverteu os efeitos comportamentais exercidos pelo CUS no Teste da Preferência pela Sacarose (SPT, do inglês *sucrose preference test*), teste preditivo para efeitos antidepressivos de drogas, e no Teste da Supressão da Alimentação pela Novidade (NSF, do inglês *novelty suppressed feeding*), que avalia comportamento do tipo ansioso induzido pelo estresse e sensível ao tratamento crônico com antidepressivos. O efeito da Ketamina era dependente da sinalização de mTOR, visto que uma dose concomitante de Rapamicina, um inibidor do complexo mTOR, reverteu os efeitos do tratamento com Ketamina. Além dos efeitos comportamentais, a Ketamina também reverteu os déficits causados na plasticidade sináptica (LI et al., 2011). Outro trabalho demonstrou que os efeitos antidepressivos da Ketamina estão associados ao aumento da regulação do Fator Neurotrófico Derivado do Cérebro (BDNF) e mTOR por receptores glutamatérgicos do tipo AMPA. Neste estudo, foi feito o tratamento agudo com a dose de 10 mg/kg de Ketamina e concomitante uma dose de um antagonista de receptores AMPA (NBQX) ou uma dose de um agonista de receptores AMPA (CX546). Ratos submetidos ao Teste do Nado Forçado (FST), um

teste robusto para avaliação de efeitos antidepressivos de drogas, tiveram o tempo de imobilidade diminuído, em relação ao grupo veículo, quando tratados com Ketamina. Este efeito fora ainda mais proeminente quando os animais recebiam a dose de CX546 e o efeito era prejudicado quando administrada a dose de NBQX. O autor ainda demonstra que a Ketamina aumenta a expressão de mTOR fosforilado e BDNF nas regiões do hipocampo e córtex pré-frontal. Esta expressão é ainda mais proeminente nos animais tratados concomitantemente com CX546 e revertida quando tratados com NBQX (ZHOU et al., 2014).

Outros antidepressivos também alteram a via de sinalização de mTOR. Um estudo por Park et al. (2014) demonstrou que o tratamento por quatro dias com os antidepressivos ketamina, escitalopram, paroxetina e tranicilpromina aumentaram a sinalização da via de mTOR em células hipocampais submetidas a um modelo de estresse celular (PARK et al., 2014). Esses fatos evidenciam que fatores como estresse crônico, transtornos psiquiátricos e seus respectivos tratamentos influenciam a via de sinalização de mTOR.

#### 1.4 VIA PI3K/AKT/mTOR

A mTOR é uma proteína serina/treonina quinase da família fosfatidilinositol 3-quinase (PI3K) que está expressa em células eucarióticas, incluindo neurônios, e atua em diversos processos biológicos (COSTA-MATTIOLI; MONTEGGIA, 2013). Dois complexos distintos contendo mTOR foram identificados, mTORC1 (Complexo mTOR 1) e mTORC2 (Complexo mTOR 2). Ambos complexos mTOR possuem as proteínas mTOR, G $\beta$ L e DEPTOR. Proteínas específicas a mTORC1 são Raptor, proteína

essencial para funcionamento do complexo, e PRAS40. mTORC2 por sua vez possui Rictor, proteína similar a Raptor para mTORC2, e mSIN1 (LIPTON; SAHIN, 2014).

A sinalização dos complexos mTOR está relacionada diversos processos da fisiologia neuronal como: Neurogênese e diferenciação celular (FISHWICK et al., 2010; HAN et al., 2008); regeneração e brotamento de axônios (KIM et al., 2011, 2012; PARK et al., 2008); morte e sobrevivência neuronal (HARA et al., 2006; KOMATSU et al., 2006); e plasticidade sináptica via LTP-LTD (STOICA et al., 2011; TANG et al., 2002).

Sinais extracelulares que ativam a via de mTOR, com relevância para os neurônios, são: BDNF, insulina, fator de crescimento do tipo-insulina (IGF1), fator de crescimento do endotélio vascular (VEGF), fator neurotrófico ciliar (CNTF) e glutamato (LIPTON; SAHIN, 2014).

mTORC1 é diretamente fosforilado, e ativado, por uma GTPase denominada Rheb (Homólogo da Ras enriquecido no cérebro). Rheb, por sua vez, é inativada pelo complexo TSC1-TSC2 (Hamartina-Tuberina) (TSC) que converte Rheb-GTP ativa em Rheb-GDP desativada, inibindo a ativação de mTORC1. A função de TSC é regida principalmente por duas cascadas quinases, ERK<sub>1/2</sub> e PI3K/PDK/Akt. A sinalização extracelular dos receptores ativa essas vias, que vão impedir a formação do complexo TSC e permitir a ativação de mTOR por Rheb (BOCKAERT; MARIN, 2015; LIPTON; SAHIN, 2014).

Akt também pode ativar diretamente mTORC1 via proteína PRAS40 acoplada ao complexo (LIPTON; SAHIN, 2014). Ainda é pouco elucidado os meios em que mTORC2 é ativado nos neurônios. Entretanto, evidências apontam que mTORC1 tem relevância na ativação e inibição do funcionamento de mTORC2 (BOCKAERT; MARIN, 2015).

mTORC1 tem como principal função a sinalização da transcrição e síntese proteica através dos seus substratos P70S6K1/2 (proteína ribossomal S6 quinase beta-1) e 4E-BP1/2/3 (proteína ligante de eIF4E). A função de mTORC2 está implicada na sobrevivência celular, manutenção do citoesqueleto de actina da célula e regulação de mTORC1 via fosforilação de Akt (LIPTON; SAHIN, 2014). mTORC1 também participa nos processos de lipogênese, biogênese mitocondrial e regulação da via autofágica (LIPTON; SAHIN, 2014).

A autofagia é um processo catabólico celular de caráter evolutivo e conservado que sequestra e degrada componentes do citosol e organelas através da participação dos lisossomos (NIKOLETOPOULOU; PAPANDREOU; TAVERNARAKIS, 2015). A autofagia tem um tônus basal e pode ser aumentada ou diminuída em diferentes processos, o que promove a manutenção da homeostase, proteção e sobrevivência celular. Na situação de estresse metabólico (privação de nutrientes, depleção de fatores de crescimento e hipóxia), a autofagia catalisa moléculas fúteis ou danificadas, a fim de promover nutrientes e manter a homeostase celular (KUMA et al., 2004). Sequestra e destrói proteínas tóxicas ou malformadas que podem acumular e causar danos celulares (KOMATSU et al., 2006). Reduz estresse oxidativo, causado por espécies reativas de oxigênio (EROs), com a finalidade de evitar danos no DNA celular. Em casos extremos ocorre o sequestro e destruição das mitocôndrias defeituosas, principal fonte de EROs nas células, a fim de promover a homeostase celular (EISENBERG-LERNER; KIMCHI, 2012). A autofagia também tem um papel importante no desenvolvimento e sobrevivência de células neurais. A deficiência de fatores importantes para a regulação do processo autófágico está relacionada à morte prematura de neurônios e neurodegeneração (BOYA; MELLÉN; DE LA ROSA, 2008; KOMATSU et al., 2006; XI et al., 2016).

mTORC1 é um regulador negativo da autofagia. A inibição da via autofágica acontece pela hiperfosforilação de Atg13, que impede a formação do complexo ULK1-Atg13-Atg101-FIP200 responsável pela indução e início da autofagia (NIKOLETOPOULOU; PAPANDREOU; TAVERNARAKIS, 2015; YANG et al., 2005). Quando mTORC1 desfosforila o complexo ULK1, este recruta o complexo Beclin1-PI3KC3 (Beclin1-Ambra1-PI3KC3-p150-Atg14), que inicia a nucleação do autofagossoma, endossomo que envolve os componentes a serem degradados (FILOMENI; DE ZIO; CECCONI, 2015; NAVARRO-YEPES et al., 2014). Subsequente a nucleação do autofagossoma, dois sistemas de conjugação *ubiquitin-like* são importantes para o alongamento e formação do autofagossoma, o complexo Atg12-Atg5-Atg16L e LC3 (microtubule-associated protein light chain 3) (NAVARRA-YEPES et al., 2014; NIKOLETOPOULOU; PAPANDREOU; TAVERNARAKIS, 2015). Terminado o alongamento do autofagossoma, o complexo Atg12-Atg5-Atg16L se dissocia e é liberado, no entanto, LC3 permanece ligado a fosfatidiletanolamina da membrana celular do autofagossoma, o que torna LC3 um marcador viável para uma noção de fluxo autofágico (YANG et al., 2005). Terminada a formação do autofagossoma, dineínas e cinesinas irão transportar o autofagossoma para as proximidades do lisossomo (NIKOLETOPOULOU; PAPANDREOU; TAVERNARAKIS, 2015), estes irão se fundir e o conteúdo do autofagossoma será degradado.

Estudos demonstram que existe uma deficiência dessa via em situações de estresse crônico, paradigma que está correlacionado ao aumento da probabilidade do surgimento de transtornos psiquiátricos. Outras evidências mostram que há um déficit da via de mTOR em pacientes que apresentavam MDD e que o tratamento farmacológico para estes transtornos, como, por exemplo, antidepressivos, leva a um aumento da sinalização dessa via (COSTA-MATTIOLI; MONTEGGIA, 2013;

JERNIGAN et al., 2011; RYSKALIN et al., 2018). Estes fatos apontam para a via de sinalização PI3K/Akt/mTOR como um possível alvo terapêutico para a intervenção farmacológica desses transtornos.

## 1.5 CONTEXTUALIZAÇÃO E HIPÓTESE

Atualmente os antidepressivos são a primeira linha de escolha para o tratamento de MDD e AD, mas essas drogas apresentam limitações clínicas. A latência para que o tratamento tenha efeito, que demora entre 21 a 28 dias, e a alta incidência de efeitos colaterais influenciam a baixa adesão ao tratamento por parte dos pacientes. Dessa forma, tendo em vista todo o contexto descrito até aqui sobre o possível envolvimento do sistema endocanabinóide e de vias intracelulares na patofisiologia de transtornos psiquiátricos tais como a ansiedade e depressão maior, o presente trabalho tem como hipótese que a facilitação da sinalização endocanabinóide, mediada pela anandamida, pode atenuar os efeitos do estresse crônico via sinalização Akt/mTOR com possível envolvimento de mecanismos macroautofágicos.

## **2      OBJETIVOS**

### **2.1    OBJETIVO GERAL**

O estudo tem por finalidade avaliar a participação da via autofágica mediada pela Akt/mTOR nos efeitos comportamentais do URB597 em camundongos submetidos cronicamente ao estresse de derrota social.

### **2.2    OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

- Avaliar se o tratamento crônico com URB597 atenua os efeitos do estresse crônico de derrota social;
- Verificar se nos animais estressados, o tratamento com URB597 modifica a expressão das proteínas p-mTOR, mTOR, Raptor, Rictor, LC3B, G $\beta$ L, p-AKT Beclin-1;
- Averiguar se os efeitos comportamentais gerados pelo URB597 poderiam ser atenuados pelo pré-tratamento com o facilitador da macroautofagia, a rapamicina;
- Investigar o envolvimento dos receptores CB<sub>1</sub> no processo de indução autofágica.

### **3 MATERIAIS E MÉTODOS**

#### **3.1 ANIMAIS**

Foram utilizados camundongos C57BL/6J (provenientes do Biotério Central do Campus USP- Ribeirão Preto) machos com idade entre 10-12 semanas e peso entre 25g e 30g. Os animais foram separados em grupos de três por caixa e assim mantidos por 4 semanas até o início dos protocolos de estresse.

Para o estresse por derrota social, foram utilizados, como animais intrusos, camundongos machos (provedores de reprodução) da linhagem Swiss retirados do Biotério Central logo após o período de acasalamento e isolados até o procedimento de estresse.

Durante todo o período em que os animais foram mantidos sob nossa responsabilidade eles foram alojados em ambiente com temperatura controlada, ciclo de luz 12h claro/12h escuro (o ciclo claro tem início às 06h00 e término às 18h00) e água e comida *ad libitum*. Estas condições satisfazem os regulamentos do Comitê de Ética Local, sendo o projeto aprovado sob o número de protocolo CEUA 144/2016.

#### **3.2 DROGAS E TRATAMENTO**

Para o tratamento crônico dos animais as drogas utilizadas foram: URB597 (Cayman Chemical, Michigan, Estados Unidos), um inibidor específico da amido hidrolase de ácido graxo (FAAH) enzima que degrada o endocanabinóide araquidonooiletanolamina (anandamida, AEA). Consequentemente, o efeito terapêutico dessa droga se dá pelo aumento indireto da disponibilidade sistêmica de AEA (BORTOLATO et al., 2007; SCHERMA et al., 2008); Rapamicina (LC

Laboratories, Massachussets, Estados Unidos), um inibidor do complexo mTOR (Torc1); AM251 (Cayman Chemical), um agonista inverso/antagonista de receptores canabinoides do tipo 1.

A doses utilizadas foram: URB597 - 0,1 mg/kg, 0,3 mg/kg e 1,0 mg/kg (BORTOLATO et al., 2007); Rapamicina (5 mg/Kg) (LIMA et al., 2017) , AM251 (0,3 mg/Kg) (FOGAÇA et al., 2018). As drogas foram diluídas em solução salina contendo Tween 80 a 2%V/V e preparadas todos de maneira estéril antes da sua administração. A administração foi feita por via intraperitoneal (i.p.) no período das 08h00 às 10h00, diariamente durante sete dias.

### 3.3 MODELO DE ESTRESSE CRÔNICO: ESTRESSE POR DERROTA SOCIAL (SDS)

A formação de hierarquia social entre animais é um fenômeno natural e de caráter evolutivo. É comum que pequenos grupos de camundongos estabeleçam um líder para sua estrutura hierárquica (POSHIVALOV, 1980). No modelo adaptado do SDS usado em nosso grupo de pesquisa, um animal intruso, no caso um camundongo Swiss, é introduzido na *home cage* dos animais durante duas horas, no período das 14h00 às 16h00 (KRISHNAN et al., 2007).

A intrusão de um animal agressor maior e mais forte, que não pode ser derrotado, cria uma desarmonia na estrutura hierárquica dos camundongos. Além do estresse físico, decorrentes de agressões entre os animais na tentativa de defesa do território, um estresse de ordem psicossocial é causado no grupo de camundongos devido a desestruturação de sua hierarquia social.

### **3.4 SUPRESSÃO DA ALIMENTAÇÃO PELA NOVIDADE (NSF)**

O teste consiste em introduzir o animal a um ambiente novo, no caso uma caixa transparente de acrílico forrada com maravalha limpa, que possui uma plataforma central com iluminação aversiva ( $> 200$  lux). Um pellet da ração a que os animais estão habituados é acomodada na plataforma central e o tempo de latência para que o animal se alimente é avaliado (CAMPOS et al., 2013b; SANTARELLI et al., 2003).

Nesse modelo o animal se encontra em conflito entre a tendência natural de se alimentar devido à privação de comida e a aversão a um ambiente novo, aberto e iluminado (CAMPOS et al., 2013a). Este teste é um modelo preditivo para drogas com potencial ansiolítico, visto que a administração crônica de antidepressivos, drogas comumente utilizadas para o tratamento de transtornos de ansiedade, leva à diminuição da latência para que o animal se alimente (DULAWA et al., 2004).

### **3.5 TESTE DO NADO FORÇADO (TNF)**

Este teste foi realizado para a detecção de comportamentos relacionados ao enfrentamento passivo (imobilidade) e ativo (natação) elicitados por uma situação inescapável. Para o teste do nado forçado os animais foram colocados individualmente em um recipiente de vidro transparente preenchido com água até a altura de 10 cm, a uma temperatura de 23-25°C, segundo descrito por Porsolt e colaboradores (1978) (PORSOLT et al., 1978). 24h após o último tratamento com diferentes doses de URB597, os camundongos foram submetidos a uma sessão de 6 minutos de natação, sendo o tempo de imobilidade de cada animal medido nos últimos 4 minutos da sessão.

### **3.6 PROCEDIMENTOS EXPERIMENTAIS**

Os experimentos foram divididos de acordo com o tratamento recebido e testes comportamentais realizados. Grupos independentes de animais foram submetidos a:

#### **3.6.1 Experimento I**

Os animais foram distribuídos em seis grupos experimentais com três camundongos por caixa. Metade dos grupos foram submetidos ao regime de estresse crônico por SDS. Os grupos experimentais foram: Controle/Estresse – Veículo, Controle/Estresse – Dose I (URB597), Controle/Estresse – Dose II (URB597), Controle/Estresse - Dose III (URB597). As administrações da droga foram feitas das 08h00 às 10h00 durante um período de sete dias. As doses de URB597 foram 0,1mg/kg, 0,3mg/kg e 1,0mg/kg. O estresse foi realizado diariamente entre as 14h00 e 16h00, com duração igual à do tratamento.

#### **3.6.2 Experimento II**

Similar ao experimento I, mas os animais foram submetidos ao teste do nado forçado.

#### **3.6.3 Experimento III**

Tendo por base a dose efetiva de URB597 determinada no experimento I em animais estressados, avaliamos se os efeitos comportamentais promovidos pelo

URB597 prevaleciam no NSF, na presença do tratamento prévio (1h hora antes) com Rapamicina (FOGAÇA et al., 2018).

### 3.6.4 Experimento IV

Similar ao experimento I; No entanto, verificamos se os efeitos do URB597 seriam modificados pela administração prévia (1h antes) do agonista inverso/antagonista de receptores CB<sub>1</sub>, AM251.

Logo após os testes comportamentais (experimentos I-IV) os animais foram anestesiados com uma sobredose de Ketamina + Xilazina (375mg/kg + 25mg/kg) diluídos em salina, via i.p e sacrificados por decapitação. O cérebro de cada animal foi então retirado e o córtex pré-frontal e o hipocampo foram dissecados e imediatamente congelados em gelo seco para análises moleculares de *Western blot*. No caso da análise por imuno-histoquímica (provenientes do experimento II), os animais foram anestesiados profundamente e perfundidos por via transcardíaca com PBS seguido de paraformaldeído (PFA) 4%. Posteriormente os cérebros foram retirados, pós-fixados em PFA 4%, crioprotegidos em sacarose 30%, congelados em atmosfera de gelo seco e cortados com espessura de 30 µm em criostato (Leica, Wetzlar, Alemanha).

## 3.7 ANÁLISE DE EXPRESSÃO PROTEICA POR *WESTERN BLOT*

Para o estudo do papel da via PI3K/Akt/mTOR e de suas vias efetoras, foram quantificadas as proteínas mTOR, p-mTOR, LC3-I, LC3-II e Beclin 1 utilizando a técnica de *Western Blot*.

Os hipocampos foram homogeneizados, tomando cuidado com elevações de temperatura, em tampão de lise contendo inibidores de proteases (Pirofosfato de sódio 2,5mM; Ortovanadato de sódio 1mM; Molibdato de sódio 5mM; Coquetel Inibidor de Proteases, Sigma, Missouri, Estados Unidos) a fim de evitar proteólise.

Foi feita a quantificação proteica dos homogenatos utilizando a técnica de Bradford, que se baseia na interação das proteínas com o Coomassie Brilliant Blue G-250, e subsequente leitura de absorbância para determinação da concentração proteica a partir de uma curva padrão com concentrações conhecidas de albumina de soro bovino (BRADFORD, 1976).

Os homogenatos foram preparados em tampão de Laemmli (Tris-HCl; glicerol; dodecil sulfato de sódio (SDS) e a concentração proteica foi ajustada para 2ug/uL. Foi utilizada a técnica de eletroforese em gel de poliacrilamida-SDS para a separação das proteínas pelo seu peso molecular no sistema Novex (Invitrogen, Califórnia, Estados Unidos). No total foram carregados 40ug de proteínas em cada poço do gel e foi feita a corrida em uma voltagem de 150V. Após este procedimento as proteínas foram transferidas por método úmido em tampão carbonato para uma membrana de nitrocelulose (0.2um, GE, Massachusetts, Estados Unidos).

Após a transferência as membranas foram bloqueadas com 10% de leite desnatado (Biorad, California, Estados Unidos) em Tampão Tris-salina contendo 0.1% de Tween 20 (TBST) por duas horas. Em seguida a membrana foi lavada três vezes com TBST por cinco minutos e incubada com anticorpo primário (anti p-mTOR 1:1000; anti mTOR 1:1000; anti Beclin-1 1:1000; anti LC3B 1:1000; anti Rictor 1:1000; anti

Raptor 1:1000; anti G $\beta$ L 1:100, anti p-AKT 1:100, anti Alfa-Tubulina 1:10000, Cell Signaling Massachusetts, Estados Unidos) *overnight*, à temperatura de 4°C.

Após a incubação, a membrana foi lavada três vezes com TBST durante cinco a dez minutos e em seguida incubada com anticorpo secundário (anti Rabbit IgG 1:10000; anti Mouse IgG 1:10000, GE, Massachusetts, Estados Unidos) por duas horas. Novamente a membrana foi lavada três vezes com TBST durante cinco a dez minutos e as proteínas foram reveladas pelo método de quimioluminescência aumentada (ECL prime, GE) e escaneada para posterior análise densitométrica da membrana. A quantificação foi feita utilizando programa Image Studio™ Lite (Li-COR Bioscence, Nebraska, Estados Unidos). A marcação para alfa-tubulina foi utilizada como controle de carga dos géis.

### 3.8 DETERMINAÇÃO DE CÉLULAS DOUBLECORTIN (DCX) POSITIVAS NO GIRO DENTEADO DO HIPOCAMPO

Brevemente, os cortes contendo o giro dentado do hipocampo (-1,92 a -4,08 mm a partir do bregma, Paxinos e Franklin, 2007) receberam 3 lavagens em PBS, e foram bloqueados durante 2h em solução de BSA 1%. Em seguida os cortes foram incubados durante a noite com o anticorpo primário (anti-DCX 1:200, Santa Cruz Biotechnology, Texas, Estados Unidos) e posteriormente incubados com o respectivo anticorpo secundário do kit Vectastain (Vector Labs, California, Estados Unidos) e a coloração foi revelada por 3,3-diaminobenzidina (DAB). Ao término dos procedimentos de imuno-histoquímica, os cortes foram montados em lâmina/lamínula com auxílio do meio de montagem Entelan (Merck, EUA) e analisadas em microscópio de luz no aumento de 20X com auxílio do Image Pro Plus (Media Cybernetics, Cambridge,

Reino Unido). Foram quantificados 12 cortes por animal representativos do intervalo apontado acima (CAMPOS et al., 2013b) observando o número de células DCX positivas e a posição dessas células nas camadas do giro denteado (subgranular ou granular). Células positivas com os corpos celulares localizados na camada granular, forma consideradas em fase de migração (FOGAÇA et al., 2018).

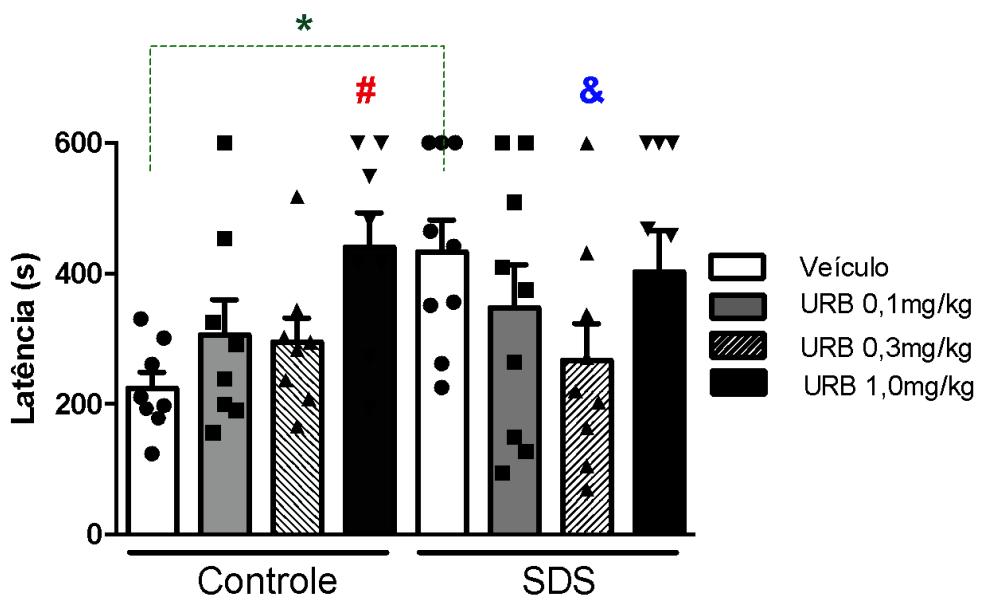
### 3.9 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os dados estão representados como média  $\pm$  erro padrão da média (EPM) e exceções estão especificadas nas legendas e descrições dos dados correspondentes. A normalidade dos dados foi avaliada por meio do teste de Kolmogorov-Smirnov e a homogeneidade de variâncias através do teste de Levene. Os dados foram analisados por ANOVA de uma ou duas vias seguida do teste de Duncan para comparações múltiplas ou teste t de amostras independentes para análises entre 2 grupos. Foram considerados significativos valores de  $p \leq 0,05$ .

## **4      RESULTADOS**

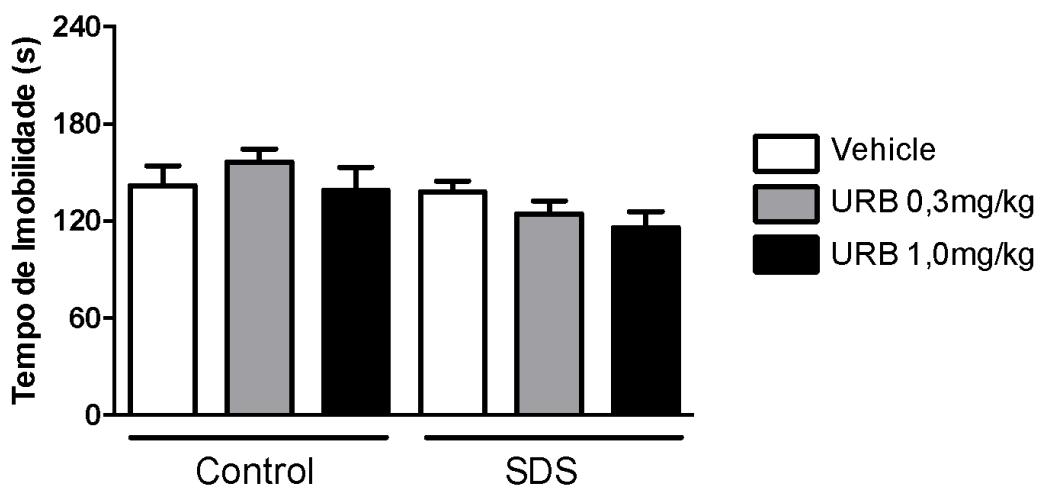
### **4.1    O TRATAMENTO COM URB597 INDUZ EFEITOS COMPORTAMENTAIS NO NSF, MAS NÃO NO NADO FORÇADO, DE MANEIRA DOSE DEPENDENTE E DEPENDENDO DE EXPERIÊNCIA PRÉVIA AO SDS.**

Após o último dia (7º dia) de estresse por derrota social e tratamento, os animais foram submetidos ao teste de NSF (Figura 1). No bloco tratado com URB597, os animais submetidos ao paradigma de estresse por derrota social, que receberam veículo, apresentaram um aumento o tempo de latência para se alimentarem no ambiente novo quando comparados aos animais controle (Test t,  $t_{(11,61)}=3,9$ ,  $p<0.01$ ). A análise de ANOVA de duas vias nos sugere um efeito do tratamento ( $F_{(3,2)}=2,5$ ,  $p=0.06$ ), uma tendência a interação stress tratamento (Two-way ANOVA, interação stresse vs tratamento  $F_{(3,60)} = 2.33$ .  $p = 0,08$ ), mas não fica claro o efeito do estresse ( $F_{(1,60)} = 1.5$ ,  $p=0.22$ ). O tratamento com URB, em doses diferentes, produziu um efeito dependente da condição. Os animais controle que receberam a dose de 1,0 mg/kg de URB597 tiveram um aumento no tempo de latência quando comparados com os animais controle tratados com veículo ( $F_{(3,28)} = 4,3$ ;  $p < 0,05$ ; One Way ANOVA, seguido pelo pós-teste de Duncan). Já nos animais estressados, o tratamento com a dose 0,3mg/kg de URB597 demonstrou uma tendência em prevenir os efeitos causados pelo estresse, diminuindo o tempo de latência quando comparados com os animais estressados tratados com veículo ( $F_{(3,32)} = 1,846$ ,  $p = 0,073$ ; Pós-teste de Duncan).



**Figura 1.** Tempo de latência no Teste da Supressão da Alimentação pela Novidade: Animais submetidos ao SDS tratados com veículo demonstram uma tendência no aumento da latência em relação ao seu grupo controle, embora não tenha significância estatística. O efeito do tratamento com URB597 é dependente de dose e experiência prévia, visto que a dose de 0,3mg/kg previne os efeitos causados pelo SDS nos animais estressados quando comparados com seu grupo veículo e a dose de 1mg/kg aumenta a latência em animais controle quando comparado com seu grupo veículo. As barras representam a média +/- erro padrão da média. \* $p < 0,05$  Veic-controle vs Veic-SDS (teste-t), #  $p < 0,01$  (One-Way ANOVA- controles), &  $p = 0,073$  (One-Way ANOVA- SDS). N= 8,8,8,8,9,9,9,9, respectivamente.

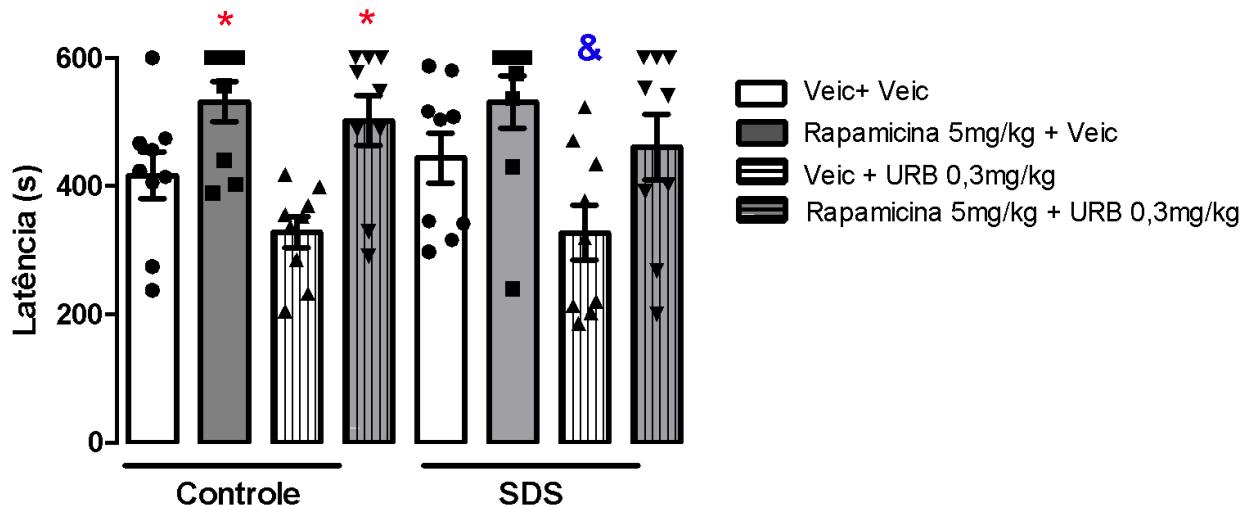
No teste do nado forçado, não observamos o efeito do estresse ou do tratamento repetido com URB597, nas doses de 0,3 ou 1 mg/Kg (figura 2).



**Figura 2.** Tempo de imobilidade no teste do nado forçado. Animais controles ou submetidos ao SDS e tratados com veículo com diferentes doses de URB597. As barras representam a média +/- erro padrão da média. N= 9,9,9,12,12,12 respectivamente.

#### 4.2 OS EFEITOS COMPORTAMENTAIS DO URB597 EM ANIMAIS ESTRESSADOS SÃO ATENUADOS PELO TRATAMENTO PRÉVIO COM A RAPAMICINA.

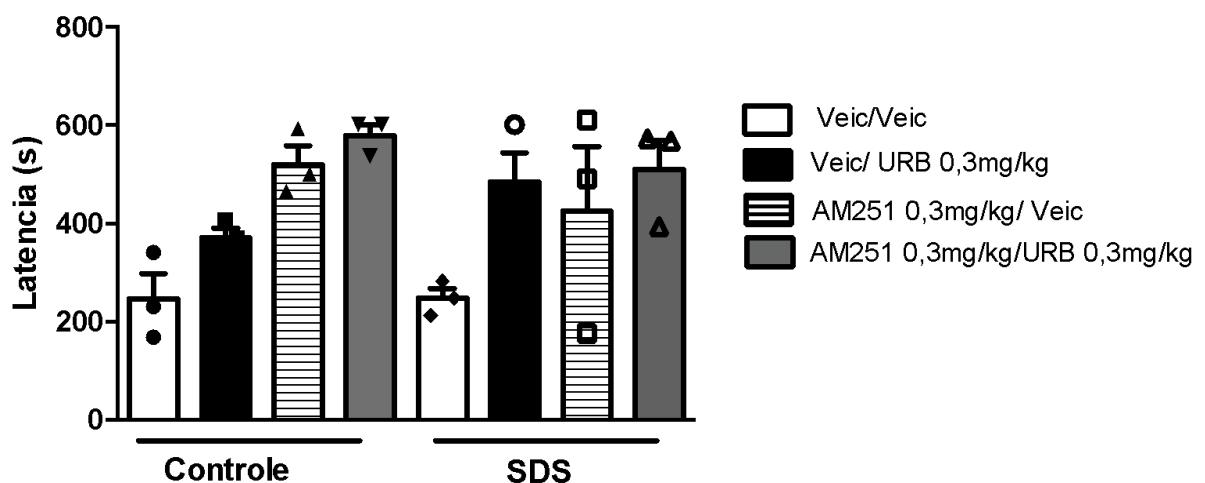
Na figura 3, observamos o efeito do tratamento prévio da Rapamicina (5mg/Kg) sobre os efeitos comportamentais do URB597 em camundongos que passaram ou não pelo SDS e foram submetidos ao teste de NSF. Análise de ANOVA de duas vias sugere que houve um efeito do tratamento ( $F_{(3,64)} = 10$ ,  $p < 0,01$ ) que não foi acompanhado pelo efeito da condição (controle vs estresse,  $F_{(1,64)} = 0,18$ ,  $p = ns$ ) ou da interação entre os fatores (condição vs tratamento,  $F_{(3,64)} = 0,256$ ,  $p = ns$ ). Analisando os efeitos dos fármacos em cada uma das condições, observamos que o tratamento com a Rapamicina aumenta a latência dos animais controle para se alimentar no ambiente novo ( $F_{(3,32)} = 7,6$ ,  $p < 0,01$ ) e também nos animais que passaram pelo SDS ( $F_{(3,32)} = 3,73$ ,  $p < 0,01$ ). No caso dos animais estressados, o URB597 promoveu efeito ansiolítico que não foi observado após o tratamento prévio com a Rapamicina.



**Figura 3.** Tempo de latência no teste do NSF em animais que receberam rapamicina previamente ao tratamento de veículo ou URB597 nas condições controle ou de SDS crônico. As barras representam a média +/- erro padrão da média. \*p < 0,01 Rapamicina-Veic e Rapamicina-URB – Veic-Veic e Veic-URB (Duncan-controles), & p< 0.05, Veic-URB – Rapamicina-Veic e Rapamicina-URB (Duncan- SDS). N= 9 por grupo respectivamente.

#### 4.3 O PAPEL DO RECEPTOR CB<sub>1</sub> NOS EFEITOS COMPORTAMENTAIS DO URB597 NÃO FOI ELUCIDADO EM ANIMAIS QUE FORAM SUBMETIDOS A MUDANÇA NA QUALIDADE DA RAÇÃO NOS BIOTÉRIOS DO CAMPUS DA USP RIBEIRÃO PRETO.

Embora representado na **Figura 4**, o experimento com o composto AM251 foi conduzido em animais que receberam a ração agromix no ano de 2018. Os resultados mostram como a modificação do alimento oferecido a todos os animais experimentais do campus de Ribeirão Preto afetou as respostas comportamentais de fármacos. Optamos por inserir os resultados nessa dissertação para deixar registrado o impacto negativo da qualidade da alimentação em animais de laboratório. No entanto, nenhuma conclusão sobre a participação dos receptores CB<sub>1</sub> nos efeitos do SDS e do tratamento com o URB597 pode ser elaborada.

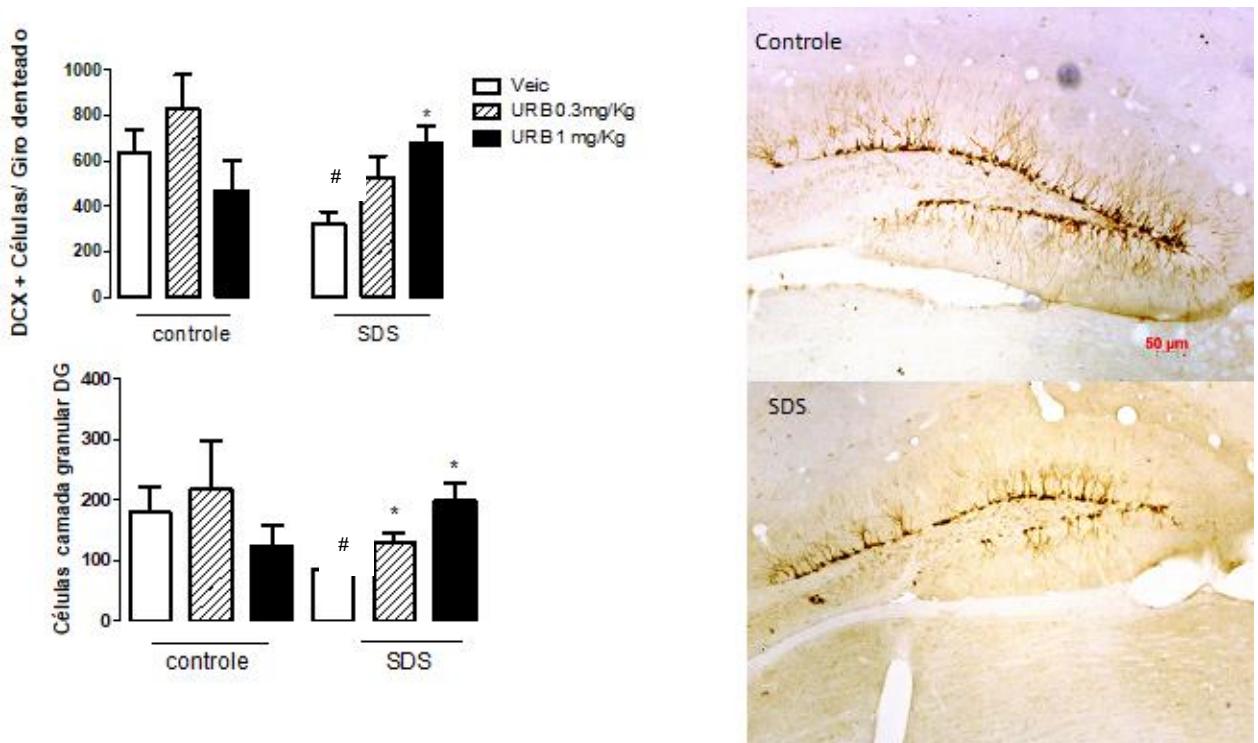


**Figura 4.** Animais controles ou submetidos ao SDS e tratados com veículo com diferentes doses de URB597 e testados no NSF. As barras representam a média +/- erro padrão da média. N= 3/grupo.

#### 4.4 O URB597 PROMOVE O AUMENTO NO NÚMERO ABSOLUTO E DE MIGRATÓRIAS DE NEURÔNIOS IMATUROS DOUBLECORTIN POSITIVOS NO GIRO DENTEADO DO HIPOCAMPO.

Os efeitos do SDS e do tratamento com doses crescentes de URB597 sobre a população de neurônios imaturos Doublecortin positivos podem ser vistos na **Figura 5**. A análise ANOVA de duas vias sugere que o protocolo de SDS reduz o número de células DCX positivas ( $F_{(1,21)}= 3,4$ ,  $p<0.01$ ), mas não sua migração no giro denteado do hipocampo ( $F_{(1,21)}= 1,2$ ,  $p= ns$ ). Da mesma forma, a ANOVA de duas vias indicou que existe efeito dos tratamentos tanto no número ( $F_{(1,21)}= 3,42$   $p=0.05$ ) como na migração ( $F_{(1,21)}= 3,7$ ,  $p<0.05$ ) de células DCX no giro denteado. Não foi detectado em nenhum dos parâmetros o efeito da interação entre os fatores. A análise dos grupos na condição de estresse, sugere que o tratamento com a dose de 1mg/Kg de URB597 é capaz de aumentar o número de células DCX positivas no hipocampo ( $F_{(2,15)}= 6,5$ ,  $p<0.01$ - ANOVA uma via), enquanto as duas doses testadas de URB597 são capazes

de, nos animais submetidos ao SDS, de aumentar o número e células migrando no giro denteado do hipocampo ( $F_{(2,15)}= 8,3$ ,  $p<0.01$ ).

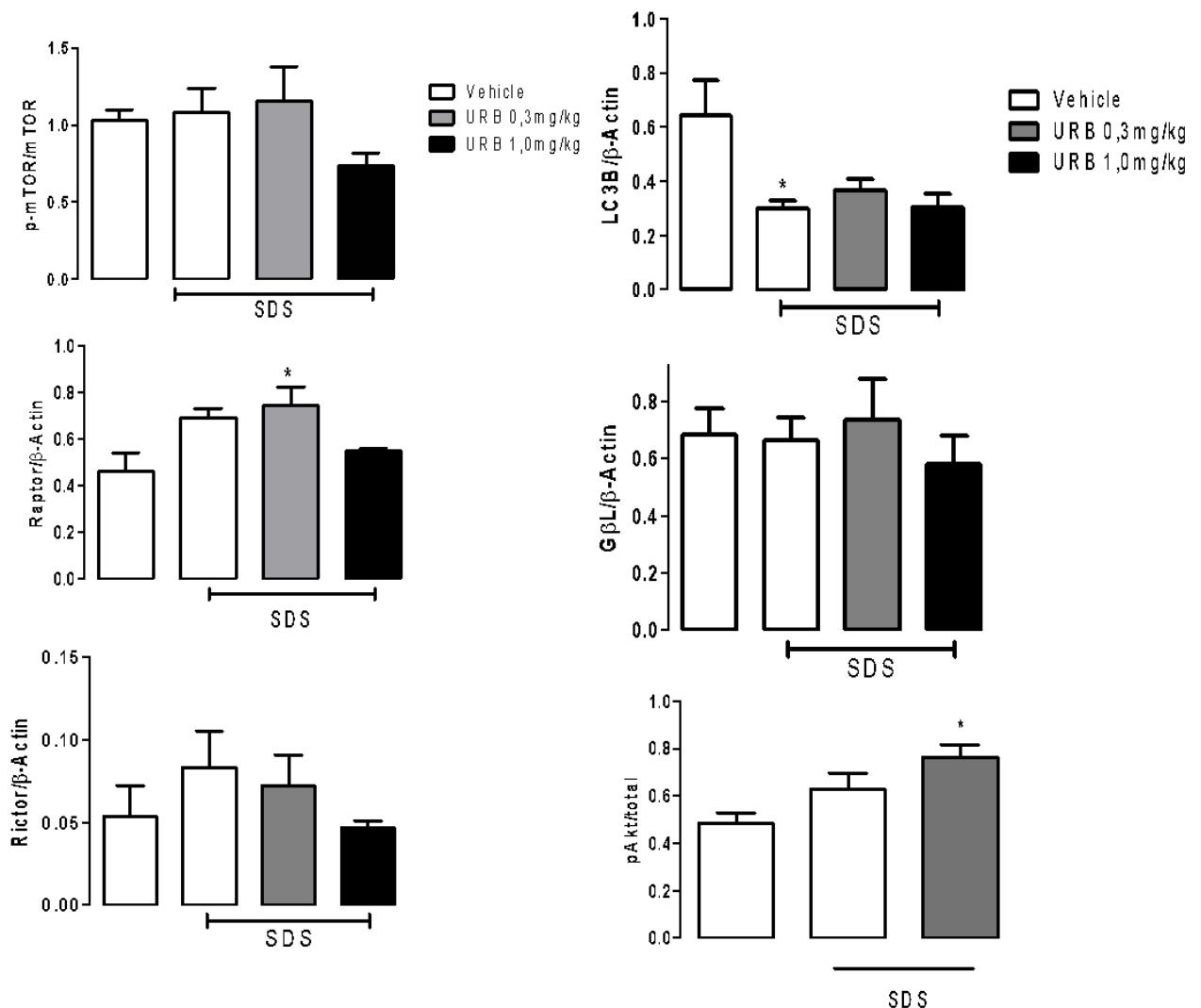


**Figura 5.** Quantificação do número total e das células em migração no giro denteado do hipocampo de camundongos submetidos ou não ao SDS e tratados com veículo ou doses crescentes de URB597. Painel superior esquerdo, número total de células DCX positivas; inferior esquerdo, células migrando e com corpos celulares na camada granular do giro denteado. Painel direito figuras representativas da imunomarcação por DAB de células DCX positivas no giro denteado do hipocampo. Setas indicam células em processo de migração. Fotografias tirados no aumento de 100X em microscópio Olympus. Barra escala 50µm. As barras representam a média +/- erro padrão da média. \* indicam diferença dos grupos SDS-veículos e # indicam diferença do grupo controle-veículo. N=2,4,3,6,6,6 respectivamente.

#### 4.5 O SDS E O TRATAMENTO COM URB597 INDUZEM MODIFICAÇÕES NA VIA AKT/mTOR E NA EXPRESSÃO DO FLUXO AUTOFÁGICO.

Na **Figura 6** observamos o padrão de expressão de proteínas da via Akt/mTOR e da proteína LC3b. Observamos que embora o estresse ou os tratamentos não

tenham alterado o sítio de fosforilação Ser2448, sítio da Rapamicina, o tratamento com URB597 na dose de 0.3 mg/Kg foi capaz de aumentar a expressão da subunidade regulatória mTORC1, Raptor ( $F_{(3,17)} = 4.1$ ,  $p < 0.05$ ). Nenhum efeito foi observado na expressão de Rictor, o modulador mTORC2 ou no regulador positivo da via sensível a Rapamicina. O tratamento com a dose de URB597 também foi capaz de aumentar a fosforilação no resíduo de serina 473 ( $F_{(2,6)} = 6.2$ ,  $p < 0.05$ ). No caso da proteína marcadora de fluxo autofágico, LC3b, o regime de SDS foi capaz de reduzir o fluxo autofágico, efeito não resgatado por nenhuma das doses de URB597 ( $F_{(3,17)} = 3.9$ ,  $p < 0.05$ ).



**Figura 6.** Análise da expressão proteica por WB da via Akt/mTOR e do fluxo autófágico. Painel esquerdo: superior, expressão da isoforma fosforilada de mTOR no resíduo Ser 2448; intermediário, Raptor, inferior Rictor. Painel direito: superior LC3b, intermediário, G $\beta$ L e, inferior, pAKT. Os dados foram normalizados por beta-actina ou pelas formas totais de mTOR e AKT. As barras representam a média +/- erro padrão da média. \* indicam diferença do grupo Veic-controle. N= 6,6,6 e 3 respectivamente. Para os dados da Akt n= 3/grupo. Imagens das membranas no ANEXO I.

## **5 DISCUSSÃO**

Os resultados do teste NSF sugerem que, como observado por outros grupos, o paradigma de estresse crônico por derrota social (SDS) induz efeitos do tipo ansiogênico em camundongos C57BL/6, visto que animais submetidos ao paradigma demonstram um aumento da latência para se alimentar no ambiente novo (VENZALA et al., 2012). Entretanto, no trabalho de Venzala e colaboradores (2012) os autores sugerem que o SDS exerce efeitos ansiogênicos nos animais submetidos ao teste NSF. Porém, é importante ressaltar que foi aferida apenas a latência da primeira aproximação do animal a zona que a comida está exposta e o tempo que o animal permanece na área. Os animais que passaram pelo SDS apresentaram um aumento na latência para a primeira aproximação à comida quando comparados aos animais não estressados, apresentando ainda uma diminuição do tempo de permanência na área quando comparado com os animais não estressados. Esse mesmo grupo também corroborou os efeitos no comportamento do tipo ansioso no Teste do Labirinto em Cruz Elevado (LCE), um teste comportamental robusto para ansiedade baseado na etiologia dos roedores que evitam locais abertos e elevados. O SDS diminuiu o tempo que os animais permaneceram nos braços abertos do LCE quando comparados aos animais não estressados. Iñiguez e colaboradores (2014) também reportou uma diminuição do tempo que os animais, submetidos ao SDS, permaneceram nos braços abertos do LCE quando comparados aos animais não estressados (IÑIGUEZ et al., 2014). Porém, o autor utilizou animais com 5-6 semanas de idade, enquanto no presente trabalho e Venzala e colaboradores (2012) foram utilizados animais com 10-12 semanas de idade (VENZALA et al., 2012, 2013).

O modelo de SDS apresenta um problema quando se trata da susceptibilidade do animal frente ao estresse, visto que nossos resultados sugerem que a intensidade do efeito comportamental do tipo ansioso, exercida pelo paradigma, é diferente entre os blocos (Figura 1). Brachman e colaboradores (2016) utilizaram o SDS como modelo de estresse crônico e não encontraram diferença no tempo de latência no NSF entre animais estressados e não estressados (BRACHMAN et al., 2016). Han e colaboradores (2014) reportaram que a resiliência ao SDS está correlacionada a uma maior interação social entre membros da mesma espécie e que até as condições climáticas têm influência, visto que o grupo observou que os animais são menos suscetíveis aos efeitos do SDS no verão (HAN et al., 2014). Portanto, é de grande valia estabelecer critérios, como a divisão de animais resilientes e não resilientes, para um melhor refinamento do nosso modelo de SDS e assim, garantir que as respostas comportamentais relacionadas ao estresse sejam mais consistentes entre os experimentos. Embora em nossas condições, devido ao sistema de distribuição dos animais em Ribeirão Preto, é improvável que os testes de interação social utilizados para determinar resiliência sejam robustos. Isso porque experiências prévias estressoras, tais como o cuidado materno ou as relações na caixa-viveiro (em nossas condições machos de diferentes ninhadas são colocados juntos na mesma caixa-viveiro com mudanças constantes no número de animais na caixa) não são registradas no biotério do qual os animais são provenientes.

Nas condições de nosso SDS, o tratamento com URB597 (0,3 mg/kg) preveniu os efeitos comportamentais causados pelo SDS, visto que a latência para o animal se alimentar no NSF diminuiu quando comparados ao grupo estressado controle. Entretanto, a dose de 1mg/kg de URB597 exerceu efeito contrário nos animais não estressados, aumentando o tempo de latência comparado com o grupo veículo não

estressado. Por outro lado, não observamos nenhum efeito no teste do nado forçado, sugerindo que em nosso protocolo o tratamento repetido com o URB597 produz efeitos ansiolíticos, mas não antidepressivos.

Os endocanabinoides participam da regulação da resposta ao estresse e também dos efeitos exercidos pelo mesmo no comportamento como, por exemplo, do tipo ansioso (MORENA et al., 2016). Estudos prévios sugerem que a deleção gênica da FAAH em camundongos C57BL6J, enzima responsável pela hidrólise da anandamida, aumenta o tempo despendido pelos animais nos braços abertos no LCE e esse efeito é revertido pelo tratamento com rimonabant, um antagonista de receptores CB<sub>1</sub> (BAMBICO et al., 2010; MOREIRA; CRIPPA, 2009; MOREIRA; GRIEB; LUTZ, 2009). Quando tratados com Rimonabant os animais FAAH-/- apresentaram um aumento no tempo de latência no teste NSF quando comparados aos animais FAAH-/- não tratados. Bambico e colaboradores (2014) reportaram que, tanto o tratamento agudo quanto crônico com o inibidor da FAAH, o URB597, foi capaz de induzir efeitos ansiolíticos. Quando tratados com uma dose aguda de 0,3 mg/kg de URB597 os animais despenderam mais tempo nos braços abertos do LCE em comparação aos animais controle. Ainda, tanto a dose aguda quanto a crônica, de 0,1 mg/kg de URB597, reduziram o tempo de latência dos animais no NSF. Entretanto, os efeitos do URB597 em animais submetidos a estressores crônicos foram pouco explorados (SCARANTE et al., 2017). Um trabalho publicado por Zhong e colaboradores (2014) verificou que o tratamento por quatro semanas com JZL184 (8 mg/kg) previne os efeitos causados pelo Estresse Crônico Imprevisível (CUS) de cinco semanas, visto que o tratamento diminuiu a latência que os animais levam para se alimentar no NSF quando comparados com o grupo controle (ZHONG et al., 2014). Campos e colaboradores (2013) demonstraram que o tratamento de duas semanas

com CBD 30 mg/kg reverteu os efeitos comportamentais causados pelo CUS da mesma duração, pois a latência dos animais tratados submetidos ao CUS diminui quando comparados aos animais estressados tratados com veículo. Este efeito foi revertido pelo tratamento com AM251, um antagonista dos receptores CB1. No caso dos efeitos ansiolíticos do CBD em animais submetidos ao CUS, foi observado um aumento nas concentrações de AEA no hipocampo dos animais tratados cronicamente com CBD (CAMPOS et al., 2013b). Isso sugere que, talvez em animais estressados cronicamente, facilitar a neuromodulação da AEA pode prevenir os efeitos do estresse. Entretanto, quando o tema é estresse e cannabinoides o efeito parece depender do tipo de estressores (SCARANTE et al., 2017).

Existem diferenças entre protocolos de estresse crônico homotípico (ou seja, protocolos baseados na exposição diária ao mesmo estímulo estressor, como o SDS) e de estresse crônico heterotípico (ou seja, protocolos baseados na exposição a diferentes estímulos estressores a cada dia, como o CUS) (COSTA-FERREIRA et al., 2016; KOPP; WICK; HERMAN, 2013). A principal diferença entre esses protocolos de estresse é a adaptabilidade. A exposição a estímulos homotípicos diariamente pode levar a um fenômeno de habituação, com redução da ativação do eixo HPA (GIROTTI et al., 2006). Por outro lado, alterações somáticas e neuroendócrinas parecem ser mais proeminentes após exposição a estímulos heterotípicos (DUARTE; PLANETA; CRESTANI, 2015). Trabalhos prévios de nosso laboratório, sugerem uma diferença entre os protocolos de SDS e CUS quanto à responsividade ao tratamento com URB597. Em animais submetidos ao SDS o tratamento por 7 dias com URB597, na dose de 0,1 mg/kg, foi capaz de reduzir significativamente a resposta de hipofagia induzida por neofobia no teste de NSF. No entanto, em camundongos submetidos ao protocolo de CUS, a mesma dose de URB597 não foi capaz de alterar

significativamente a resposta de animais estressados após 7 dias de tratamento (SCARANTE et al., 2018). Essa discrepância dos efeitos do URB597 pode estar relacionada à diferença entre os efeitos de estresses homo ou heterotípicos, no que diz respeito a sinalização endocanabinoide. Hill e colaboradores (2010) mostraram que ratos submetidos ao estresse repetido de restrição por 9 dias apresentaram níveis de AEA significativamente reduzidos no hipocampo e córtex pré-frontal. Essa redução nos níveis de AEA é, inclusive, importante para o fenômeno de habituação do eixo HPA (HILL et al., 2010; PATEL; HILLARD, 2008). Em protocolos de estresse heterotípico, entretanto, estudos indicam que não há uma alteração dos níveis de AEA nessas mesmas regiões cerebrais (BORTOLATO et al., 2007; LOMAZZO et al., 2015).

A facilitação das ações da AEA também parece ser importante para controlar os efeitos de longo prazo promovidas por situações “traumáticas” em animais de laboratório. Morena e colaboradores (2018) sugerem que o URB597 (0.1 mg/kg) induziu a melhora da performance na tarefa de extinção de memórias aversivas, restaurando o comportamento social desses animais via ação indireta nos receptores CB<sub>1</sub> (MORENA et al., 2018). Na mesma direção, o grupo liderado pelo Professor Akirav, sugere que facilitar as ações da AEA em circuitos cerebrais envolvendo o córtex pré-frontal e a amígdala basolateral, melhorando as consequências do estresse nas performances dos animais em testes preditivos de atividade ansiolítica (FIDELMAN et al., 2018; SEGEV et al., 2018).

Os estudos relacionados com os possíveis mecanismos envolvidos nos efeitos do URB597, em animais submetidos aos SDS, apresentados no presente trabalho são inconclusivos. No caso da participação dos receptores CB<sub>1</sub>, um problema com a troca da ração dos animais no ano de 2018, no Campus USP de Ribeirão Preto, afetou todas as respostas comportamentais dos animais. A ração apresentada aos animais

durante esse período apresentava uma deficiência em vitaminas e ácidos graxos, afetando sobremaneira, entre outros sistemas de neurotransmissores e neuromoduladores, o sistema endocanabinoide (MACCARRONE et al., 2010). O teste utilizado em nosso estudo para avaliar os efeitos do estresse também é influenciado pelo estado nutricional dos animais. Em condições de redução de alimento, roedores como poupadões de energia, possuem performance reduzida de busca de alimentos no NSF (MOSIENKO et al., 2012). Optamos por não suprimir a apresentação dos dados para fomentar a discussão sobre como a padronização e caracterização dos animais de laboratório podem modificar completamente as respostas comportamentais dos animais e, como consequência, os efeitos de fármacos.

No caso dos efeitos da rapamicina em atenuar os efeitos ansiolíticos do URB597, em animais submetidos ao SDS, temos algumas hipóteses que permanecem a ser testadas. A dose escolhida da rapamicina foi baseada em trabalhos prévios que a utilizaram em tratamentos agudos (LIMA et al., 2017) ou repetidos (FOGAÇA, 2016). Entretanto, no modelo do SDS, a mesma dose promoveu efeitos ansiogênicos em condições controle ou de SDS. Dessa forma, embora tenhamos observado a ausência de efeitos do URB597 no SDS quando os animais eram tratados previamente com rapamicina, fica difícil dizer se este efeito é realmente farmacológico.

Os nossos dados sobre a expressão de proteínas relacionadas a via Akt/mTOR reforçam a ideia de que, os efeitos do URB597 antagonizados pela rapamicina (pelo mesmo mecanismo) sejam realmente inconclusivos. A rapamicina é um inibidor de um dos sítios de fosforilação (Serina 2448) da mTOR. Nossos resultados de western blot sugerem que, nos animais SDS, o URB597 não altera a fosforilação do sítio ser2448 (da Rapamicina). Entretanto, nossos dados com a expressão de pAkt e Raptor nos sugere que talvez o URB597 esteja atuando em outros sítios de fosforilação da mTOR,

diferente do da Rapamicina, tais como o ser1261 (ACOSTA-JAQUEZ et al., 2009).

Essa hipótese aplicaria-se apenas ao hipocampo, tendo em vista que não avaliamos outras áreas cerebrais.

No caso do fluxo autofágico, nossos dados sugerem que o SDS reduz a autofagia (evidenciada pela redução dos níveis de LC3b no hipocampo). A autofagia é um processo catabólico celular que, no sistema nervoso central, tem sido relacionado com o aumento da sobrevivência celular. Em doenças neurodegenerativas, como a Doença de Huntington, os processos autofágicos estão diminuídos e a hipótese é de que isso contribua para os processos neurodegenerativos (FUJIKAKE; SHIN; SHIMIZU, 2018; MENZIES et al., 2017). Dados ainda não publicados de nosso laboratório sugerem que, em animais submetidos ao CUS, a redução dos níveis de LC3b seja revertido pelo tratamento com o CBD (FOGACA, 2016). O mesmo parece não ser verdade para o URB597. Isso pode ser devido aos mecanismos distintos do CBD e URB597, ou ainda porque o paradigma de estresse influencie a via autofágica. Essa possibilidade permanece por ser testada.

Por fim, nossos dados sugerem que o tratamento com URB597 previne os efeitos do estresse sobre o número e a migração de neurônios imaturos no giro denteadoo do hipocampo. A doublecortina (DCX) é uma proteína associada a microtúbulos que é essencial para a migração de neurônios na fase embrionária, mas também nos nichos neurogênicos do cérebro adulto (AYANLAJA et al., 2017). Neurônios imaturos que expressam DCX possuem baixo limiar de LTP quando comparados a neurônios maduros granulares do giro denteadoo (KEMPERMANN et al., 2018). Nesse sentido, podemos especular que em um contexto de aumento de expressão de neurônios DCX positivos, a plasticidade hipocampal poderia ser

facilitada. Trabalhos de outros grupos e de nosso grupo sugerem que o estresse reduz o número de células DCX no hipocampo (CAMPOS et al., 2013b; GOULD et al., 1998). Diversos trabalhos sugerem que os canabinoides podem modular a neurogênese adulta e embrionária (DE OLIVEIRA et al., 2019). A deleção gênica da enzima FAAH resulta na facilitação de processos neurogênicos (AGUADO et al., 2005, 2007). Ainda, o aumento das concentrações de AEA no hipocampo são correlacionados com os efeitos pró-neurogênicos do CBD. Embora somente a marcação para DCX seja suficiente para inferir que o URB597 esteja facilitando ou prevenindo os efeitos do estresse em animais submetidos ao SDS, podemos hipotetizar que o tratamento esteja restaurando a capacidade dessa estrutura. Curiosamente, observamos que a dose de 1mg/Kg de URB597, que não promoveu efeito ansiolítico no modelo do NSF, foi mais efetiva em promover as ações sobre a expressão e a migração de células DCX positivas. Isso pode sugerir que no modelo do SDS a clássica associação entre o aumento da neurogênese hipocampal e os efeitos antidepressivos ansiolíticos, geralmente observados no modelo do CUS (SANTARELLI et al., 2003), possam ser dicotomizados.

## **6 CONCLUSÃO**

Os resultados encontrados no presente estudo indicaram que no modelo do SDS o URB597, de maneira dose e condição dependente, induz efeitos ansiolíticos, mas não antidepressivos. Esse efeito parece ser atenuado pela rapamicina, mas independente de mecanismos autofágicos.

Embora evidenciado neste trabalho, a participação da via Akt/mTOR e de mecanismos neurogênicos necessitam ser melhor investigados. Além disso, a generalidade dessa resposta com outros testes e modelos comportamentais permanece por ser testada.

## 7 REFERÊNCIAS

- CLAUD BERNARD, JEAN-BAPTISTE DUMAS, PAUL BERT. **La science experimentale.** 1978
- DUARTE, J. O. Estudo do efeito do estresse crônico sobre a função cardiovascular em ratos adolescentes e adultos. 2016. 105p. Tese (Doutorado em ciências fisiológicas) UFSCAR / UNESP, Araraquara, 2016.
- FOGAÇA, M.V. **Mecanismos envolvidos nos efeitos pró-neurogênicos e comportamentais da administração repetida do canabidiol em camundongos submetidos ao estresse crônico variável.** 2015. 100p. Tese (Doutorado em ciências biológicas - farmacologia) - Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2015.
- SCARANTE, F.F. **Efeitos comportamentais e neuroplásticos da combinação de escitalopram e cannabinoides.** 2018. 180p. Dissertação (mestrado em ciências biológicas - farmacologia) - Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2018.
- ABELAIRA, H. M. et al. The role of mTOR in depression and antidepressant responses. **Life Sciences**, v. 101, n. 1–2, p. 10–14, 17 Apr. 2014.
- ACOSTA-JAQUEZ, H. A. et al. Site-specific mTOR phosphorylation promotes mTORC1-mediated signaling and cell growth. **Molecular and Cellular Biology**, v. 29, n. 15, p. 4308–4324, Aug. 2009.
- AGUADO, T. et al. The endocannabinoid system drives neural progenitor proliferation. **The FASEB Journal**, v. 19, n. 12, p. 1704–1706, Oct. 2005.
- AGUADO, T. et al. The CB1 cannabinoid receptor mediates excitotoxicity-induced neural progenitor proliferation and neurogenesis. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 282, n. 33, p. 23892–23898, 17 Aug. 2007.
- ANTONIAZZI, A. S.; DELL'AGLIO, D. D.; BANDEIRA, D. R. O conceito de coping: uma revisão teórica. **Estudos de Psicologia (Natal)**, v. 3, n. 2, p. 273–294, Dec. 1998.
- AYANLAJA, A. A. et al. Distinct features of doublecortin as a marker of neuronal migration and its implications in cancer cell mobility. **Frontiers in Molecular Neuroscience**, v. 10, p. 199, 28 Jun. 2017.
- AZAD, S. C. et al. Circuitry for associative plasticity in the amygdala involves endocannabinoid signaling. **The Journal of Neuroscience**, v. 24, n. 44, p. 9953–9961, 3 Nov. 2004.
- BALSEVICH, G. et al. Stress-responsive FKBP51 regulates AKT2-AS160 signaling and metabolic function. **Nature Communications**, v. 8, n. 1, p. 1725, 23 Nov. 2017.
- BAMBICO, F. R. et al. Genetic deletion of fatty acid amide hydrolase alters emotional

- behavior and serotonergic transmission in the dorsal raphe, prefrontal cortex, and hippocampus. **Neuropsychopharmacology**, v. 35, n. 10, p. 2083–2100, Sep. 2010.
- BOCKAERT, J.; MARIN, P. mTOR in Brain Physiology and Pathologies. **Physiological Reviews**, v. 95, n. 4, p. 1157–1187, Oct. 2015.
- BORTOLATO, M. et al. Antidepressant-like activity of the fatty acid amide hydrolase inhibitor URB597 in a rat model of chronic mild stress. **Biological Psychiatry**, v. 62, n. 10, p. 1103–1110, 15 Nov. 2007.
- BOYA, P.; MELLÉN, M. A.; DE LA ROSA, E. J. How autophagy is related to programmed cell death during the development of the nervous system. **Biochemical Society Transactions**, v. 36, n. Pt 5, p. 813–817, Oct. 2008.
- BRACHMAN, R. A. et al. Ketamine as a Prophylactic Against Stress-Induced Depressive-like Behavior. **Biological Psychiatry**, v. 79, n. 9, p. 776–786, 1 May 2016.
- BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, v. 72, p. 248–254, 7 May 1976.
- BRUSCO, A. et al. Ultrastructural localization of neuronal brain CB2 cannabinoid receptors. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 1139, p. 450–457, Oct. 2008a.
- BRUSCO, A. et al. Postsynaptic localization of CB2 cannabinoid receptors in the rat hippocampus. **Synapse**, v. 62, n. 12, p. 944–949, Dec. 2008b.
- CAMPOS, A. C. et al. Facilitation of endocannabinoid effects in the ventral hippocampus modulates anxiety-like behaviors depending on previous stress experience. **Neuroscience**, v. 167, n. 2, p. 238–246, 5 May 2010.
- CAMPOS, A. C. et al. Animal models of anxiety disorders and stress. **Revista brasileira de psiquiatria (Sao Paulo, Brazil : 1999)**, v. 35 Suppl 2, p. S101-11, 2013a.
- CAMPOS, A. C. et al. The anxiolytic effect of cannabidiol on chronically stressed mice depends on hippocampal neurogenesis: involvement of the endocannabinoid system. **The International Journal of Neuropsychopharmacology**, v. 16, n. 6, p. 1407–1419, Jul. 2013b.
- CANNON, B. The effects of progressive sympathectomy on blood pressure. **American Journal of Physiology-Legacy Content**, v. 97, n. 4, p. 592–596, Jul. 1931.
- CANNON, W. B. ORGANIZATION FOR PHYSIOLOGICAL HOMEOSTASIS. **Physiological Reviews**, v. 9, n. 3, p. 399–431, Jul. 1929.
- CHANDRAN, A et al. Reduced phosphorylation of the mTOR signaling pathway components in the amygdala of rats exposed to chronic stress. **Progress in neuropsychopharmacology & biological psychiatry**, v. 40, p. 240-5, Jan. 2013.

- CHEN, C.C.; HUANG, C.C.; HSU, K.S. Chronic social stress affects synaptic maturation of newly generated neurons in the adult mouse dentate gyrus. **The International Journal of Neuropsychopharmacology**, v. 19, n. 3, p. pyv097, 7 Sep. 2015.
- CHROUSOS, G. P. Stress and disorders of the stress system. **Nature Reviews. Endocrinology**, v. 5, n. 7, p. 374–381, Jul. 2009.
- COSTA-FERREIRA, W. et al. Involvement of Type 1 Angiotensin II Receptor (AT1) in Cardiovascular Changes Induced by Chronic Emotional Stress: Comparison between Homotypic and Heterotypic Stressors. **Frontiers in pharmacology**, v. 7, p. 262, 18 Aug. 2016.
- COSTA-MATTIOLI, M.; MONTEGGIA, L. M. mTOR complexes in neurodevelopmental and neuropsychiatric disorders. **Nature Neuroscience**, v. 16, n. 11, p. 1537–1543, Nov. 2013.
- CRAVATT, B. F. et al. Molecular characterization of an enzyme that degrades neuromodulatory fatty-acid amides. **Nature**, v. 384, n. 6604, p. 83–87, 7 Nov. 1996.
- DE KLOET, E. R. Brain Corticosteroid Receptor Balance in Health and Disease. **Endocrine Reviews**, v. 19, n. 3, p. 269–301, 1 Jun. 1998.
- DE OLIVEIRA, R. W. et al. Cannabinoid signalling in embryonic and adult neurogenesis: possible implications for psychiatric and neurological disorders. **Acta neuropsychiatrica**, v. 31, n. 1, p. 1–16, Feb. 2019.
- DEVANE, W. A. et al. Isolation and structure of a brain constituent that binds to the cannabinoid receptor. **Science**, v. 258, n. 5090, p. 1946–1949, 18 Dec. 1992.
- DINH, T. P.; FREUND, T. F.; PIOMELLI, D. A role for monoglyceride lipase in 2-arachidonoylglycerol inactivation. **Chemistry and Physics of Lipids**, v. 121, n. 1–2, p. 149–158, 31 Dec. 2002.
- DULAWA, S. C. et al. Effects of chronic fluoxetine in animal models of anxiety and depression. **Neuropsychopharmacology**, v. 29, n. 7, p. 1321–1330, Jul. 2004.
- EISENBERG-LERNER, A.; KIMCHI, A. PKD at the crossroads of necrosis and autophagy. **Autophagy**, v. 8, n. 3, p. 433–434, Mar. 2012.
- FIDELMAN, S. et al. Chronic treatment with URB597 ameliorates post-stress symptoms in a rat model of PTSD. **European Neuropsychopharmacology**, v. 28, n. 5, p. 630–642, 5 Mar. 2018.
- FILOMENI, G.; DE ZIO, D.; CECCONI, F. Oxidative stress and autophagy: the clash between damage and metabolic needs. **Cell Death and Differentiation**, v. 22, n. 3, p. 377–388, Mar. 2015.
- FISHWICK, K. J. et al. Initiation of neuronal differentiation requires PI3-kinase/TOR signalling in the vertebrate neural tube. **Developmental Biology**, v. 338, n. 2, p. 215–225, 15 Feb. 2010.

- FOGAÇA, M. V. et al. Effects of intra-prelimbic prefrontal cortex injection of cannabidiol on anxiety-like behavior: involvement of 5HT1A receptors and previous stressful experience. **European Neuropsychopharmacology**, v. 24, n. 3, p. 410–419, Mar. 2014.
- FOGAÇA, M. V. et al. The anxiolytic effects of cannabidiol in chronically stressed mice are mediated by the endocannabinoid system: Role of neurogenesis and dendritic remodeling. **Neuropharmacology**, v. 135, p. 22–33, 3 Mar. 2018.
- FUJIKAKE, N.; SHIN, M.; SHIMIZU, S. Association between autophagy and neurodegenerative diseases. **Frontiers in Neuroscience**, v. 12, p. 255, 22 May 2018.
- GAONI, Y.; MECHOULAM, R. Isolation, Structure, and Partial Synthesis of an Active Constituent of Hashish. **Journal of the American Chemical Society**, v. 86, n. 8, p. 1646–1647, Apr. 1964.
- GARCÍA-GUTIÉRREZ, M. S. et al. Depression-resistant endophenotype in mice overexpressing cannabinoid CB(2) receptors. **British Journal of Pharmacology**, v. 160, n. 7, p. 1773–1784, Aug. 2010.
- GERDEMAN, G. L.; RONESI, J.; LOVINGER, D. M. Postsynaptic endocannabinoid release is critical to long-term depression in the striatum. **Nature Neuroscience**, v. 5, n. 5, p. 446–451, May 2002.
- GIROTTI, M. et al. Habituation to repeated restraint stress is associated with lack of stress-induced c-fos expression in primary sensory processing areas of the rat brain. **Neuroscience**, v. 138, n. 4, p. 1067–1081, 23 Jan. 2006.
- GOLDSTEIN, D. S.; KOPIN, I. J. Evolution of concepts of stress. **Stress (Amsterdam, Netherlands)**, v. 10, n. 2, p. 109–120, Jun. 2007.
- GOULD, E. et al. Proliferation of granule cell precursors in the dentate gyrus of adult monkeys is diminished by stress. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 95, n. 6, p. 3168–3171, 17 Mar. 1998.
- HAN, J. et al. Mammalian target of rapamycin (mTOR) is involved in the neuronal differentiation of neural progenitors induced by insulin. **Molecular and Cellular Neurosciences**, v. 39, n. 1, p. 118–124, Sep. 2008.
- HAN, Q. et al. Resiliency to social defeat stress relates to the inter-strain social interaction and is influenced by season variation. **Neuroscience Letters**, v. 561, p. 13–17, 21 Feb. 2014.
- HARA, T. et al. Suppression of basal autophagy in neural cells causes neurodegenerative disease in mice. **Nature**, v. 441, n. 7095, p. 885–889, 15 Jun. 2006.
- HILL, M. N. et al. Regional alterations in the endocannabinoid system in an animal model of depression: effects of concurrent antidepressant treatment. **Journal of Neurochemistry**, v. 106, n. 6, p. 2322–2336, Sep. 2008.

- HILL, M. N. et al. Endogenous cannabinoid signaling is essential for stress adaptation. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 107, n. 20, p. 9406–9411, 18 May 2010.
- HILL, M. N.; GORZALKA, B. B. Pharmacological enhancement of cannabinoid CB1 receptor activity elicits an antidepressant-like response in the rat forced swim test. **European Neuropsychopharmacology**, v. 15, n. 6, p. 593–599, Dec. 2005.
- HILLARD, C. J. Stress regulates endocannabinoid-CB1 receptor signaling. **Seminars in Immunology**, v. 26, n. 5, p. 380–388, Oct. 2014.
- HILLARD, C. J.; WEINLANDER, K. M.; STUHR, K. L. Contributions of endocannabinoid signaling to psychiatric disorders in humans: genetic and biochemical evidence. **Neuroscience**, v. 204, p. 207–229, 1 Mar. 2012.
- HOWLETT, A. C. Cannabinoid inhibition of adenylate cyclase. Biochemistry of the response in neuroblastoma cell membranes. **Molecular Pharmacology**, v. 27, n. 4, p. 429–436, Apr. 1985.
- HOWLETT, A. C.; QUALY, J. M.; KHACHATRIAN, L. L. Involvement of Gi in the inhibition of adenylate cyclase by cannabimimetic drugs. **Molecular Pharmacology**, v. 29, n. 3, p. 307–313, Mar. 1986.
- ÍÑIGUEZ, S. D. et al. Social defeat stress induces a depression-like phenotype in adolescent male c57BL/6 mice. **Stress (Amsterdam, Netherlands)**, v. 17, n. 3, p. 247–255, May 2014.
- IZUMI, Y.; ZORUMSKI, C. F. NMDA receptors, mGluR5, and endocannabinoids are involved in a cascade leading to hippocampal long-term depression. **Neuropsychopharmacology**, v. 37, n. 3, p. 609–617, Feb. 2012.
- JERNIGAN, C. S. et al. The mTOR signaling pathway in the prefrontal cortex is compromised in major depressive disorder. **Progress in Neuro-Psychopharmacology & Biological Psychiatry**, v. 35, n. 7, p. 1774–1779, 15 Aug. 2011.
- JURUENA, M. F. Early-life stress and HPA axis trigger recurrent adulthood depression. **Epilepsy & Behavior**, v. 38, p. 148–159, Sep. 2014.
- KEMPERMANN, G. et al. Human adult neurogenesis: evidence and remaining questions. **Cell Stem Cell**, v. 23, n. 1, p. 25–30, 5 Jul. 2018.
- KIM, S. R. et al. Dopaminergic pathway reconstruction by Akt/Rheb-induced axon regeneration. **Annals of Neurology**, v. 70, n. 1, p. 110–120, Jul. 2011.
- KIM, S. R. et al. AAV transduction of dopamine neurons with constitutively active Rheb protects from neurodegeneration and mediates axon regrowth. **Molecular Therapy**, v. 20, n. 2, p. 275–286, Feb. 2012.
- KOMATSU, M. et al. Loss of autophagy in the central nervous system causes neurodegeneration in mice. **Nature**, v. 441, n. 7095, p. 880–884, 15 Jun. 2006.

- KOPP, B. L.; WICK, D.; HERMAN, J. P. Differential effects of homotypic vs. heterotypic chronic stress regimens on microglial activation in the prefrontal cortex. **Physiology & Behavior**, v. 122, p. 246–252, 2 Oct. 2013.
- KREITZER, A. C.; REGEHR, W. G. Retrograde inhibition of presynaptic calcium influx by endogenous cannabinoids at excitatory synapses onto Purkinje cells. **Neuron**, v. 29, n. 3, p. 717–727, Mar. 2001.
- KRISHNAN, V. et al. Molecular adaptations underlying susceptibility and resistance to social defeat in brain reward regions. **Cell**, v. 131, n. 2, p. 391–404, 19 Oct. 2007.
- KUMA, A. et al. The role of autophagy during the early neonatal starvation period. **Nature**, v. 432, n. 7020, p. 1032–1036, 23 Dec. 2004.
- LAUCKNER, J. E.; HILLE, B.; MACKIE, K. The cannabinoid agonist WIN55,212-2 increases intracellular calcium via CB1 receptor coupling to Gq/11 G proteins. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 102, n. 52, p. 19144–19149, 27 Dec. 2005.
- LI, N. et al. Glutamate N-methyl-D-aspartate receptor antagonists rapidly reverse behavioral and synaptic deficits caused by chronic stress exposure. **Biological Psychiatry**, v. 69, n. 8, p. 754–761, 15 Apr. 2011.
- LI, Y.; KIM, J. CB2 Cannabinoid Receptor Knockout in Mice Impairs Contextual Long-Term Memory and Enhances Spatial Working Memory. **Neural plasticity**, v. 2016, p. 9817089, 2016.
- LI, Y.; KIM, J. Distinct roles of neuronal and microglial CB2 cannabinoid receptors in the mouse hippocampus. **Neuroscience**, v. 363, p. 11–25, 5 Nov. 2017.
- LIMA, I. V. DE A. et al. Antidepressant-like effect of valproic acid-Possible involvement of PI3K/Akt/mTOR pathway. **Behavioural Brain Research**, v. 329, p. 166–171, 30 Jun. 2017.
- LIPTON, J. O.; SAHIN, M. The neurology of mTOR. **Neuron**, v. 84, n. 2, p. 275–291, 22 Oct. 2014.
- LOMAZZO, E. et al. Therapeutic potential of inhibitors of endocannabinoid degradation for the treatment of stress-related hyperalgesia in an animal model of chronic pain. **Neuropsychopharmacology**, v. 40, n. 2, p. 488–501, Jan. 2015.
- MACCARRONE, M. et al. The endocannabinoid system and its relevance for nutrition. **Annual review of nutrition**, v. 30, p. 423–440, 21 Aug. 2010.
- MACCARRONE, M. et al. Programming of neural cells by (endo)cannabinoids: from physiological rules to emerging therapies. **Nature Reviews. Neuroscience**, v. 15, n. 12, p. 786–801, Dec. 2014.
- MACKIE, K. et al. Cannabinoids activate an inwardly rectifying potassium conductance and inhibit Q-type calcium currents in AtT20 cells transfected with rat brain cannabinoid receptor. **The Journal of Neuroscience**, v. 15, n. 10, p. 6552–6561, Oct. 1995.

- MARCO, E. M. et al. Consequences of early life stress on the expression of endocannabinoid-related genes in the rat brain. **Behavioural Pharmacology**, v. 25, n. 5–6, p. 547–556, Sep. 2014.
- MCEWEN, B. S. Stress, adaptation, and disease. Allostasis and allostatic load. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 840, p. 33–44, 1 May 1998.
- MCEWEN, B. S. Stress and hippocampal plasticity. **Annual Review of Neuroscience**, v. 22, p. 105–122, 1999.
- MCEWEN, B. S. Physiology and neurobiology of stress and adaptation: central role of the brain. **Physiological Reviews**, v. 87, n. 3, p. 873–904, Jul. 2007.
- MCEWEN, B. S. Brain on stress: how the social environment gets under the skin. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 109 Suppl 2, p. 17180–17185, 16 Oct. 2012.
- MCEWEN, B. S.; GIANAROS, P. J. Stress- and allostasis-induced brain plasticity. **Annual Review of Medicine**, v. 62, p. 431–445, 2011.
- MCEWEN, B. S.; STELLAR, E. Stress and the individual. Mechanisms leading to disease. **Archives of Internal Medicine**, v. 153, n. 18, p. 2093–2101, 27 Sep. 1993.
- MECHA, M. et al. Endocannabinoids drive the acquisition of an alternative phenotype in microglia. **Brain, Behavior, and Immunity**, v. 49, p. 233–245, Oct. 2015.
- MECHOULAM, R. et al. Identification of an endogenous 2-monoglyceride, present in canine gut, that binds to cannabinoid receptors. **Biochemical Pharmacology**, v. 50, n. 1, p. 83–90, 29 Jun. 1995.
- MECHOULAM, R.; PARKER, L. A. The endocannabinoid system and the brain. **Annual review of psychology**, v. 64, p. 21–47, 2013.
- MENZIES, F. M. et al. Autophagy and neurodegeneration: pathogenic mechanisms and therapeutic opportunities. **Neuron**, v. 93, n. 5, p. 1015–1034, 8 Mar. 2017.
- MOREIRA, F. A.; CRIPPA, J. A. S. The psychiatric side-effects of rimonabant. **Revista brasileira de psiquiatria (Sao Paulo, Brazil : 1999)**, v. 31, n. 2, p. 145–153, Jun. 2009.
- MOREIRA, F. A.; GRIEB, M.; LUTZ, B. Central side-effects of therapies based on CB1 cannabinoid receptor agonists and antagonists: focus on anxiety and depression. **Best Practice & Research. Clinical Endocrinology & Metabolism**, v. 23, n. 1, p. 133–144, Feb. 2009.
- MORENA, M. et al. Neurobiological interactions between stress and the endocannabinoid system. **Neuropsychopharmacology**, v. 41, n. 1, p. 80–102, Jan. 2016.
- MORENA, M. et al. Enhancing Endocannabinoid Neurotransmission Augments The Efficacy of Extinction Training and Ameliorates Traumatic Stress-Induced Behavioral Alterations in Rats. **Neuropsychopharmacology**, v. 43, n. 6, p. 1284–1296, 2018.

- MOSIENKO, V. et al. Exaggerated aggression and decreased anxiety in mice deficient in brain serotonin. **Translational psychiatry**, v. 2, p. e122, 29 May 2012.
- MUNRO, S.; THOMAS, K. L.; ABU-SHAAR, M. Molecular characterization of a peripheral receptor for cannabinoids. **Nature**, v. 365, n. 6441, p. 61–65, 2 Sep. 1993.
- NAVARRETE, M.; ARAQUE, A. Endocannabinoids potentiate synaptic transmission through stimulation of astrocytes. **Neuron**, v. 68, n. 1, p. 113–126, 6 Oct. 2010.
- NAVARRA-YEPES, J. et al. Oxidative stress, redox signaling, and autophagy: cell death versus survival. **Antioxidants & Redox Signaling**, v. 21, n. 1, p. 66–85, 1 Jul. 2014.
- NEMEROFF, C. B. The corticotropin-releasing factor (CRF) hypothesis of depression: new findings and new directions. **Molecular Psychiatry**, v. 1, n. 4, p. 336–342, Sep. 1996.
- NIKOLETOPOULOU, V.; PAPANDREOU, M. E.; TAVERNARAKIS, N. Autophagy in the physiology and pathology of the central nervous system. **Cell Death and Differentiation**, v. 22, n. 3, p. 398–407, Mar. 2015.
- NÚÑEZ, E. et al. Cannabinoid CB<sub>2</sub> receptors are expressed by perivascular microglial cells in the human brain: an immunohistochemical study. **Synapse**, v. 53, n. 4, p. 208–213, 15 Sep. 2004.
- OHNO-SHOSAKU, T. et al. Endocannabinoid signalling triggered by NMDA receptor-mediated calcium entry into rat hippocampal neurons. **The Journal of Physiology**, v. 584, n. Pt 2, p. 407–418, 15 Oct. 2007.
- PACHER, P.; KUNOS, G. Modulating the endocannabinoid system in human health and disease--successes and failures. **The FEBS Journal**, v. 280, n. 9, p. 1918–1943, May 2013.
- PARK, K. K. et al. Promoting axon regeneration in the adult CNS by modulation of the PTEN/mTOR pathway. **Science**, v. 322, n. 5903, p. 963–966, 7 Nov. 2008.
- PARK, S. W. et al. Differential effects of antidepressant drugs on mTOR signalling in rat hippocampal neurons. **The International Journal of Neuropsychopharmacology**, v. 17, n. 11, p. 1831–1846, Nov. 2014.
- PATEL, M. Mitochondrial dysfunction and oxidative stress: cause and consequence of epileptic seizures. **Free Radical Biology & Medicine**, v. 37, n. 12, p. 1951–1962, 15 Dec. 2004.
- PATEL, S. et al. Endocannabinoid signaling negatively modulates stress-induced activation of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis. **Endocrinology**, v. 145, n. 12, p. 5431–5438, Dec. 2004.
- PATEL, S. et al. Repeated homotypic stress elevates 2-arachidonoylglycerol levels and enhances short-term endocannabinoid signaling at inhibitory synapses in basolateral amygdala. **Neuropsychopharmacology**, v. 34, n. 13, p. 2699–2709, Dec. 2009.

- PATEL, S.; HILLARD, C. J. Adaptations in endocannabinoid signaling in response to repeated homotypic stress: a novel mechanism for stress habituation. **The European Journal of Neuroscience**, v. 27, n. 11, p. 2821–2829, Jun. 2008.
- PORSOLT, R. D. et al. Behavioural despair in rats: a new model sensitive to antidepressant treatments. **European Journal of Pharmacology**, v. 47, n. 4, p. 379–391, 15 Feb. 1978.
- POSHIVALOV, V. P. The integrity of the social hierarchy in mice following administration of psychotropic drugs. **British Journal of Pharmacology**, v. 70, n. 3, p. 367–373, Nov. 1980.
- REICH, C. G.; TAYLOR, M. E.; MCCARTHY, M. M. Differential effects of chronic unpredictable stress on hippocampal CB1 receptors in male and female rats. **Behavioural Brain Research**, v. 203, n. 2, p. 264–269, 5 Nov. 2009.
- ROBBE, D. et al. Endogenous cannabinoids mediate long-term synaptic depression in the nucleus accumbens. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 99, n. 12, p. 8384–8388, 11 Jun. 2002.
- RUBINO, T. et al. Role in anxiety behavior of the endocannabinoid system in the prefrontal cortex. **Cerebral Cortex**, v. 18, n. 6, p. 1292–1301, Jun. 2008.
- RYSKALIN, L. et al. mTOR-Related Brain Dysfunctions in Neuropsychiatric Disorders. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 19, n. 8, 30 Jul. 2018.
- SANTARELLI, L. et al. Requirement of hippocampal neurogenesis for the behavioral effects of antidepressants. **Science**, v. 301, n. 5634, p. 805–809, 8 Aug. 2003.
- SCHERMA, M. et al. The endogenous cannabinoid anandamide has effects on motivation and anxiety that are revealed by fatty acid amide hydrolase (FAAH) inhibition. **Neuropharmacology**, v. 54, n. 1, p. 129–140, Jan. 2008.
- SEGEV, A. et al. Role of endocannabinoids in the hippocampus and amygdala in emotional memory and plasticity. **Neuropsychopharmacology**, v. 43, n. 10, p. 2017–2027, 27 Jun. 2018.
- SELYE, H. The general adaptation syndrome and the diseases of adaptation. **The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism**, v. 6, p. 117–230, Feb. 1946.
- SOUSA, M. B. C. DE; SILVA, H. P. A.; GALVÃO-COELHO, N. L. Resposta ao estresse: I. Homeostase e teoria da alostase. **Estudos de Psicologia**, v. 20, n. 1, p. 1–10, 2015.
- SOUSA, N. et al. Reorganization of the morphology of hippocampal neurites and synapses after stress-induced damage correlates with behavioral improvement. **Neuroscience**, v. 97, n. 2, p. 253–266, 2000.
- STEMPEL, A. V. et al. Cannabinoid Type 2 Receptors Mediate a Cell Type-Specific Plasticity in the Hippocampus. **Neuron**, v. 90, n. 4, p. 795–809, 18 May 2016.
- STERLING, P.; EVER, J.; DICARLO, J. J. Allostasis: A New Paradigm to Explain

Arousal Pathology. 1 Jan. 1988.

STOICA, L. et al. Selective pharmacogenetic inhibition of mammalian target of Rapamycin complex I (mTORC1) blocks long-term synaptic plasticity and memory storage. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 108, n. 9, p. 3791–3796, 1 Mar. 2011.

SWAAB, D. F.; BAO, A.-M.; LUCASSEN, P. J. The stress system in the human brain in depression and neurodegeneration. **Ageing Research Reviews**, v. 4, n. 2, p. 141–194, May 2005.

TANG, S. J. et al. A rapamycin-sensitive signaling pathway contributes to long-term synaptic plasticity in the hippocampus. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 99, n. 1, p. 467–472, 8 Jan. 2002.

TAO, Y. et al. Cannabinoid receptor-2 stimulation suppresses neuroinflammation by regulating microglial M1/M2 polarization through the cAMP/PKA pathway in an experimental GMH rat model. **Brain, Behavior, and Immunity**, v. 58, p. 118–129, Nov. 2016.

VENZALA, E. et al. Chronic social defeat stress model: behavioral features, antidepressant action, and interaction with biological risk factors.

**Psychopharmacology**, v. 224, n. 2, p. 313–325, Nov. 2012.

VENZALA, E. et al. Social vs. environmental stress models of depression from a behavioural and neurochemical approach. **European Neuropsychopharmacology**, v. 23, n. 7, p. 697–708, Jul. 2013.

VYAS, S. et al. Chronic stress and glucocorticoids: from neuronal plasticity to neurodegeneration. **Neural plasticity**, v. 2016, p. 6391686, 10 Mar. 2016.

WILSON, R. I.; NICOLL, R. A. Endogenous cannabinoids mediate retrograde signalling at hippocampal synapses. **Nature**, v. 410, n. 6828, p. 588–592, 29 Mar. 2001.

XI, Y. et al. Knockout of Atg5 delays the maturation and reduces the survival of adult-generated neurons in the hippocampus. **Cell death & disease**, v. 7, p. e2127, 3 Mar. 2016.

XU, S. et al. Impact on Autophagy and Ultraviolet B Induced Responses of Treatment with the MTOR Inhibitors Rapamycin, Everolimus, Torin 1, and pp242 in Human Keratinocytes. **Oxidative medicine and cellular longevity**, v. 2017, p. 5930639, 16 Mar. 2017.

YANG, Y.-P. et al. Molecular mechanism and regulation of autophagy. **Acta Pharmacologica Sinica**, v. 26, n. 12, p. 1421–1434, Dec. 2005.

ZHONG, P. et al. Monoacylglycerol lipase inhibition blocks chronic stress-induced depressive-like behaviors via activation of mTOR signaling.

**Neuropsychopharmacology**, v. 39, n. 7, p. 1763–1776, Jun. 2014.

ZHOU, W. et al. Ketamine-induced antidepressant effects are associated with AMPA

receptors-mediated upregulation of mTOR and BDNF in rat hippocampus and prefrontal cortex. **European Psychiatry**, v. 29, n. 7, p. 419–423, Sep. 2014.

ZHU, P. J.; LOVINGER, D. M. Persistent synaptic activity produces long-lasting enhancement of endocannabinoid modulation and alters long-term synaptic plasticity. **Journal of Neurophysiology**, v. 97, n. 6, p. 4386–4389, Jun. 2007.



UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO  
FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO  
COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS



## CERTIFICADO

Certificamos que o Protocolo intitulado "*O papel da autofagia nos processos comportamentais desencadeados pelo tratamento crônico com canabinóides durante situações de estresse crônico*", registrado com o número 144/2016, sob a responsabilidade da **Profa. Dra. Alline Cristina de Campos**, envolvendo a produção, manutenção ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto humanos) para fins de pesquisa científica, encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794 de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899 de 15 de julho de 2009 e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), e foi **APROVADO** pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo em reunião de 30 de janeiro de 2017.

Este Protocolo prevê a utilização de 60 camundongos Swiss machos pesando 50g e 340 camundongos C57Bl/6 machos pesando 25g oriundos do Serviço de Biotério da Prefeitura do Campus de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo. Vigência da autorização: 30/01/2017 a 19/09/2019.

We certify that the Protocol nº 144/2016, entitled "*The role of autophagy in behavioral processes triggered by chronic treatment with cannabinoids in chronic stress states*", is in accordance with the Ethical Principles in Animal Research adopted by the National Council for the Control of Animal Experimentation (CONCEA) and was approved by the Local Animal Ethical Committee from Ribeirão Preto Medical School of the University of São Paulo in 01/30/2017. This protocol involves the production, maintenance or use of animals from phylum Chordata, subphylum Vertebrata (except humans) for research purposes, and includes the use of 60 male Swiss mice weighing 50g and 340 male C57Bl/6 mice weighing 25g from the Central Animal House of Ribeirão Preto Medical School, University of São Paulo. This certificate is valid until 09/19/2019.

Ribeirão Preto, 30 de janeiro de 2017

Prof. Dr. Fernando Silva Ramalho  
Presidente da CEUA – FMRP – USP

## Title Page

### **Oxytocin, psychosocial stress and depressive-like behaviors: a systematic review**

Eduardo Junji Fusse, Maria Adrielle Vicente and Alline Cristina Campos\*

Department of Pharmacology- Ribeirao Preto Medical School- University of São Paulo;  
3900 Bandeirantes avenue 14049-900;

Postgraduate Program in Mental Health - Ribeirao Preto Medical School- University of  
São Paulo; 3900 Bandeirantes avenue 14049-900

\*corresponding author

Alline C Campos

Department of Pharmacology

Ribeirao Preto Medical School- University of São Paulo;  
3900 Bandeirantes avenue 14049-900

Email: [allinecampos@usp.br](mailto:allinecampos@usp.br)

*Abstract*

In the field of neuroscience, several animal models and behavioral tests are proposed to model depressive disorders and the neurobiology and endogenous systems affected by mental disorder. One of the main animal models used in this context is the social defeat stress, a model that induces some features of psychosocial stress in rodents, like reduced sociability. In major depressive patients, reduced social skills and isolation amplifies stress response and serves as a worsen factor of the symptoms. Oxytocin is a peptide neurotransmitter that is synthesized in the supraoptic and paraventricular nuclei of the hypothalamus. Several pieces of the literature suggest that this hormone peptide promotes positive social behavior and stress regulation, which indicates a potential implication in several psychiatric disorders such as Major Depressive Disorder. Psychosocial stress may induce dysregulation of the oxytocinergic system. Therefore, in the present we revised the main lines of evidences that suggested how studies conducted in rodents submitted to social defeated stress that indicates Oxytocin-mediated neurotransmission as a putative target for novel treatment approaches for Major Depressive Disorders.

*Key words:* Major depressive disorder, animal models, social defeat stress, oxytocin

## 1.0- Introduction

Depression is a heterogeneous and complex disease which etiology varies between individuals. Factors such as social environment and genetics might contribute to an increased risk to develop Major Depressive Disorder (MDD) (Otte *et al*, 2016). There are several theories for the pathophysiology of depression (Dean and Keshavan, 2017). A single theory is hardly able to explain all MDD aspects, specially considering its heterogeneous etiology. Therefore, it is difficult to fully elucidate the neural substrates of depression and to develop effective therapeutic approaches (Dean and Keshavan, 2017).

One of the main environmental factors recognized to be able to potentially precipitate depressive symptoms is stress. Stressful events (divorce, death of a relative, childhood maltreatment, unemployment, poverty, racial discrimination etc) increase the risk of MDD manifestation in susceptible individuals (Vinkers *et al*, 2014; McLaughlin *et al*, 2010; Britt-Spells *et al*, 2018).

Pre-clinical research has been a valuable tool for better understanding the neural substrates of depression in order to seek for therapies that would be more effective. Although it seems difficult to find a robust animal model of depression, the Social Defeat Stress (SDS) displays an adequate validity for MDD modeling. SDS is an ethological-based model, which uses social conflict to induce emotional and psychological stress (Hollis and Kabbaj, 2014). Using the resident/intruder paradigm, a rodent exposed to an older, more aggressive conspecific is submitted to social subordination after several attempts of conflict (Kudryavtseva *et al*, 1990). The face validity of SDS relies on the observation that defeated animals manifest behaviors related to a depressive-like

phenotype, e.g. anhedonia, social withdrawn and diminished sexual and reward seeking behavior. Neurochemical and neurobiological markers relevant to depression are also found in the SDS model, such as HPA axis hyperactivity, increased activity of the immune system, altered monoaminergic function and diminished neurogenesis and synaptic plasticity (Hammels *et al*, 2015; Iñiguez *et al*, 2014; Iñiguez *et al*, 2016; Bondar *et al*, 2018; Watt *et al*, 2009). This model also seems to have a good predictive validity, since chronic antidepressant treatment is able to revert the depressive-like phenotype induced by SDS (Krishnan *et al*, 2007; Venzala *et al*, 2012; Van Bekhoven *et al*, 2011; Gottschalk *et al*, 2018).

For the past 50 years, antidepressants are the first-line treatment, alongside other non-pharmacological interventions, such as psychotherapy (Hillhouse and Porter, 2015). However, antidepressant treatment is not effective for every patient. It is estimated that about 30% of the patients do not report an improvement of depressive symptoms after antidepressant treatment (Al-Harbi *et al*, 2012). Therefore, new and more effective options are urgently needed.

In the last years, several groups around the world have tried to find a new drugable target to treat MDD outside of the monoaminergic hypothesis of mood disorders. In this context, a neuropeptide that seems to modulate active coping behaviors and sociability has call attention of the many scientists: oxytocin.

Oxytocin was discovered by Henry Dale in 1906, when he observed an “extract” that was able to contract the uterus of pregnant cats. Dale named the substance oxytocin, term derived from the greek that means “fast burning”. In 1953, this substance was the first

peptide hormone to be sequenced and synthetized by Vincent Du Vigneaud, discovery that rendered him the Nobel Prize two years later (Du Vigneaud, 1956 ; Viero et al., 2010). In the Central Nervous System (CNS), oxytocin is synthetized in both the Paraventricular Nucleus (PVN) and the Supraoptic Nucleus (SON) of the hypothalamus. Magnocellular neurons constitute the major source of this neuropeptide. Oxytocin is released by parvocellular neurons, located in the PVN that project to other brain areas (Neumann, 2007), where it can be stored and delivered in the blood to promote its actions in the periphery, such as controlling breast milk ejection and childbirth induction.

According to Landgraf & Neumann (2004), oxytocin receptors are distributed throughout several brain areas, including hypothalamus and amygdala and limbic regions (Huber et al. 2005; Dacome & Garcia, 2008). The distribution of oxytocin varies according to the different stages of brain development, and is indirectly regulated by sexual steroids, especially estrogen (for review, see Gimpl e Fahrenholz, 2001).

Oxytocin a key modulator of maternal behavior (Galbally et al., 2011; Poindron, 2005), food and sodium intake (Valassi et al., 2008; Stricker and Verbalis, 1996), sexual behavior (Insel et al., 1993), and of particular importance for this review, positive social interactions (Meyer-Linderberg et al. 2011, Heinrichs et al., 2002; Insel e Young, 2001; Young et al., 2001) modulation of stress coping (Yamagata et al., 1997) and social memory (Ferguson, 2000).

In the case of social behaviors, oxytocin increase self-confidence, decrease amygdala activation in response to fear and enhance social signals in human volunteers (Kirsch et al. 2005; Guastella et al. 2008). Oxytocin deficits are correlated with emotional suffering

(Gordon et al. 2008) and worse prognostic of severe depressive disorder (Scantamburlo et al., 2007).

As aforementioned, psychosocial stress may induce dysregulation of the oxytocinergic system, which could serve as a good model to determine the putative antidepressive effects of oxytocin. Therefore, in the present review we tried to summarize the main finds supporting the effects of social defeat stress on oxytocinergic neurotrasnmission and its possible implications for MDD.

## 2.0- Methodology

To collect the studies presented in this review, we conducted research in data based following The The guidelines of the Preferred Reporting Items for Systematic Reviews and Meta-Analyses (PRISMA—Moher et al., 2009). Articles included here were selected based on the results found in electronic databases (PubMed, Scielo and Scopus), without limitations in terms of time, publication date but only articles written in English were selected; last search conducted on 10/09/2018. The terms used for the search were “social defeat” and “oxytocin”. Articles that evaluated the oxytocinergic neurotransmission in regard to the social defeat paradigm in rodents were included, however, articles that used any other model of stress were selected as exclusion criteria. The quality of the methods used in the selected studies was evaluated using the following criterias: procedure and number of social defeat stress; sex and species of the animals; measurement of oxytocinergic related neurotransmission such as receptor expression, neuronal expression or peptide levels; treatments that involve the oxytocinergic neurotransmission like exogenous OXT or OXT receptor antagonists. Also were excluded abstracts, letters to editors, reviews and case studies. Figure 1 illustrates the schematic diagram showing the steps and criteria of inclusion and exclusion as well as the number of articles found in each step of our analysis (based on Moher et al., 2009).

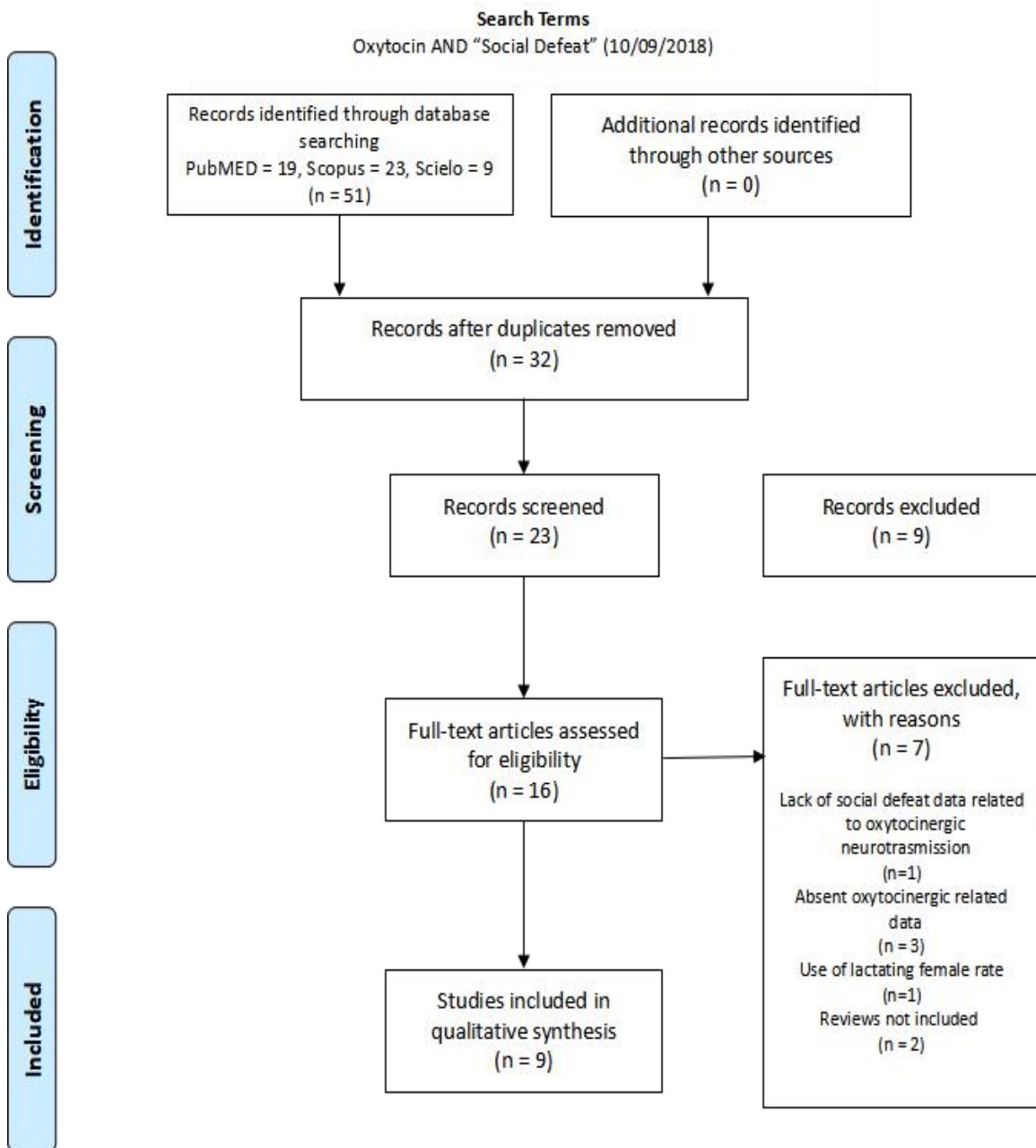


Figure 1. PRISMA Chart Dataflow. Research results including search terms, number of records found, number of excluded records, inclusion and exclusion criteria and number of included studies for the review.

### **3- Results**

A total of 32 articles were found, and 9 articles were selected after applying the inclusion and exclusion criteria (see **Figure 1**). In the table 1 and 2, the main characteristics of the included studies are represented.

### Oxitocinergic neurotransmission-related measure

<b>Author</b>	<b>Year</b>	<b>Animal</b>	<b>SDS</b>	<b>Measure</b>	<b>Outcome after SDS</b>
Ebner K.	2005	♂ Wistar Rat	Acute	Plasma Samples	No OT difference
Engelmann M.	1999	♂ Wistar Rat	Acute	Plasma Samples	No OT difference
				Mycrodialysis - SON	↑ OT
Engelmann M.	2000	♂ Wistar Rat	Acute	Plasma Samples	No OT difference
				Mycrodialysis - SON	↑ OT
				Mycrodialysis - mLS	↑ OT
Wotjak C.	1996	♂ Wistar Rat	Acute	Plasma Samples	No OT difference
				Mycrodialysis - PVN	No OT difference
Litvin Y.	2011	♂ Swiss-Webster Mouse	10 Days	OTR mRNA - MeA	↑ OTR expression
Nasanbuyan N.	2018	♂ C57BL/6J Mice	3 Days	OTN Activity - BNST, SON, PVN	↑ OTN activity
				OTR Activity - CoA, MeA, IC, LS, TLM, vVMH, vPAG	↑ OTR activity
Duque-Wilkens N.	2017	♂ California Mice	3 days	OTR Expression - NAcdl, NAc shell	↓ OTR expression
		♀ California Mice			
Steinman M.	2015	♂ California Mice	Acute	OTN Activity - Rostral PVN, Caudal PVN	↑ OTN activity
			3 days	OTN Activity - Rostral PVN, Caudal PVN, BNSTmv	↑ OTN activity
		♀ California Mice	Acute	OTN Activity - Rostral PVN, Caudal PVN	No OTN activity difference
			3 days	OTN Activity - Rostral PVN, Caudal PVN	↑ OTN activity
				OTN Activity - BNSTmv, Rostral PVN	↑ OTN activity 2 weeks after SDS
				OTN Activity - BNSTmv	↑ OTN activity 10 weeks after SDS

Table 1. Compiled data from analysed studies regarding oxytocinergic neurotransmission after SDS. Abbreviations: SDS - Social Defeat Stress; OT - Oxytocin; SON - Supraoptic Nucleus; mLS - Medio-lateral Septum PVN - Paraventricular Nucleus; MeA - Media Amygdala; OTR - Oxytocin Receptor; OTN - Oxytocin Neuron; BNST - Bed Nucleus of Stria Terminalis; CoA - Cortical Amygdala; IC - Insular Cortex; LS - Lateral Septum; TLM - Thalamus; vVMH - Ventrolateral Ventromedial Hypothalamus; vPAG - Ventrolateral Periaqueductal Grey; NACdl - Dorsolateral Nucleus Accumbens; NAc shell - Nucleus Accumbens shell; BNSTmv - Medioventral Bed Nucleus of Stria Terminalis; i.p. - intraperitoneal

### Oxitocinergic treatment-related measure

Author	Year	Animal	SDS	Behavioral outcome after SDS	Treatment	Behavioral outcome after treatment
Duque-Wilkens N.	2017	♂ California Mice	3 Days	No difference in SI	1mg/kg OTA (i.p.)	No difference in SI in control or defeated animals
		♀ California Mice			5mg/kg OTA (i.p.)	↓ interaction in SI in control animals
		♀ California Mice	3 Days	↓ interaction in SI	1mg/kg OTA (i.p.)	No difference in SI in control or defeated animals
		♀ California Mice			5mg/kg OTA (i.p.)	↑ interaction in SI in defeated animals
		♀ California Mice			ICV OTA BNSTam (Dose not specified)	↑ interaction in SI in defeated animals
		♀ California Mice			ICV OTA NAcdl (Dose not specified)	No difference in SI
		♂ California Mice	3 Days	No difference in SI	0,8IU/kg OT (i.n.)	Trend to ↑ interaction in SI in defeated animals
		♀ California Mice				↓ interaction in SI in control animals
Wang L.	2018	♀ Mandarim Prairie Vole	14 days	↓ interaction in SI	ICV 1ngOT NAcshell	↑ interaction in SI in defeated animals
					ICV 1ngOT/10ngOTA NAcshell	Prevented OT effects in defeated animals
					ICV 1ngOT/100ngOTA NAcshell	Prevented OT effects in defeated animals

Table 2. Compiled data from analysed studies regarding oxytocinergic related treatments after SDS. Abbreviations: SDS - Social Defeat Stress; OTA - Oxytocin Receptor Antagonist; SI - Social Investigation Test; ICV - Intracerebroventricular Injection; BNSTam - Anteromedial Bed Nucleus of Stria Terminalis; NAcdl - Dorsolateral Nucleus Accumbens; OT - Oxytocin; i.p. - intraperitoneal

### 3.1 - SDS induces oxytocinergic system activity

Research carried by Wotjak *et al* used SDS paradigm to induce emotional stress in male Wistar rats. Rats were implanted with microdialysis probes in the right paraventricular nucleus of hypothalamus (PVN) or supraoptic nucleus of hypothalamus (SON) to assess measures in these areas. Also, rats were implanted with jugular catheters for blood sample analysis. For the SDS paradigm, animals were exposed to contact with another dominant male rat housed together with a female rat, after the first physical encounter animals were separated by a mesh wire and remained for 30min. SDS did not induce any changes to circulating peripheral OT or in PVN after SDS (Wotjak *et al*, 1996). Similar works by the same group (Engelmann *et al*, 1999, 2000) used the same paradigm approach to investigate OT in socially defeated rats. Again no plasma OT differences were found, but a increased OT in SON were found in both studies (Engelmann *et al*, 1999, 2000). Interestingly, in the study by Engelmann *et al* in 2000, also found an increase of OT in the mediolateral septum (mLS) of the brain, which was not found when another kind of stressor is used, forced swim test (FST) in case, leading the investigators to hypothesize that the anxiolytic effects of SDS could be related to OT in this particular area (Engelmann *et al*, 2000). Another study published in 2005 by Ebner *et al.*, also member of the previous studies, demonstrated no OT changes in serum levels of defeated animals or stressors (Ebner *et al*, 2005). Litvin *et al* used adult male Swiss-Webster mice as subjects. SDS was elicited by 10 minutes of physical contact with conspecific dominant stressor and housed together 24h separated by a perforated partition, which allowed sensory contact. Measured by quantitative real-time PCR, defeated

animals showed increased oxytocin receptor (OTR) mRNA expression in the medial amygdala (MeA). (Litvin *et al*, 2011).

In the study conducted by Steinman *et al*, used another rodent species, *Peromyscus* species, the California mice, for their experiments. This monogamous animal is different from common used laboratory rodents because female animal display an aggressive outcome and can be used in the resident-intruder paradigm to elicit social defeat. In the studies by Steinman *et al*, SDS paradigm was different from other studies in order to normalize aggressions between males and females. Mice assigned to social defeat were placed in the home cage of a aggressive conspecific for 7-10 min or until the animal were exposed to 7-10 offensive attacks. This procedure was made on a single exposure or for three consecutive days. What they found, using OT/c-fos immunostaining, is that an acute exposure to SDS elicits different outcomes in male and female. Male mice exposed to a single SDS exhibit increased oxytocin neurons (OTN) activity in rostral and caudal PVN, whilst female mice not. However, when exposed to three days of SDS, both male and female mice display increased OTN activity in rostral and caudal PVN. Male mice also have an increase activity in medioventral bed nucleus of stria terminalis (BNSTmv) while females do not. But, another appealing fact is that SDS effects are long-lasting in female California mice. Female animals exposed to SDS and permitted to rest for two weeks still exhibit increased OTN activity in BNSTmv and rostral PVN. And when the rest period is of 10 weeks, only in the BNSTmv the effects remain. These long lasting effects of SDS do not occur in male mice. Showing that there is a difference of how psychosocial stress permish and differently affects male and female mice (Steinman *et al*,

2015). Another work of the same group by Duke-Wilkens *et al* demonstrated that male and female California mice have diminished expression of oxytocin receptor (OTR) in the dorsolateral nucleus accumbens (NAcdl) and nucleus accumbens shell (NAcshell), an important region for social reward and pair bond formation (Duke-Wilkens *et al*, 2017).

In a recent research by Nasanbuyan *et al*, adult male C57BL/6J mice were submitted to the SDS paradigm to investigate SDS effects on the oxytocin system. C57 mice were exposed to 10 minutes of physical contact with aggressive CD1 mice and 100 minutes of sensorial contact. Immunocytochemical detection of c-Fos showed increased OTN activity in the BNST, PVN and SON of defeated animals. Also SDS increases OTR activity in several brain regions, such as lateral septum (LS), cortical amygdala (CoA), medial amygdala (MeA), thalamus (TLM), ventrolateral ventromedial hypothalamus (vVHM) and ventrolateral PAG (vPAG).

Overall, results indicate that SDS paradigm activates the oxytocin system.

3.2 - SDS generate social avoidance in female mice and exogenous OT-related treatment outcomes are sex-specific.

Social withdrawal is one of the commonly known symptoms of depression. In social species, such as rodents, social interactions are a fundamental adaptive component (Kaidanovich-Beilin *et al*, 2011). To assess social avoidance in rodents the Social Interaction Test is used (SI). SI consists of a large open box field with a perforated cage. After habituation of the focal animal in the environment, an unknown conspecific is put in the cage and time spent by the focal animal near the cage is measured.

Steinman *et al* did not find differences in SI between control and defeated male or female California mice. However, intranasal administration of oxytocin (0,8IU/kg) in female California mice decreased interaction in SI in control female animals. Male defeated California mice displayed a trend to increase interaction in SI (Steinman *et al*, 2015). Another work of the same group by Duque-Wilkens *et al*, found that SDS decreases interaction in defeated female California mice, while this effect does not appear in male animals. Intraperitoneal (i.p.) administration of 5mg/kg of an oxytocin receptor antagonist (OTA) reversed the effects of SDS in SI of female California mice, increasing interaction time. On the other hand, treatment effect was sex dependent, as in control male California mice the same dosage led to a decreased interaction time in SI. Also, intracerebroventricular injection (ICV) of OTA (dose not specified by the author) in BNSTm prevents the effects of SDS in female defeated mice, whilst ICV of OTA in NAcdl does not. (Duque-Wilkens *et al*, 2017)""

Wang *et al* used adult female mandarin voles (*Microtus mandarinus*) for studying the effects of SDS in social behaviors and OT neurotransmission. Female mandarin voles show spontaneous aggressive behavior towards conspecifics, which allows the opportunity to assess the effects of SDS in female animals. To induce social defeat, adult female mandarin voles were exposed to a pre-selected aggressive older conspecific for 10 minutes. After the physical encounter, animals were separated by a perforated glass and left undisturbed for 24h of sensorial contact. This was carried out for 14 days. Defeated females mandarin voles displayed a reduced interaction in SI. Effects of the SDS were reverted by a ICV of 1ng OT in the NAcshell, leading to an increased interaction in SI.

Effects of ICV OT treatment were prevented when co-administered with ICV of 10ng or 100ng of OTA

#### 4-Discussion

In summary, results of studies reviewed by this work suggest an implication of the oxytocinergic neurotransmission in the social defeat paradigm that is sex dependent. OT is produced in PVN and SON of the hypothalamus and released by parvocellular neurons, located in the PVN that project to other brain areas and throughout the body (Neumann, 2007). OT axons and OTR can be found in many regions in rodent brain such as, NAc, BNST, LS, MeA, PAG, Ventral Tegmental Area (VTA), Hippocampus (HIP) (Nasanbuyan *et al*, 2018; Grinevish *et al*, 2015). Results show strong evidence that exposure to SDS evokes oxytocinergic activity in brain areas like SON, PVN, BNST (Engelmann *et al*, 1999, 2000; Steinman *et al*, 2015). In literature it is widely established from clinical and preclinical studies that stress exposure plays a role in etiology of MDD (Bartolomuci and Leopardi, 2009). OT inhibits stress induced HPA axis activity (Neumann *et al*, 2000) and control corticotropin releasing hormone (CRH) release by PVN, since oxytocin KO mice display a increased CRH release when compared to wild type mice beneath a stressor (Nomura *et al*, 2003). Rapid release of OT observed in studies by Engelmann *et al* could be in due to the stressful social nature of the confront, in order to increase pro social behaviors, regulate the HPA axis and restore homeostasis. Intranasal OT administration, along social support, dampens cortisol release and anxiety during a psychosocial stress exposure in healthy men (Heinrichs *et al*, 2003).

Studies by Steinman *et al* and Duque-Wilkens *et al.* used a different species than commonly used laboratory rodents. The California mouse is a monogamous rodent and female subjects of this species are aggressive against conspecifics in the resident/intruder paradigm. Epidemiology surveys indicate that women experience depression two to three times more than men. (World Health Organization, 2017). Despite this fact, preclinical neuroscience research has a ratio of 5.5:1 male to female subjects (McCarthy, 2015). Indeed, sex differences could bias results due to physiological and endocrine parameters, and some animal models of stress cannot be applied to female subjects, such is the case of SDS due to non aggression of female conspecifics. Still, data relevance of female subjects is unparalleled, even more for depression and stress resilience models, such as the SDS.

## **5- Acknowledgments**

The authors of the present review thank the funding agency that provide the necessary resources that make possible our work: FAPESP (2015/05551-0), CNPq (2017-4003). EJF received a CNPq fellowship. MAV is a BNDES-FAEPA fellowship. We also thank our lab colleagues that keep a friendly and supportive environment in our laboratory.

## 6- References

1. Al-Harbi KS. Treatment-resistant depression: Therapeutic trends, challenges, and future directions. *Patient Prefer Adherence*. 2012;6:369-388. doi:10.2147/PPA.S29716
2. Bartolomucci A, Leopardi R. Stress and depression: Preclinical research and clinical implications. *PLoS One*. 2009;4(1). doi:10.1371/journal.pone.0004265
3. Bondar N, Bryzgalov L, Ershov N, et al. Molecular Adaptations to Social Defeat Stress and Induced Depression in Mice. *Mol Neurobiol*. 2018;55(4):3394-3407. doi:10.1007/s12035-017-0586-3
4. Britt-Spells AM, Sledodenik M, Sands LP, Rollock D. Effects of Perceived Discrimination on Depressive Symptoms Among Black Men Residing in the United States: A Meta-Analysis. *Am J Mens Health*. 2018;12(1):52-63. doi:10.1177/1557988315624509
5. Chen D, Meng L, Pei F, Zheng Y, Leng J. A review of DNA methylation in depression. *J Clin Neurosci*. 2017;43:39-46. doi:10.1016/j.jocn.2017.05.022
6. Dean J, Keshavan M. The neurobiology of depression: An integrated view. *Asian J Psychiatr*. 2017;27(2017):101-111. doi:10.1016/j.ajp.2017.01.025
7. Duque-Wilckens N, Steinman MQ, Busnelli M, et al. Oxytocin Receptors in the Anteromedial Bed Nucleus of the Stria Terminalis Promote Stress-Induced Social Avoidance in Female California Mice. *Biol Psychiatry*. 2018;83(3):203-213. doi:10.1016/j.biopsych.2017.08.024
8. Ebner K, Wotjak CT, Landgraf R, Engelmann M. Neuroendocrine and behavioral response to social confrontation: Residents versus intruders, active versus passive coping styles. *Horm Behav*. 2005;47(1):14-21. doi:10.1016/j.yhbeh.2004.08.002
9. Engelmann M, Ebner K, Landgraf R, Holsboer F, Wotjak1 CT. Emotional stress triggers intrahypothalamic but not peripheral release of oxytocin in male rats. *J Neuroendocrinol*. 1999;11(11):867-872.
10. Engelmann M, Wotjak CT, Ebner K, Landgraf R. Behavioural impact of intraseptally released vasopressin and oxytocin in rats. *Exp Physiol*. 2000;85
11. Ferguson JN, Aldag JM, Insel TR, Young LJ. Oxytocin in the Medial Amygdala is Essential for Social Recognition in the Mouse. *J Neurosci*. 2001;21(20):8278-8285. doi:10.1523/JNEUROSCI.21-20-08278.2001

12. Galbally M, Lewis AJ, Ijzendoorn M Van, Permezel M. The role of oxytocin in mother-infant relations: A systematic review of human studies. *Harv Rev Psychiatry*. 2011;19(1):1-14. doi:10.3109/10673229.2011.549771
13. Gottschalk MG, Mortas P, Haman M, Ozcan S, Biemans B, Bahn S. Fluoxetine, not donepezil, reverses anhedonia, cognitive dysfunctions and hippocampal proteome changes during repeated social defeat exposure. *Eur Neuropsychopharmacol*. 2018;28(1):195-210. doi:10.1016/j.euroneuro.2017.11.002
14. Guastella AJ, Mitchell PB, Mathews F. Oxytocin Enhances the Encoding of Positive Social Memories in Humans. *Biol Psychiatry*. 2008;64(3):256-258. doi:10.1016/j.biopsych.2008.02.008
15. Hammels C, Pishva E, De Vry J, et al. Defeat stress in rodents: From behavior to molecules. *Neurosci Biobehav Rev*. 2015;59:111-140. doi:10.1016/j.neubiorev.2015.10.006
16. Heinrichs M, Baumgartner T, Kirschbaum C, Ehlert U. Social support and oxytocin interact to suppress cortisol and subjective responses to psychosocial stress. *Biol Psychiatry*. 2003;54(12 CC-Consumers and Communication CC-Metabolic and Endocrine Disorders):1389-1398. doi:10.1016/S0006-3223(03)00465-7
17. Hillhouse TM, Porter JH. A brief history of the development of antidepressant drugs: From monoamines to glutamate. *Exp Clin Psychopharmacol*. 2015;23(1):1-21. doi:10.1037/a0038550
18. Hollis F, Kabbaj M. Social defeat as an animal model for depression. *ILAR J*. 2014;55(2):221-232. doi:10.1093/ilar/ilu002
19. Iñiguez SD, Aubry A, Riggs LM, et al. Social defeat stress induces depression-like behavior and alters spine morphology in the hippocampus of adolescent male C57BL/6 mice. *Neurobiol Stress*. 2016;5:54-64. doi:10.1016/j.ynstr.2016.07.001
20. Iñiguez SD, Riggs LM, Nieto SJ, et al. Social defeat stress induces a depression-like phenotype in adolescent male c57BL/6 mice. *Stress*. 2014;17(3):247-255. doi:10.3109/10253890.2014.910650
21. Insel TR, Young LJ. The neurobiology of attachment. *Nat Rev Neurosci*. 2001;2(2):129-136. doi:10.1038/35053579

22. Kaidanovich-Beilin O, Lipina T, Vukobradovic I, Roder J, Woodgett JR. Assessment of Social Interaction Behaviors. *J Vis Exp.* 2011;0(48):1-6. doi:10.3791/2473
23. Kirsch P. Oxytocin Modulates Neural Circuitry for Social Cognition and Fear in Humans. *J Neurosci.* 2005;25(49):11489-11493. doi:10.1523/JNEUROSCI.3984-05.2005
24. Klengel T, Binder EB. Epigenetics of Stress-Related Psychiatric Disorders and Gene × Environment Interactions. *Neuron.* 2015;86(6):1343-1357. doi:10.1016/j.neuron.2015.05.036
25. Kudryavtseva NN, Bakshtanovskaya IV, Koryakina LA. Social model of depression in mice of C57BL/6J strain. *Pharmacol Biochem Behav.* 1991;38(2):315-320. doi:10.1016/0091-3057(91)90284-9
26. Landgraf R, Neumann ID. Vasopressin and oxytocin release within the brain: A dynamic concept of multiple and variable modes of neuropeptide communication. *Front Neuroendocrinol.* 2004;25(3-4):150-176. doi:10.1016/j.yfrne.2004.05.001
27. Litvin Y, Murakami G, Pfaff DW. Effects of chronic social defeat on behavioral and neural correlates of sociality: Vasopressin, oxytocin and the vasopressinergic V1b receptor. *Physiol Behav.* 2011;103(3-4):393-403. doi:10.1016/j.physbeh.2011.03.007
28. Lukas M, Toth I, Reber SO, Slattery DA, Veenema AH, Neumann ID. The neuropeptide oxytocin facilitates pro-social behavior and prevents social avoidance in rats and mice. *Neuropsychopharmacology.* 2011;36(11):2159-2168. doi:10.1038/npp.2011.95
29. McLaughlin KA, Conron KJ, Koenen KC, Gilman SE. Childhood adversity, adult stressful life events, and risk of past-year psychiatric disorder: A test of the stress sensitization hypothesis in a population-based sample of adults. *Psychol Med.* 2010;40(10):1647-1658. doi:10.1017/S0033291709992121
30. Ménard C, Hodes GE, Russo SJ. Pathogenesis of depression: Insights from human and rodent studies. *Neuroscience.* 2016;321(6):138-162. doi:10.1016/j.neuroscience.2015.05.053
31. Meyer-Lindenberg A, Domes G, Kirsch P, Heinrichs M. Oxytocin and vasopressin in the human brain: Social neuropeptides for translational medicine. *Nat Rev Neurosci.* 2011;12(9):524-538. doi:10.1038/nrn3044

32. Nasanbuyan N, Yoshida M, Takayanagi Y, et al. Oxytocin-Oxytocin Receptor Systems Facilitate Social Defeat Posture in Male Mice. *Endocrinology*. 2018;159(2):763-775. doi:10.1210/en.2017-00606
33. Nestler EJ, Barrot M, DiLeone RJ, Eisch AJ, Gold SJ, Monteggia LM. Neurobiology of Depression. *Neuron*. 2002;34(1):13-25. doi:10.1016/S0896-6273(02)00653-0
34. Neumann ID. Stimuli and consequences of dendritic release of oxytocin within the brain. *Biochem Soc Trans*. 2007;35(5):1252-1257. doi:10.1042/BST0351252
35. Neumann ID. Oxytocin: The Neuropeptide of Love Reveals Some of Its Secrets. *Cell Metab*. 2007;5(4):231-233. doi:10.1016/j.cmet.2007.03.008
36. Poindron P. Mechanisms of activation of maternal behaviour in mammals. *Reprod Nutr Dev*. 2005;45(3):341-351. doi:10.1051/rnd:2005025
37. Scantamburlo G, Hansenne M, Fuchs S, et al. Plasma oxytocin levels and anxiety in patients with major depression. *Psychoneuroendocrinology*. 2007;32(4):407-410. doi:10.1016/j.psyneuen.2007.01.009
38. Steinman MQ, Duque-Wilckens N, Greenberg GD, et al. Sex-Specific Effects of Stress on Oxytocin Neurons Correspond With Responses to Intranasal Oxytocin. *Biol Psychiatry*. 2016;80(5):406-414. doi:10.1016/j.biopsych.2015.10.007
39. Stricker EM, Verbalis JG. Central inhibition of salt appetite by oxytocin in rats. *Regul Pept*. 1996;66(1-2):83-85. doi:10.1016/0167-0115(96)00058-4
40. Van Bokhoven P, Oomen CA, Hoogendoijk WJG, Smit AB, Lucassen PJ, Spijker S. Reduction in hippocampal neurogenesis after social defeat is long-lasting and responsive to late antidepressant treatment. *Eur J Neurosci*. 2011;33(10):1833-1840. doi:10.1111/j.1460-9568.2011.07668.x
41. Viero C, Shibuya I, Kitamura N, et al. Oxytocin: Crossing the bridge between basic science and pharmacotherapy. *CNS Neurosci Ther*. 2010;16(5):138-156. doi:10.1111/j.1755-5949.2010.00185.x
42. Vinkers CH, Joëls M, Milaneschi Y, Kahn RS, Penninx BWJH, Boks MPM. Stress exposure across the life span cumulatively increases depression risk and is moderated by neuroticism. *Depress Anxiety*. 2014;31(9):737-745. doi:10.1002/da.22262
43. Wang L, Hou W, He Z, et al. Effects of chronic social defeat on social behaviors in adult female mandarin voles (*Microtus mandarinus*): Involvement of the oxytocin

- system in the nucleus accumbens. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*. 2018;82:278-288. doi:10.1016/j.pnpbp.2017.11.002
44. Watt MJ, Burke AR, Renner KJ, Forster GL. Adolescent Male Rats Exposed to Social Defeat Exhibit Altered Anxiety Behavior and Limbic Monoamines as Adults. *Behav Neurosci*. 2009;123(3):564-576. doi:10.1037/a0015752
  45. Winslow JT, Ferguson JN, Young LJ, Hearn EF, Matzuk MM, Insel TR. Social amnesia in mice lacking the oxytocin gene. *Nat Genet*. 2000;25(3):284-288. doi:10.1038/77040
  46. Wotjak CT, Kubota M, Liebsch G, et al. Release of vasopressin within the rat paraventricular nucleus in response to emotional stress: a novel mechanism of regulating adrenocorticotropic hormone secretion? *J Neurosci*. 1996;16(23):7725-7732.