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

AMANDA JULIANA SALES

**Participação da metilação de DNA no desenvolvimento de
alterações comportamentais e moleculares induzidas pelo estresse**

Ribeirão Preto

2018

AMANDA JULIANA SALES

**Participação da metilação de DNA no desenvolvimento de alterações
comportamentais e moleculares induzidas pelo estresse**

TESE apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da
Universidade de São Paulo para obtenção do Título de Doutor
em Ciências

Área de Concentração: Farmacologia

Orientadora: Prof.^a Dr.^a Sâmia Regiane Lourenço Joca

Versão corrigida

Ribeirão Preto

2018

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.

FICHA CATALOGRÁFICA

Sales, Amanda Juliana

Participação da metilação de DNA no desenvolvimento de alterações comportamentais e moleculares induzidas pelo estresse / Amanda Juliana Sales; orientadora: Sâmia Regiane Lourenço Joca – Ribeirão Preto, 2018.

196p. : il.; 30 cm

Tese (Doutorado em Ciências – Área de concentração: Farmacologia) - Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, 2018.

1. Metilação de DNA. 2. Inibidores de DNMTs. 3. Antidepressivos. 4. Estresse.

FOLHA DE APROVAÇÃO

AMANDA JULIANA SALES

Participação da metilação de DNA no desenvolvimento de alterações comportamentais e moleculares induzidas pelo estresse

Tese apresentada à Faculdade de Medicina de
Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo para
obtenção do Título de Doutor em Ciências

Área de Concentração: Farmacologia

Aprovada em: _____.

BANCA EXAMINADORA

Profa. Dra. Sâmia Regiane Lourenço Joca

Instituição: FMRP-USP

Assinatura: _____

Prof. Dr. Riccardo Lacchini

Instituição: FMRP-USP

Assinatura: _____

Prof. Dr. Hélio Zangrossi Jr.

Instituição: FMRP-USP

Assinatura: _____

Dra. Sabrina Francesca de Souza Lisbôa

Instituição: FMRP-USP – Pós Doc

Assinatura: _____

Profa. Dra. Cilene Lino de Oliveira

Instituição: UFSC

Assinatura: _____

*Às minhas filhas, Maria Clara e Ana
Beatriz, com todo amor do mundo.*

AGRADECIMENTOS

A minha orientadora, Sâmia Joca, por ter me aceito como aluna, me orientando durante os últimos 10 anos com dedicação, paciência e extrema compreensão e, acima de tudo, por ser um exemplo de integridade, seriedade e comprometimento. Meus sinceros agradecimentos pela oportunidade de integrar esse grupo e pela confiança durante a execução desse trabalho.

Aos queridos amigos do laboratório pela excelente convivência e pela constante troca de conhecimentos.

A minha mãe pelo cuidado e amor incondicional com as minhas filhas.

João Francisco Pedrazzi pelo carinho, companheirismo e dedicação a mim e nossas filhas.

As minhas “amoras” Maria Clara e Ana Beatriz por terem me tornado uma pessoa melhor e me ensinado a amar ao infinito e além.

Aos membros da banca, por aceitarem o convite contribuindo consideravelmente para minha formação.

Às agências de fomento: Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo - FAPESP (nº processo: 2015/01955-0); Coordenadoria de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – CAPES e Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico – CNPq.

A Universidade de São Paulo, especialmente as Faculdades de Medicina e Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, e seus funcionários: Soninha, Gislaine, Ramon, Fátima, Marlene e D. Nina.

Por fim, aos que contribuíram diretamente com esse trabalho: Flávia Fiacadori Salata e Izaque Maciel, cuja ajuda foi fundamental durante a execução deste.

Ninguém ignora tudo. Ninguém sabe tudo. Todos nós sabemos alguma coisa. Todos nós ignoramos alguma coisa. Por isso aprendemos sempre.

Paulo Freire (1921-1997)

Aos animais utilizados na pesquisa científica meu reconhecimento e respeito.

RESUMO

Sales, A.J. **Participação da metilação de DNA no desenvolvimento de alterações comportamentais e moleculares induzidas pelo estresse.** 2018. 196 f. Tese (Doutorado) – Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2018.

Introdução: Mecanismos epigenéticos, como a metilação de DNA, desempenham um papel importante na neurobiologia da depressão. Enquanto o estresse aumenta a metilação de DNA e reduz a expressão de genes envolvidos na plasticidade neuronal, inibidores de DNA metiltransferases (DNMTi), enzimas que catalisam a metilação de DNA, aumentam rapidamente a expressão gênica e induzem efeitos tipo-antidepressivos em modelos animais. Considerando, ainda, que antidepressivos convencionais podem interferir com mecanismos epigenéticos, este trabalho testou a hipótese de que drogas DNMTi induzem efeito tipo-antidepressivo agudo e sustentado em modelos animais. Além disso, avaliamos se o efeito de antidepressivos convencionais e de DNMTis sobre os níveis de mRNA e de metilação de DNA em diferentes genes associados a depressão e regulados por mecanismos epigenéticos (BDNF, TrkB, 5-HT_{1A}, NMDA e AMPA) em estruturas encefálicas (hipocampo dorsal, ventral e córtex pré-frontal) de animais submetidos a modelo animal de depressão. **Métodos:** Para tanto, ratos *Wistar* foram submetidos ao modelo do desamparo aprendido [*learned helplessness*, LH, pré-teste (PT), 40 choques inescapáveis nas patas]. Os animais receberam injeções sistêmicas de DNMTi (5-AzaD ou RG108), antidepressivos (imipramina ou fluoxetina), ou veículo, por 1 ou 7 dias, e foram submetidos a sessão teste do desamparo aprendido (T, 30 choques escapáveis) no último dia. Adicionalmente, um grupo independente foi submetido ao mesmo protocolo experimental e sacrificados 1 h após a última injeção. As estruturas encefálicas foram dissecadas para posterior análise molecular [imunoprecipitação de DNA metilado (meDIP) e quantificação de RNAm por qRT-PCR]. **Resultados:** O estresse dos choques nas patas aumentou o número de falhas no teste. O tratamento com DNMTi agudamente, assim como com antidepressivos (tratamento repetido), foi capaz de atenuar essas alterações comportamentais, efeito considerado tipo-antidepressivo nesse modelo. Ainda, o estresse aumentou a metilação de DNA e reduziu os níveis de RNAm para BDNF e TrkB, enquanto que o tratamento com RG108 atenuou essas alterações moleculares no córtex pré-frontal de ratos. **Conclusão:** Os presentes resultados indicam que DNMTi, diferente de antidepressivos convencionais, são capazes de induzir rápido e sustentado efeito tipo-antidepressivo. Além disso, BDNF e TrkB parecem ser importantes para a resposta comportamental induzida pela inibição de DNMTs no córtex pré-frontal de ratos submetidos ao LH.

Palavras-chave: metilação do DNA, DNMT, antidepressivo, RG108, 5-AzaD, fluoxetina, imipramina, RNAm.

ABSTRACT

Sales, A.J. **Involvement of DNA methylation in behavioral and molecular changes induced by stress.** 2018. 196 f. Tese (Doutorado) – Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2018.

Introduction: Epigenetic mechanisms, such as DNA methylation, are thought to play an important role in the neurobiology of depression. While stress increases DNA methylation and decreases the expression of genes involved in neuronal plasticity, DNA methyltransferases inhibitors (DNMTi) increases gene expression and induces antidepressant-like effects in animal models. Considering that conventional antidepressants could interfere with epigenetic mechanisms, this work tested the hypothesis that acute treatment with DNMTi would induce acute and long-lasting antidepressant-like effects. Furthermore, we evaluated whether the stress could induce changes in the mRNA and DNA methylation levels in different genes involved with depression and regulated by epigenetic mechanisms (BDNF, TrkB, 5-HT_{1A}, NMDA and AMPA) in different brain structures [dorsal hippocampus, ventral hippocampus and prefrontal cortex (PFC)] and whether such changes would be attenuated by systemic treatment with DNMTi (acutely) and antidepressants (chronically). **Methods:** Male *Wistar* rats were submitted to the learned helplessness model (LH; pretest session, 40 inescapable foot shocks). The animals received systemic injection the DNMTi (5-AzaD or RG108), antidepressants (imipramine or fluoxetine) or vehicle for one or seven days and were submitted to the LH test (30 escapable foot shocks) in the last day. Additionally, one independent group were submitted to the same experimental protocol and sacrificed one hour after last injection for collection of brain samples to further molecular analyses (methylated DNA immunoprecipitation and mRNA levels by qRT-PCR). **Results:** Exposure to inescapable footshocks increased the number of escape failures in the test. Treatment with DNMTi (acute), as well as with antidepressants (repeated treatment), attenuated stress-induced behavioral responses, an antidepressant-like effect in this model. Moreover, stress increased DNA methylation and decreased RNAm levels of BDNF and TrkB, while treatment with RG108 attenuated molecular changes induced by stress in rat PFC. **Conclusion:** The present results indicate that DNMTi, different from conventional antidepressants, are able to induce rapid and sustained antidepressant-like effects. In addition, BDNF and TrkB appear to be important for behavioral response induced by inhibition of DNMTs in the rat PFC submitted to the LH.

Keywords: DNA methylation, DNMT, antidepressant, RG108, 5-AzaD, fluoxetine, imipramine, RNAm.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Desenho representativo do modelo do Desamparo Aprendido	43
Figura 2 - Desenho representativo do protocolo experimental para coleta das amostras .	44
Figura 3 - Desenho experimental (Experimento 1 - Parte I)	48
Figura 4 - Desenho experimental (Experimento 2 - Parte I)	49
Figura 5 - Desenho experimental (Experimento 3 - Parte I)	50
Figura 6 - Desenho experimental (Experimento 4 - Parte I)	50
Figura 7 - Desenho experimental (Experimento 5 - Parte I)	51
Figura 8 - Desenho experimental (Experimento 1 - Parte II)	52
Figura 9 - Desenho experimental (Experimento 2 - Parte II)	53
Figura 10 - Desenho experimental (Experimento 3 - Parte II)	54
Figura 11 - Desenho experimental (Experimento 4 - Parte II)	55
Figura 12 - Desenho experimental (Experimento 5 - Parte II)	55
Figura 13 - Desenho experimental (Experimento 6 - Parte II)	56
Figura 14 - Desenho experimental (Experimento 7 - Parte II)	57
Figura 15 - Desenho experimental (Experimento 8 - Parte II)	58
Figura 16 - Desenho experimental (Experimento 9 - Parte II)	58
Figura 17 - Efeito do tratamento com fluoxetina sobre o comportamento de animais submetidos ao desamparo aprendido	64
Figura 18 - Efeito do tratamento com imipramina sobre o comportamento de animais submetidos ao desamparo aprendido	66
Figura 19 – Eletroforese de amostras de RNA isolado (Parte I)	67

Figura 20 - Nenhuma alteração foi observada nos vValores de cT dos normalizadores YWHAZ, ACTB e HPRT1 no <u>hipocampo dorsal</u> de animais submetidos ao desamparo aprendido	69
Figura 21 - Nenhuma alteração foi observada nos vValores de cT dos normalizadores YWHAZ, ACTB e HPRT1 no <u>hipocampo ventral</u> de animais submetidos ao desamparo aprendido	70
Figura 22 - Valores de cT dos normalizadores YWHAZ, ACTB e HPRT1 no <u>córtex pré-frontal</u> de animais submetidos ao desamparo aprendido	71
Figura 23 - A expressão de RNAm de <u>BDNF IV</u> no hipocampo dorsal de ratos submetidos ao desamparo aprendido não altera com o estresse ou tratamento com imipramina.....	73
Figura 24 - A expressão de RNAm de <u>TrkB</u> no hipocampo dorsal de ratos submetidos ao desamparo aprendido não altera com o estresse ou tratamento com imipramina	75
Figura 25 - A expressão de RNAm de <u>5-HT_{1A}</u> no hipocampo dorsal de ratos submetidos ao desamparo aprendido não altera com o estresse ou tratamento com imipramina	77
Figura 26 - A expressão de RNAm de <u>NMDA2a</u> no hipocampo dorsal de ratos submetidos ao desamparo aprendido não altera com o estresse ou tratamento com imipramina.....	79
Figura 27 - A expressão de RNAm de <u>AMPA1</u> no hipocampo dorsal de ratos submetidos ao desamparo aprendido não altera com o estresse ou tratamento com imipramina.....	81
Figura 28 - Nenhuma alteração significativa nos níveis de RNAm de <u>BDNF IV</u> foi observada com o estresse ou tratamento com imipramina no hipocampo ventral de ratos submetidos ao desamparo aprendido	83
.Figura 29 - A expressão de RNAm de <u>TrkB</u> no hipocampo ventral de ratos submetidos ao desamparo aprendido não altera com o estresse ou tratamento com imipramina	85
Figura 30 - A expressão de RNAm de <u>5-HT_{1A}</u> no hipocampo ventral de ratos submetidos ao desamparo aprendido não altera com o estresse ou tratamento com imipramina.....	87
Figura 31 - A expressão de RNAm de <u>NMDA2a</u> no hipocampo ventral de ratos submetidos ao desamparo aprendido não altera com o estresse ou tratamento com imipramina.....	89
Figura 32 - A expressão de RNAm de <u>AMPA1</u> no hipocampo ventral de ratos submetidos ao desamparo aprendido não altera com o estresse ou tratamento com imipramina.....	91
Figura 33 – Nenhuma alteração significativa nos níveis de RNAm de <u>BDNF IV</u> foi observada com o estresse ou tratamento com imipramina no córtex pré-frontal de ratos submetidos ao desamparo aprendido	93

Figura 34 - Os níveis de RNAm de <u>TrkB</u> no córtex pré-frontal de ratos submetidos ao desamparo aprendido, tratados ou não com imipramina	95
Figura 35 - Os níveis de RNAm de <u>5-HT1A</u> no córtex pré-frontal de ratos submetidos ao desamparo aprendido, tratados ou não com imipramina não são alterados significativamente	97
Figura 36 - Nenhuma alteração foi observada nos níveis de RNAm de <u>NMDA2a</u> no córtex pré-frontal de ratos submetidos ao desamparo aprendido, tratados ou não com imipramina	99
Figura 37 - Os níveis de RNAm de <u>AMPA1</u> no córtex pré-frontal de ratos submetidos ao desamparo aprendido, tratados ou não com imipramina não alteram significativamente	101
Figura 38 - O tratamento agudo com 5-AzaD (0,2 mg/Kg) aumentou o número de fugas e atenuou os efeitos do estresse sobre o número de falhas em animais submetidos ao modelo do desamparo aprendido	103
Figura 39 - O tratamento agudo com 5-AzaD (0,6 mg/Kg) induz efeito sustentado aumentando o número de fugas e reduzindo o número de falhas em animais submetidos ao modelo do desamparo aprendido.....	105
Figura 40 - O estresse alterou, enquanto que o tratamento agudo de 5-AzaD reverteu, o comportamento de animais submetidos ao modelo do desamparo aprendido.....	107
Figura 41 - O tratamento agudo com RG108 (0,6 mg/Kg), administrado 1h antes do teste, aumentou o número de fugas e atenuou os efeitos do estresse sobre o número de falhas em animais submetidos ao modelo do desamparo aprendido	109
Figura 42 - O tratamento agudo com RG108 (0,6 mg/Kg), administrado imediatamente após o pré-teste, aumentou o número de fugas e atenuou os efeitos do estresse sobre o número de falhas em animais submetidos ao modelo do desamparo aprendido	111
Figura 43 - Efeito do tratamento com RG108 sobre o comportamento de animais submetidos ao desamparo aprendido	113
Figura 44 – Eletroforese de amostras de RNA isolado (Parte II).....	114
Figura 45 – Nenhuma alteração foi observada nos valores de cT dos normalizadores WHAZ, ACTB e HPRT1 <u>hipocampo dorsal</u> de animais submetidos ao desamparo aprendido	116
Figura 46 - Os valores de cT dos normalizadores YWHAZ, ACTB e HPRT1 no <u>hipocampo ventral</u> não alteram com o estresse nem com os tratamentos	117

Figura 47 - No <u>córtex pré-frontal</u> de ratos submetidos ao desamparo aprendido e tratados ou não com RG108, os valores de cT dos normalizadores <u>YWHAZ</u> , <u>ACTB</u> e <u>HPRT1</u> não alteram	118
Figura 48 - Os níveis de RNAm de <u>BDNF IV</u> no hipocampo dorsal não modificam com o estresse nem com os tratamentos.....	120
Figura 49 - O tratamento com RG108 24h após o PT resultou em aumento nos níveis de RNAm de <u>TrkB</u> no hipocampo dorsal de ratos submetidos ao estresse dos choques nas patas	122
Figura 50 - Os níveis de RNAm de <u>5-HT_{1A}</u> no hipocampo dorsal não são alterados pelo estresse dos choques nas patas nem pelo tratamento com RG108	124
Figura 51 - Os níveis de RNAm de <u>NMDA2a</u> no hipocampo dorsal não modificam com o estresse dos choques nas patas nem com o tratamento com RG108	126
Figura 52 - Os níveis de RNAm de <u>AMPA1</u> no hipocampo dorsal não são modificam significativamente em ratos submetidos ao desamparo aprendido e tratados ou não com RG108.....	128
Figura 53 - Os níveis de RNAm de <u>BDNF IV</u> no hipocampo ventral não alteram com o estresse nem entre os tratamentos.....	130
Figura 54 - O estresse, assim como o tratamento com RG108, não modifica os níveis de RNAm do <u>TrkB</u> no hipocampo ventral de ratos submetidos ao desamparo aprendido ...	132
Figura 55 - Os níveis de RNAm de <u>5-HT_{1A}</u> no hipocampo ventral não alteram com o estresse nem com os tratamentos.....	134
Figura 56 - Os níveis de RNAm de <u>NMDA2a</u> subunidade 2a no hipocampo ventral não alteram com o estresse nem com os tratamentos	136
Figura 57 - No hipocampo ventral, os níveis de RNAm de <u>AMPA1</u> não modificam com o estresse nem com os tratamentos.....	138
Figura 58 - O estresse reduziu os níveis de RNAm de <u>BDNF IV</u> no córtex pré-frontal de ratos submetidos ao desamparo aprendido	140
Figura 59 – O estresse reduziu os níveis de RNAm de <u>TrkB</u> no córtex pré-frontal de ratos submetidos ao desamparo aprendido	142
Figura 60 - Nenhuma modificação ocorre nos níveis de transcritos de <u>5-HT_{1A}</u> no córtex pré-frontal de ratos submetidos ao desamparo aprendido.....	144

Figura 61 - Os níveis de RNAm de <u>NMDA2a</u> no córtex pré-frontal não modificam em ratos submetidos ao desamparo aprendido	146
Figura 62 - Os níveis de RNAm do receptor <u>AMPA1</u> no córtex pré-frontal não modificam em ratos submetidos ao desamparo aprendido	148
Figura 63 – Eletroforese de amostras de DNA isolado	149
Figura 64 – Eletroforese das amostras de DNA sonicado	150
Figura 65 - Os valores de cT dos controles YWHAZ, ACTB e HPRT1 das amostras não imunoprceipitadas (<i>input</i>) não alteram com o estresse nem com o tratamento	151
Figura 66 - Os valores de cT dos controles YWHAZ, ACTB e HPRT1 das amostras imunoprceipitadas (IP) não alteram com o estresse nem com o tratamento.....	152
Figura 67 - Os níveis de metilação de DNA no gene para BDNF (éxon IV) no córtex pré-frontal modificam em ratos tratados ou não com RG108 e submetidos ao desamparo aprendido	154
Figura 68 - Os níveis de metilação de DNA no gene para TrkB no córtex pré-frontal modificam em ratos tratados ou não com RG108 e submetidos ao desamparo aprendido	156
Figura 69 - Os níveis de BDNF no córtex pré-frontal não modificam em ratos tratados ou não com RG108 e submetidos ao desamparo aprendido	157

LISTA DE ABREVIATURAS

5-AzaC: 5-azacitidina

5-AzaD: 5-aza-2'-deoxicitidina ou decitabina

AMPA: α -amino-3-hidroxi-5-metil-ácido 4-isoxazolpropionico

BDNF: fator neurotrófico derivado do cérebro (*brain derived neurotrophic factor*)

cDNA: DNA complementar.

CE: choques escapáveis

CI: choques inescapáveis

CPF: córtex pré-frontal

CpG: citosina-fosfato-guanina (*cytosine-phosphate-guanine*)

CRF: fator de liberação de corticotrofina (*corticotrophin releasing factor*)

cT: *cycle threshold*

DNA: ácido desoxiribonucleico (*deoxyribonucleic acid*)

DNMT: DNA metiltransferase

DNMTi: inibidores de DNMTs (*DNMTs inhibitors*)

DSM-5: Manual Diagnóstico e Estatístico de Transtornos Mentais – 5ª edição (*Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders- 5th edition*)

ELISA: *Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*

ERK: quinase regulada por sinal extracelular (*extracellular signal-regulated kinase*)

FDA: *Food and Drug Administration*

FST: teste do nado forçado (*forced swimming test*)

GABA: ácido gama-aminobutírico (*gamma- aminobutyric acid*)

GR: receptor para glicocorticóide (*glucocorticoid receptor*)

H: histona

Hab: habitado

HAT: histona acetiltransferase

HDAC: histona deacetilase

HPA: hipófise-pituitária-adrenal

HPC: hipocampo

IL: infralímbico

i.p.: intraperitoneal

IP: imunoprecipitado

ICG: ilha CpG

K: lisina (*lysine*)

LAC: L-acetilcarnitina

LH: modelo do desamparo aprendido (*learned helplessness model*)

MeDIP: imunoprecipitação de DNA metilado (*Methylated DNA Immunoprecipitation*)

mTOR: proteína alvo da rapamicina em mamíferos (*mammalian target of rapamycin*)

NAC: núcleo accumbens

NMDA: N-Metil-d-Aspartato (*N-Methyl-d-Aspartate*)

Pb: pares de bases

PP1: proteína fosfatase 1 (*protein phosphatase 1*)

PSD-95: proteína de densidade pós-sináptica (*postsynaptic density protein 95*)

PT: pré-teste

PTSD: transtorno de estresse pós-traumático (*post-traumatic stress disorder*)

R: arginina (*arginine*)

RG108: [2-(1,3-dioxi-1,3-diidro-2H-isoindol-2-il)-3-(1H-indol-3-il)ácido propanóico]

RNA: ácido ribonucleico (*ribonucleic acid*)

RNA_m: RNA mensageiro

SNC: sistema nervoso central

T: teste

TAE: tampão TRIS-acetato-EDTA

TrkB: receptor tirosina quinase tipo B (*tyrosine receptor kinase B*)

TST: teste de suspensão pela cauda (*tail suspension test*)

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	22
1.1 Depressão	22
1.2 Modelos animais sensíveis a antidepressivos	23
1.3 Teorias sobre a neurobiologia da depressão e mecanismo de ação dos antidepressivos....	25
1.4 Estruturas encefálicas associadas a depressão	26
1.5 Epigenética e seus mecanismos	27
1.5.1 Metilação de DNA.....	29
1.5.2 Drogas inibidoras de DNMTs (DNMTi)	31
1.6 Metilação de DNA, estresse e depressão	32
1.7 Hipótese	38
 2 OBJETIVOS	 40
 3 MATERIAL E MÉTODOS	 42
3.1 Animais.....	42
3.2 Fármacos.....	42
3.3 Procedimentos experimentais	43
3.3.1 Modelo do desamparo aprendido (LH) para ratos.....	43
3.3.2 Coleta de tecidos.....	44
3.3.3 Preparação das amostras e avaliação da expressão gênica por PCR quantitativo em tempo real	44
3.3.4 Preparação das amostras, imunoprecipitação do DNA metilado (MeDIP) e avaliação da metilação gene-específica de DNA por PCR quantitativo em tempo real.....	45
3.3.5 Preparação das amostras e quantificação dos níveis de BDNF por <i>Enzyme-Linked Immunosorbent Assay</i> (ELISA)l.....	47
3.4 Delineamento experimental	47
3.4.1 Parte I: Efeito de antidepressivos sobre o comportamento, os níveis de transcritos, proteínas e a metilação de DNA gene-específica em estruturas encefálicas de animais submetidos ao LH.	47
Experimento 1: Efeito da administração sistêmica, <u>aguda ou repetida</u> , do antidepressivo fluoxetina sobre o comportamento de ratos submetidos ao LH	48
Experimento 2: Efeito da administração sistêmica, <u>aguda ou repetida</u> , do antidepressivo imipramina sobre o comportamento de ratos submetidos ao LH	48

Experimento 3: Efeito da administração sistêmica, <u>aguda ou repetida</u> , de imipramina sobre os níveis de RNAm, proteínas e da metilação de DNA em genes candidatos no encéfalo de ratos submetidos ao PT no LH – <u>Coleta das amostras</u>	49
Experimento 4: Efeito da administração sistêmica, <u>aguda ou repetida</u> , de imipramina sobre os níveis de RNAm de genes candidatos no encéfalo de ratos submetidos ao PT no LH.....	50
Experimento 5: Efeito da administração sistêmica, <u>aguda ou repetida</u> , de imipramina sobre a metilação de DNA em genes candidatos no encéfalo de ratos submetidos ao PT no LH	51
Experimento 6: Efeito da administração sistêmica, <u>aguda ou repetida</u> , de imipramina sobre os níveis de proteínas de genes candidatos no encéfalo de ratos submetidos ao PT no LH.....	51
3.4.2 Parte II: Efeito de DNMTi sobre o comportamento, os níveis de transcritos, proteínas e a metilação de DNA gene-específica em estruturas encefálicas de animais submetidos ao LH.....	52
Experimento 1: Efeito da administração sistêmica <u>aguda</u> do inibidor de DNMTs 5-AzaD sobre o comportamento de ratos submetidos ao LH - <u>Determinação da dose efetiva (Efeito Agudo)</u>	52
Experimento 2: Avaliação de efeito <u>sustentado</u> após administração sistêmica aguda do inibidor de DNMTs 5-AzaD sobre o comportamento de ratos submetidos ao LH - <u>Determinação da dose efetiva (Efeito Sustentado)</u>	53
Experimento 3: Efeito da administração sistêmica, <u>aguda ou sustentada</u> , do inibidor de DNMTs 5-AzaD sobre o comportamento de ratos submetidos ao LH.....	53
Experimento 4: Efeito da administração sistêmica <u>aguda</u> do inibidor de DNMTs RG108 sobre o comportamento de ratos submetidos ao LH - <u>Determinação da dose efetiva (Efeito Agudo)</u>	54
Experimento 5: Avaliação do efeito <u>sustentado</u> após administração sistêmica aguda do inibidor de DNMTs RG108 em ratos submetidos ao LH - <u>Determinação da dose efetiva (Efeito Sustentado)</u>	55
Experimento 6: Efeito da administração sistêmica, <u>aguda ou sustentada</u> , do inibidor de DNMTs RG108 sobre o comportamento de ratos submetidos ao LH.....	56
Experimento 7: Efeito da administração sistêmica, <u>aguda ou sustentada</u> , de RG108 sobre os níveis de RNAm, proteínas e da metilação de DNA em genes candidatos no encéfalo de ratos submetidos ao PT no LH – <u>Coleta das amostras</u>	57
Experimento 8: Efeito da administração sistêmica, <u>aguda ou sustentada</u> , de RG108 sobre os níveis de RNAm de genes candidatos no encéfalo de ratos submetidos ao PT no LH	58
Experimento 9: Efeito da administração sistêmica, <u>aguda ou sustentada</u> , de RG108 sobre a metilação do DNA em genes candidatos no encéfalo de ratos submetidos ao PT no LH.....	58
Experimento 10: Efeito da administração sistêmica, <u>aguda ou sustentada</u> , de RG108 sobre os níveis de proteínas de genes candidatos no encéfalo de ratos submetidos ao PT no LH.....	59
 4 ANÁLISE ESTATÍSTICA	61
 5 RESULTADOS	63

5.1 Parte I: Efeito de antidepressivos sobre o comportamento, o nível de transcritos, proteínas e a metilação do DNA gene-específica em estruturas encefálicas de animais submetidos ao LH.....	63
Experimento 1: Efeito da administração sistêmica, <u>aguda ou repetida</u> , do antidepressivo fluoxetina sobre o comportamento de ratos submetidos ao LH	63
Experimento 2: Efeito da administração sistêmica, <u>aguda ou repetida</u> , do antidepressivo imipramina sobre o comportamento de ratos submetidos ao LH	65
Experimento 3: Efeito da administração sistêmica, <u>aguda ou repetida</u> , de imipramina sobre os níveis de RNAm, proteínas e da metilação de DNA em genes candidatos no encéfalo de ratos submetidos ao PT no LH – <u>Coleta das amostras</u>	67
Experimento 4: Efeito da administração sistêmica, <u>aguda ou repetida</u> , de imipramina sobre os níveis de RNAm de genes candidatos no encéfalo de ratos submetidos ao PT no LH.....	67
Experimento 4.1: Análise da pureza e integridade do RNA isolado	67
Experimento 4.2: Análise dos normalizadores	68
Experimento 4.3: Análise dos níveis de RNAm no hipocampo dorsal	72
Experimento 4.4: Análise dos níveis de RNAm no hipocampo ventral.....	82
Experimento 4.5: Análise dos níveis de RNAm no córtex pré-frontal.....	92
Experimento 5: Efeito da administração sistêmica, <u>aguda ou repetida</u> , de imipramina sobre a metilação do DNA em genes candidatos no encéfalo de ratos submetidos ao PT no LH..	102
Experimento 6: Efeito da administração sistêmica, <u>aguda ou repetida</u> , de imipramina sobre os níveis de proteínas de genes candidatos no encéfalo de ratos submetidos ao PT no LH...	102
5.2 Parte II: Efeito de DNMTi sobre o comportamento, os níveis de transcritos, proteínas e a metilação de DNA gene-específica em estruturas encefálicas de animais submetidos ao LH.....	102
Experimento 1: Efeito da administração sistêmica <u>aguda</u> do inibidor de DNMTs 5-AzaD sobre o comportamento de ratos submetidos ao LH - <u>Determinação da dose efetiva (Efeito Agudo)</u>	102
Experimento 2: Avaliação de efeito <u>sustentado</u> após administração sistêmica aguda do inibidor de DNMTs 5-AzaD sobre o comportamento de ratos submetidos ao LH - <u>Determinação da dose efetiva (Efeito Sustentado)</u>	104
Experimento 3: Efeito da administração sistêmica, <u>aguda ou sustentada</u> , do inibidor de DNMTs 5-AzaD sobre o comportamento de ratos submetidos ao LH.....	106
Experimento 4: Efeito da administração sistêmica <u>aguda</u> do inibidor de DNMTs RG108 sobre o comportamento de ratos submetidos ao LH - <u>Determinação da dose efetiva (Efeito Agudo)</u>	108
Experimento 5: Avaliação de efeito <u>sustentado</u> após administração sistêmica aguda do inibidor de DNMTs RG108 em ratos submetidos ao LH - <u>Determinação da dose efetiva (Efeito Sustentado)</u>	110
Experimento 6: Efeito da administração sistêmica, <u>aguda ou sustentada</u> , do inibidor de DNMTs RG108 sobre o comportamento de ratos submetidos ao LH.....	112

Experimento 7: Efeito da administração sistêmica, <u>aguda ou sustentada</u> , de RG108 sobre os níveis de RNAm, proteínas e da metilação de DNA em genes candidatos no encéfalo de ratos submetidos ao PT no LH – <u>Coleta das amostras</u>	114
Experimento 8: Efeito da administração sistêmica, <u>aguda ou sustentada</u> , de RG108 sobre os níveis de RNAm de genes candidatos no encéfalo de ratos submetidos ao PT no LH	114
Experimento 8.1: Análise da pureza e integridade do RNA isolado	114
Experimento 8.2: Análise dos normalizadores	115
Experimento 8.3: Análise dos níveis de RNAm no hipocampo dorsal	119
Experimento 8.4: Análise dos níveis de RNAm no hipocampo ventral	129
Experimento 8.5: Análise dos níveis de RNAm no córtex pré-frontal.....	139
Experimento 9: Efeito da administração sistêmica, <u>aguda ou sustentada</u> , de RG108 sobre a metilação de DNA em genes candidatos no encéfalo de ratos submetidos ao PT no LH.....	149
Experimento 9.1: Análise da pureza e integridade do DNA isolado	149
Experimento 9.2: Análise da sonicação do DNA	149
Experimento 9.3: Análise dos normalizadores	150
Experimento 9.4: Análise da metilação de DNA no gene do BDNF no córtex pré-frontal ...	153
Experimento 9.5: Análise da metilação de DNA no gene do TrkB no córtex pré-frontal	155
Experimento 10: Efeito da administração sistêmica, <u>aguda ou sustentada</u> , de RG108 sobre os níveis de proteínas de genes candidatos no encéfalo de ratos submetidos ao PT no LH...	157
 6 DISCUSSÃO	160
 7 LIMITAÇÕES DO TRABALHO	170
 8 CONCLUSÃO.....	172
 9 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	174

INTRODUÇÃO

1 INTRODUÇÃO

1.1 Depressão

A depressão maior é um transtorno psiquiátrico complexo e debilitante, com amplo espectro de sintomas incluindo necessariamente humor deprimido e anedonia, acompanhados de três ou mais dos seguintes sintomas: distúrbios do sono, apetite e energia, concentração reduzida, sentimento excessivo de culpa ou desvalia, além de ideias suicidas, há no mínimo duas semanas (American Psychiatric Association, 2013). De acordo com o Manual Diagnóstico e Estatístico de Transtornos Mentais (DSM-5), o diagnóstico clínico desse transtorno associa-se ao número e duração dos sintomas presentes. Na depressão maior, o paciente apresenta cinco ou mais dos sintomas citados, há no mínimo duas semanas (American Psychiatric Association, 2013).

A depressão afeta em média 20% da população global (Vigo et al., 2018), podendo comprometer seriamente a função social do indivíduo, reduzindo significativamente sua qualidade de vida, e aumentando consideravelmente o risco de suicídio (Kessler et al., 2006; Bijl & Ravelli, 2000; Fredman et al., 1988). A Organização Mundial da Saúde estima que, em 2030, esta será a principal causa de incapacitação em indivíduos de nações desenvolvidas (WHO, 20017). No entanto, sua etiologia ainda não é totalmente conhecida. Estudos epidemiológicos têm identificado a importante contribuição de fatores genéticos, dada a alta concordância entre gêmeos monozigóticos afetados pela doença (Sullivan et al., 2000) e a existência de polimorfismos capazes de tornar indivíduos mais susceptíveis ao desenvolvimento da depressão (Fabbri et al., 2013). No entanto, há evidências de que a influência de fatores genéticos seria modulada por fatores ambientais, principalmente a exposição a situações estressantes (Higuchi et al., 2011). Por exemplo, há relatos de que o primeiro episódio de depressão é precedido por evento estressante em cerca de 60% dos casos descritos (Post & Silberman, 1994). Além disso, há evidências de maior prevalência de episódios estressantes na história de vida de indivíduos deprimidos em comparação a indivíduos saudáveis, sugerindo que o estresse seja um fator ambiental que constitui um maior risco para o desenvolvimento da doença (Peyrot et al., 2013).

Apesar de ser possível tratar a depressão há décadas, o quadro depressivo só é revertido após tratamento crônico (de 2 a 4 semanas) com as drogas antidepressivas atualmente disponíveis. Além disso, cerca da metade dos casos não responde a nenhum medicamento

(Berton & Nestler, 2006) e, dentre os pacientes que respondem, 2/3 não apresentam remissão completa dos sintomas (Rosenzweig-Lipson et al., 2007; Shelton et al., 2010), o que contribui para risco de suicídio. Esses dados evidenciam a necessidade de uma melhor compreensão da fisiopatologia deste transtorno para, assim, poder oferecer subsídios para o desenvolvimento de tratamentos mais rápidos e eficazes.

1.2 Modelos animais sensíveis a antidepressivos

Nos estudos sobre a depressão, modelos animais são essenciais para uma melhor compreensão dos mecanismos biológicos envolvidos em sua fisiopatologia. Devido a íntima relação entre estresse e depressão, muitos modelos animais envolvem o estudo das alterações comportamentais e fisiológicas induzidas pela pré-exposição a um evento estressante inescapável, como o choque inescapável nas patas ou desamparo aprendido (*learned helplessness*, LH, Sherman et al., 1982).

O maior problema encontrado consiste na validação dos modelos animais. Um modelo animal de depressão ideal deveria apresentar grande semelhança com o fenômeno e sua patofisiologia em humanos (validade de face), etiologia comparável (validade de constructo teórico) e responder aos mesmos tratamentos que são eficazes na doença (validade preditiva) (Willner & Mitchell, 2002; Anisman & Matheson, 2005; Vollmayr et al., 2007). Em virtude de sua complexidade, é bastante difícil mimetizar em animais de laboratório os diversos sintomas presentes na depressão em humanos, além de ser impossível diagnosticar um animal como estando deprimido (Cryan et al., 2002). Atualmente, nenhum modelo animal satisfaz completamente esses critérios de validade, sendo frequentemente utilizados por responderem ao estresse e ao tratamento com antidepressivos (Söderlund & Lindskog, 2018).

O modelo do desamparo aprendido baseia-se na observação de alterações comportamentais e fisiológicas induzidas por choques incontroláveis e inescapáveis nas patas (Overmier & Seligman, 1967; Willner, 1984; O'neil & Moore, 2003). Esse modelo foi desenvolvido na década de 60 a partir de estudos em animais submetidos ao condicionamento Pavloviano clássico, onde os animais receberam choques (estímulo não condicionado) precedidos de som (estímulo condicionado), resultando em mudanças comportamentais posteriores como prejuízo na memória associativa (Overmier & Seligman, 1967; Seligman & Maier, 1967). O objetivo do teste era avaliar o efeito do condicionamento ao som sobre o comportamento de esquiva aos choques, no entanto animais previamente submetidos aos

choques incontrolláveis permaneciam passivos aos choques (com pouca ou nenhuma esquivas). Esse comportamento foi denominado “desamparo aprendido” e associado a falta de motivação e sentimento de desamparo, também presente em pacientes deprimidos (Seligman & Beagley, 1975). Assim, desamparo aprendido refere-se a um estado mental em pacientes que não conseguem controlar estímulos desagradáveis e perdem a disposição ou capacidade de evitar futuros eventos estressantes. De fato, animais desamparados apresentam diversas alterações neurovegetativas associadas a depressão, tais como alteração no peso corporal e no comportamento sexual (Dess et al., 1988), além de níveis elevados de fator de liberação de corticotrofina (CRF), envolvido com a coordenação das respostas neuroendócrinas, autonômicas, comportamentais e imunológicas frente a estímulos estressores (Fox & Lowry, 2013), bem como de corticosterona, hormônio glicocorticóide associado ao eixo hipófise-pituitária-adrenal – HPA e liberado durante episódios de estresse (Mora et al., 2012). Posteriormente, verificou-se que, de forma semelhante ao ocorrido em humanos deprimidos, animais submetidos a este modelo não são sensíveis ao tratamento agudo com antidepressivos (Sherman et al., 1982; Joca et al., 2003; Stanquini et al., 2017).

Dessa forma, o LH apresenta validade de face, além da vantagem de ser sensível apenas ao tratamento repetido (mínimo de 5 a 7 dias), apresentando assim excelente validade preditiva e sendo considerado um modelo bastante interessante para estudar a fisiopatologia da depressão (Vollmayr & Henn, 2001; Yan et al., 2010). Portanto, o LH tem sido empregado como ferramenta experimental para o estudo de alterações comportamentais, neuroquímicas e moleculares induzidas pelo estresse e pelo tratamento com antidepressivos, com o objetivo de melhor compreender a neurobiologia da depressão (Willner, 1990; Willner & Mitchell, 2002).

O protocolo do LH compreende 3 fases: 1) indução de alterações comportamentais: na qual os animais recebem choques elétricos inescapáveis (CI, randomicamente aplicados) nas patas ou cauda ou nenhum choque (controle) (Chourbaji et al., 2005); 2) recuperação: período de no mínimo 24h para consolidação da memória aversiva e; 3) teste: fase em que os animais recebem choques escapáveis (CE). Animais que não recebem os choques inescapáveis na fase 1 (pré-teste, PT), apresentam maior número de respostas comportamentais com objetivo de evitar ou interromper a apresentação dos choques escapáveis, enquanto que os animais submetidos aos choques na sessão PT apresentam prejuízo nas respostas de fuga e/ou esquivas dos choques escapáveis, resultado em maior número de falhas de escape. Assim, a resposta comportamental associada ao desamparo aprendido é avaliada a partir do número de falhas de escape (Vollmayr & Henn, 2001). Nesse contexto, o número de cruzamentos entre os choques

é um parâmetro utilizado para avaliar a atividade locomotora do animal (Besson et al., 1996; Seligman & Maier, 1967; Geoffroy & Christensen, 1993).

1.3 Teorias sobre a neurobiologia da depressão e mecanismo de ação dos antidepressivos

A descoberta dos primeiros antidepressivos e de seus mecanismos de ação trouxeram evidências científicas que permitiram o surgimento da teoria monoaminérgica da depressão (Schildkraut, 1965; Coppen, 1972; Schildkraut, 1995; Castren, 2005). Essa teoria preconiza que a neurotransmissão monoaminérgica encontra-se prejudicada em indivíduos deprimidos, sendo restaurada após tratamento crônico com antidepressivos, uma vez que esses atuam inibindo a recaptação ou a metabolização de monoaminas. Ainda hoje, os antidepressivos prescritos para uso clínico, como antidepressivos tricíclicos e inibidores seletivos da recaptação de serotonina, são fármacos que atuam favorecendo essa neurotransmissão. Assim, os tratamentos atualmente disponíveis ainda têm como alvo principal a restauração da neurotransmissão monoaminérgica. No entanto, a teoria monoaminérgica é passível de críticas, uma vez que não explica a existência do período de latência para o efeito terapêutico considerando que a inibição da recaptação ou da metabolização ocorrem agudamente (Castren, 2005; Ferrari & Villa, 2017).

Buscando compreender o que ocorreria entre o início do tratamento e o aparecimento dos efeitos, foi sugerido que o tratamento repetido levaria a alterações plásticas essenciais para o desenvolvimento do efeito esperado. Tem sido demonstrado, por exemplo, a ocorrência de alterações plásticas no cérebro de animais tratados cronicamente com antidepressivos, tais como a redução da atrofia dendrítica em neurônios piramidais no hipocampo e no córtex pré-frontal, bem como a restauração da neurogênese hipocampal em animais estressados (Malberg & Duman, 2003; Rodrigues et al., 2009; Liu et al., 2017). Assim, foi preconizada a hipótese molecular ou neurotrófica da depressão (Duman et al., 1997; Agid et al., 2007), que pressupõe que o estresse prejudicaria a neurotransmissão monoaminérgica desencadeando uma cascata de eventos intracelulares que resultaria na diminuição da expressão de genes importantes para a plasticidade celular, como o fator neurotrófico derivado do cérebro (BDNF), que está relacionado com a arborização dendrítica e com a neurogênese (Agid et al., 2007; Kimpton, 2012). Tais alterações resultariam em disfunções em estruturas límbicas que culminariam no desenvolvimento de alterações comportamentais e emocionais, como as que ocorrem na depressão. Nesse contexto, o tratamento repetido com antidepressivos restauraria esses prejuízos por meio da regulação da neurotransmissão monoaminérgica e subsequentemente da

expressão desses genes e da plasticidade celular (Castren & Rantamaki, 2010; Kimpton, 2012). Portanto, a regulação da expressão gênica tem sido proposta como um importante mecanismo molecular que poderia mediar adaptações em longo prazo relacionadas tanto à resposta ao estresse quanto à latência para o início do efeito induzido por drogas antidepressivas (Tsankova et al., 2007; Krishnan & Nestler, 2008; Harmer et al., 2017).

1.4 Estruturas encefálicas associadas a depressão

Diversas estruturas límbicas e circuitos cerebrais estão associados a resposta ao estresse, à depressão e ao efeito terapêutico de antidepressivos, tais como hipocampo, amígdala, hipotálamo, núcleo accumbens e córtex pré-frontal (Nestler et al., 2002; Berton & Nestler, 2006; Krishnan e Nestler, 2008; Price e Drevets, 2010). De fato as alterações plásticas e neuroquímicas, nessas estruturas, têm sido associadas à neurobiologia da depressão (Andrade & Rao, 2010).

O hipocampo (HPC) é uma estrutura encefálica límbica subcortical, intimamente relacionada ao aprendizado, memória, adaptação ao estresse e depressão. Redução no volume hipocampal é um achado bastante comum em pacientes deprimidos, acompanhada de diminuição da neurogênese (Sheline et al., 2003; Lorenzetti et al., 2009). Em modelos animais, diversas alterações hipocampais são induzidas em consequência da exposição ao estresse inescapável, tais como: diminuição no número e comprimento de espinhos dendríticos, perda sináptica e prejuízo na neurogênese adulta (Pittenger & Duman, 2008; Serafini, 2012), sugerindo redução na conectividade e na neurotransmissão hipocampal (Andrade & Rao, 2010). Tais alterações podem ser atenuadas pelo tratamento crônico com antidepressivos, o que tem se mostrado necessário para o efeito comportamental de fármacos antidepressivos (Castren & Rantamaki, 2010; Kimpton, 2012). Estudos sugerem que as porções dorsal e ventral do HPC seriam molecularmente e funcionalmente distintas (Leonardo et al., 2006; Fanselow & Dong, 2010; Grigoryan & Segal, 2016), inclusive na resposta ao estresse e ao tratamento com antidepressivos (Tanti & Belzung, 2013; Diniz et al., 2018). Diante disso, torna-se importante considerar as diferenças entre as sub-regiões hipocampais em estudos que avaliam a resposta ao estresse e a fármacos antidepressivos.

Outra estrutura intimamente relacionada à neurobiologia da depressão e que está conectada ao hipocampo e outras estruturas límbicas é o córtex pré-frontal (CPF). Evidências demonstram que o CPF desempenha papel importante na cognição, aprendizagem, memória,

tomada de decisão, além de participar da modulação de respostas comportamentais, autonômicas e endócrinas ao estresse (Barbas, 1995; Liston et al., 2006; Quirk et al., 2006; Resstel & Correa, 2006; Resstel et al., 2006; Girotti et al., 2018). Disfunções nessa estrutura parecem estar relacionadas com o desenvolvimento de doenças mentais associadas ao estresse, como a depressão e o transtorno de estresse pós-traumático – PTSD (Geuze et al., 2008; Pereira et al., 2013). Assim como acontece no HPC, estudos demonstram que a exposição de animais a eventos estressantes promove mudanças plásticas no CPF, tais como atrofia apical dendrítica, redução da sinaptogênese e redução do volume cortical, enquanto que antidepressivos revertem tais alterações morfológicas apresentadas (Duncan et al., 1996; Cook & Wellman, 2004; Rocher et al., 2004; Brown et al., 2005; Czeh et al., 2008). Corroborando esses dados, pacientes deprimidos apresentam alterações na atividade e no volume cortical, e tais alterações também são sensíveis ao tratamento crônico com antidepressivos (Harmer et al., 2006; Fitzgerald et al., 2008; Koenigs et al., 2008; Yoshimura et al., 2010). Além disso, o efeito antidepressivo de fármacos de ação rápida, como a ketamina (antagonista de receptores glutamatérgicos tipo NMDA, N-metil-D-aspartato), tem sido associado a promoção de alterações neuroplásticas no CPF, tais como recuperação da arborização dendrítica e sinaptogênese (Dwyer & Duman, 2013; Abdallah et al., 2016).

1.5 Epigenética e seus mecanismos

O genoma humano engloba cerca de 20 mil genes compostos de sequências de DNA que carregam informações essenciais ao crescimento, desenvolvimento e sobrevivência normal do organismo. Para facilitar o empacotamento da longa fita de DNA (2m) no compacto núcleo de células eucarióticas (10µm de diâmetro), o DNA apresenta-se no núcleo dessas células associado a proteínas histonas, não-histonas e RNA formando uma estrutura altamente complexa e organizada chamada cromatina. A unidade fundamental e funcional da cromatina é o nucleossoma, formado por um envoltório de 146 pares de bases (pb) de DNA cercado por um octâmero de histonas com 4 proteínas histonas (H2A, H2B, H3 e H4). Processos de reparo, replicação, recombinação, transcrição, abertura e fechamento dinâmico da estrutura da cromatina são mecanismos fundamentais para a homeostase celular e do organismo (Hauer & Gasser, 2017).

Na década de 40, Conrad Hal Waddington, embriologista e geneticista indiano, buscava explicar como distintos tipos celulares poderiam ser gerados a partir de células contendo o

mesmo genoma comum, gerando assim diferentes fenótipos que seriam resultantes da interação entre genes e ambiente. Ele acreditava que os genes eram importantes para determinar o desenvolvimento do organismo, mas que algumas modificações poderiam ocorrer alterando o desenvolvimento normal, e a isso ele chamou de embriologia causal ou “epigenética” (Slack, 2002). A definição de epigenética vem sendo aprimorada ao longo dos anos, sendo compreendida hoje como o modo pelo qual as experiências e o ambiente podem acarretar alterações estáveis na estrutura da cromatina, alterando a expressão gênica e a codificação de proteínas sem que haja alterações na sequência de bases do ácido desoxirribonucleico, DNA (Holliday, 2006).

As características biológicas da cromatina vêm sendo amplamente estudadas experimentalmente desde o século 19. Em 1884, Albrecht Kossel identificou as histonas e determinou que essas proteínas básicas encontravam-se associadas ao DNA e, pelo grande achado, recebeu o Prêmio Nobel em Fisiologia e Medicina em 1910. A partir de então houve um grande aumento no número de estudos bioquímicos sobre a estrutura e função das histonas (Grayson & Guidotti, 2013). Transições entre eucromatina e heterocromatina estão associadas a transcrição ativa ou inativa, respectivamente, sendo mediadas por modificações na estrutura das histonas que constituem o nucleossoma (Jenuwein & Allis, 2001).

As modificações nas histonas ocorrem principalmente nas histonas 3 (H3) e 4 (H4) e compreendem fosforilação, ubiquitinação, acetilação e deacetilação, assim como metilação e demetilação (Mersfelder & Parthun, 2006; Bannister & Kouzarides, 2011). Com relação aos aminoácidos ao longo das caudas das histonas, a lisina (K) e arginina (R) são sujeitas a metilação, enquanto que K também é alvo para a acetilação (Jenuwein & Allis, 2001). Na acetilação, as histonas são acetiladas em resíduos K na ramificação N-terminal como parte da regulação genética, sendo catalisada pelas enzimas histonas acetiltransferases (HATs). Na deacetilação, por sua vez, as histonas acetiladas perdem o grupo acetil pela ação das enzimas histonas deacetilases (HDACs, Grayson & Guidotti, 2013). A acetilação de histonas, associada com cromatina descondensada e ativação transcricional, tem sido considerada um mecanismo envolvido na neurobiologia da depressão e na ação dos antidepressivos por permitir a expressão de genes importantes para a plasticidade celular (Strekalova et al., 2004; Krishnan & Nestler, 2008).

Além de modificações pós-traducionais nas caudas das histonas (por exemplo, metilação, acetilação, fosforilação e ubiquitinação), os mecanismos epigenéticos englobam modificações covalentes (por exemplo, metilação de DNA), e mecanismos não-traducionais de

silenciamento gênico (por exemplo, micro-RNAs, ácido ribonucleico) (Krishnan & Nestler, 2008; Kim et al., 2009).

Ainda, tem sido proposto que mecanismos epigenéticos promovem efeitos de longa duração em neurônios maduros, podendo assim interferir com complexos mecanismos neurais, tais como plasticidade e neurogênese (Tsankova et al., 2007). De fato, a remodelação da cromatina decorrente de alteração epigenética modula a expressão gênica na medida em que o aumento (heterocromatina) ou diminuição (eucromatina) da condensação da cromatina dificulta ou facilita, respectivamente, o acesso da maquinaria transcricional a regiões promotoras específicas, resultando em mudança nos níveis de RNA mensageiros (RNAm) e de proteínas expressas (Tsankova et al., 2006; Tsankova et al., 2007; Krishnan & Nestler, 2008).

As modificações epigenéticas têm sido relacionadas a neurobiologia de várias doenças psiquiátricas (Tsankova et al., 2007;; Mitchelmore & Gede, 2014; Cattaneo et al., 2015; Barlett et al., 2017; Uchida et al., 2018), sendo que as modificações em histonas e a metilação de DNA têm sido os mecanismos mais estudados até o momento. Por ter sido alvo de investigação no presente trabalho, os mecanismos relacionados à metilação de DNA encontram-se descritos abaixo.

1.5.1 Metilação de DNA

A metilação do DNA consiste na adição de um radical metil no carbono 5 da citosina em dinucleotídeos citosina-fosfato-guanina. Em células de mamíferos, a metilação de DNA ocorre frequentemente em citosinas localizadas nas chamadas ilhas CpGs (ICGs, regiões com alta frequência desses nucleotídeos) (Gardiner-Garden & Frommer, 1987). Esse mecanismo é catalisado pelas enzimas DNA metiltransferases (DNMTs), detalhadas a seguir. A primeira sugestão de que a metilação (ou demetilação) de DNA desempenhasse um importante papel biológico foi feita por Griffith e Mahler, que propuseram, em 1969, que este mecanismo poderia ser a base para a memória de longo prazo (Griffith e Mahler, 1969). Em 1975, foi sugerido por outros dois grupos de pesquisadores que a metilação de DNA produziria efeitos pronunciados na expressão gênica, ou seja, a mudança nos níveis de metilação de DNA resultaria na repressão de diferentes genes (Holliday & Pugh, 1975; Riggs, 1975). Esses trabalhos também propunham que o padrão de metilação era herdado através da ação de uma enzima metilase de manutenção capaz de reconhecer DNA hemi-metilado após a replicação, mas incapaz de agir no DNA não

metilado, e dessa forma, a atividade do gene mantinha o padrão parental, sendo que a metilação de DNA estaria associada a inatividade do gene.

Mais recentemente, a metilação do DNA tem sido implicada na regulação da atividade gênica no cérebro adulto, em condições normais e patológicas. É sabido que os eventos intracelulares de transdução de sinal, entre outras funções, ativam ou inibem fatores de transcrição. A regulação da atividade transcricional por fatores de transcrição vinculados ao DNA depende da interação de vários desses fatores com co-ativadores ou co-repressores e da estrutura subjacente da cromatina. A remodelação da cromatina está, portanto, intimamente ligada à ativação ou repressão de genes pela atividade sináptica. Tais mecanismos regulam a expressão de conjuntos específicos de genes neuroniais que são importantes para a atividade neural, sobrevivência, morfologia, integração e regulação do comportamento (Zuckerandl, 1975; Whitehouse et al., 2007; Sweatt, 2016; Uchida et al., 2018). Assim, a metilação de DNA está envolvida com o desenvolvimento e a função neuronal (Feng et al., 2010), porém mais estudos são necessários para compreender sua importância em neurônios pós-mitóticos e no sistema nervoso central (SNC).

A metilação de DNA é catalisada pela família das enzimas DNMTs que compreende cinco subtipos (DNMT1, DNMT2, DNMT3a, DNMT3b e DNMT3L), sendo que três delas (DNMT1, DNMT3a e DNMT3b) são funcionais e amplamente estudadas. A DNMT1 é conhecida como uma metilase de manutenção, copiando a metilação pré-existente no DNA parental para o DNA da célula-filha durante a fase de replicação. As DNMTs 3a e 3b, por sua vez, são as responsáveis pelas novas metilações em sequências CpG não metiladas (Jeltsch, 2006). Além dessas, ainda encontra-se a DNMT2 inativa ou com baixa atividade tanto em estudos *in vitro* quanto *in vivo* (Herman & Baylin, 2003; Liu et al., 2003) e, a DNMT3L também inativa, importante no estabelecimento da metilação pelo recrutamento das DNMTs ativas (Bourc'his et al., 2001; Bourc'his & Bestor, 2004; Ooi et al., 2007; Hervouet et al., 2018).

Durante a proliferação celular, a DNMT1 localiza-se em focos de replicação e primariamente metila o DNA de células-filhas não metiladas de modo que o padrão de metilação parental seja mantido através das gerações. Em células em divisão, a DNMT1 está concentrada em sítios replicantes durante a fase S a fim de manter a metilação de DNA após a síntese do DNA da célula-filha, sendo que a deleção desta enzima nas células neurais progenitoras causa hipometilação em neurônios pós-mitóticos no SNC (Feng et al., 2010; Hervouet et al., 2018). No entanto, tem sido demonstrado que ela não participa apenas da manutenção, mas também da formação de novas metilações (Pradhan et al., 1999; Gowher et al., 2005; Hervouet et al., 2018).

As DNMTs 3a e 3b (conhecidas como DNMTs “*de novo*”) estão mais ativamente envolvidas na metilação de DNA não metilado, estabelecendo novo padrão de metilação (Feng et al., 2010; Hervouet et al., 2018). Enquanto a DNMT3b está amplamente expressa nos estágios iniciais de neurogênese (Okano et al., 1999), a DNMT3a está presente tanto no SNC maduro quanto em seu desenvolvimento sugerindo seu envolvimento na regulação da metilação em neurônios tanto embrionários quanto adultos, embora também seja identificada DNMT3b em adultos (Feng et al., 2005, 2010; Hervouet et al., 2018). As duas enzimas frequentemente encontram-se co-localizadas e associadas a regiões de heterocromatina independente do ciclo celular (Bachman et al., 2001), possivelmente a fim de manter a metilação em células pré e pós-mitóticas (Feng et al., 2010; Hervouet et al., 2018).

1.5.2 Drogas inibidoras de DNMTs (DNMTi)

Na década de 60, Piskala e Sorm (1964) sintetizaram as primeiras drogas com possível ação inibitória de DNMTs, 5-Azacidina (5-AzaC) e 5-Aza-2'-deoxicitidina (5-AzaD ou decitabina). Inicialmente elas foram testadas como um inibidor nucleosídico antimetabólico para tratamento de leucemia mielóide aguda. Em 1968, Sorm e Veseley demonstraram que essas drogas apresentam potente efeito antileucêmico em camundongos. Os estudos clínicos iniciaram na década de 80 (Rivard et al., 1981; Momparler et al., 1985) e, corroborando os achados pré-clínicos, indicaram remissão completa em paciente tratados com 5-AzaD (Richel et al., 1991). Em 2004, o *Food and Drug Administration* (FDA) aprovou a primeira droga inibidora de DNMTs (DNMTi, *DNMT inhibitor*), 5-AzaC, e em 2006, a segunda, 5-AzaD. Até então, pouco se conhecia sobre seu mecanismo de ação, sabia-se apenas que essas drogas inibiam a metilação de DNA e que em doses elevadas eram citotóxicas. Estudos posteriores mostraram que genes envolvidos com o desenvolvimento e a progressão do câncer encontravam-se hipermetilados e aqueles associados com a supressão do tumor estavam hipometilados em células tumorais de indivíduos doentes (Stresemann & Lyko, 2008). O tratamento com DNMTi, por sua vez, revertia esse padrão de metilação reativando genes supressores de tumor, como o p15, associado ao crescimento tumoral (Yoo & Jones, 2006; Momparler, 2005; Karahoca & Momparler, 2013).

DNMTi são divididas em 2 grupos: nucleosídicos e não-nucleosídicos. DNMTi nucleosídicos, como o 5-AzaC e 5-AzaD, são análogos à citidina, incorporando-se na molécula de DNA durante a replicação e se ligando covalentemente a enzima DNMT, impedindo assim

a metilação de DNA. Os inibidores não-nucleosídicos como o RG108 [2-(1,3-dioxi-1,3-diidro-2H-isoindol-2-il)-3-(1H-indol-3-il)ácido propanóico], por sua vez, bloqueiam o sítio catalítico da enzima, impedindo sua ação enzimática e sendo, portanto, independente de divisão celular (Lyko & Brown, 2005). Drogas DNMTi apresentam ampla distribuição nos fluidos corporais, atravessando a barreira hemato-encefálica (Marcucci et al., 2005; Schneeberger et al., 2015) e, possivelmente revertendo situações onde ocorra aumento de metilação em células do SNC.

1.6 Metilação de DNA, estresse e depressão

Vários estudos com modelos animais sugerem que a desregulação transcricional ocasionada por mecanismos epigenéticos acarretaria manifestações comportamentais presentes em diversas doenças psiquiátricas, incluindo a depressão (Charney & Manji, 2004; Krishnan & Nestler, 2008; Kular & Kular, 2018). De fato, a maior parte dos transtornos psiquiátricos apresenta uma substancial predisposição genética associada à contribuição de fatores ambientais, os quais também podem modular a expressão gênica através da interferência com mecanismos epigenéticos (Tsankova et al., 2007; Borrelli et al., 2008). Champagne e colaboradores (2003) mostraram, por exemplo, que eventos estressantes nos primeiros anos de vida deixam marcas epigenéticas persistentes no organismo, sugerindo um caráter duradouro para essas modificações.

McGowan e colaboradores (2008) demonstraram que gêmeos monozigóticos acumulam profundas diferenças epigenéticas em consequência das variadas experiências vivenciadas ao longo do seu desenvolvimento. Além disso, estudos com animais revelam que o estresse na fase inicial do desenvolvimento resultaria em alterações epigenéticas persistentes no genoma capazes de alterar a expressão gênica e influenciar nas funções neurais e comportamentais na fase adulta (Weaver et al., 2004; Tsankova et al., 2006). De fato, animais que receberam poucos cuidados maternos (*low maternal care*) apresentaram ansiedade aumentada e redução na expressão de receptores para glicocorticóides (GRs) no HPC, em comparação aos filhotes que receberam cuidados maternos adequados. Essa redução era mediada pelo aumento da metilação na região promotora do gene para esses receptores, reprimindo efetivamente a expressão deste gene, e consequente síntese de proteínas (Szyf et al., 2007; Tsankova et al., 2007). Cabe ressaltar que alteração na expressão desses receptores no HPC é reduzida pelo estresse e aumentada pelo tratamento crônico com drogas antidepressivas (Lopez-Figueroa et al., 1998),

sendo, portanto, a regulação da expressão desses receptores frequentemente associada à neurobiologia da depressão (Gallagher et al., 2009; Hunsberger et al., 2009; Schule et al., 2009).

Corroborando a hipótese do envolvimento de mecanismos epigenéticos na patofisiologia das doenças mentais, estudos em humanos deprimidos demonstram alteração nos níveis da metilação de DNA em diversos genes como, por exemplo, nos genes para o BDNF e para GR (Weaver et al., 2004; Oberlander et al., 2008; McGowan et al., 2009; Murgatroyd et al., 2009; Elliott et al., 2010; Keller et al., 2010; Uchida et al., 2011; Hing et al., 2018; Efstathopoulos et al., 2018). Miller e Sweat (2007) mostraram também que a metilação de DNA encontra-se aumentada em regiões promotoras do gene para proteína fosfatase 1 (PP1), importante para a plasticidade celular, no HPC de ratos estressados.

Estudos em humanos demonstram aumento da metilação em genes para GR no HPC de indivíduos suicidas com história de abuso na infância (Poulter et al., 2008; McGowan et al., 2009). Níveis elevados de metilação do DNA no gene para GR também foram detectados no sangue de recém-nascidos, cujas mães apresentaram depressão nos três primeiros meses gestacionais, sugerindo que a desregulação do eixo HPA, associada a depressão (Holsboer, 2000), pode ser mediada por mecanismos epigenéticos (Oberlander et al., 2008).

Tem sido proposto que a metilação de DNA regularia a função e estrutura da cromatina em resposta a diferentes eventos estressores mediando a expressão de genes associados a plasticidade neuronal, sendo que tais mudanças podem ser estáveis e duradouras, em diferenças estruturais encefálicas associadas ao estresse e depressão, tais como CPF e HPC (Vialou et al., 2013). Buscando uma melhor compreensão desse processo, nosso grupo de pesquisa avaliou se a inibição da metilação induzida por estresse promoveria efeitos tipo-antidepressivos em testes pré-clínicos (Sales et al., 2011; Sales & Joca, 2016). Nossos resultados mostraram pioneiramente que o tratamento com DNMTi, 5-AzaC, 5-AzaD e RG 108 induz efeito tipo-antidepressivo em modelos animais. Além disso, demonstramos que os animais tratados sistemicamente apresentavam diminuição no padrão global de metilação e aumento na expressão do BDNF hipocampal, sugerindo que o estresse levaria ao aumento da metilação de DNA resultando em uma diminuição na expressão de genes importantes para a plasticidade celular, como o BDNF, e consequente comportamento tipo-depressivo (Sales & Joca, 2011).

Em conjunto, esses estudos fortalecem a ideia de que o cérebro possui mecanismos controlados epigeneticamente que afetam a regulação da expressão de genes envolvidos na modulação de processos emocionais e seus distúrbios correlacionados, de modo que a desregulação desses mecanismos em uma ou mais regiões que compõe as áreas cerebrais sensíveis ao evento estressante contribui para a fisiopatologia das desordens associadas ao

estresse, como a depressão. Tal assertiva é sustentada, ainda, pela observação de que o tratamento repetido com antidepressivos induz alterações epigenéticas, como a metilação de DNA, em diferentes genes regulando assim sua expressão.

Além disso, foi demonstrado que níveis reduzidos de P11, considerado um modulador chave da função neuronal na patofisiologia da depressão, no CPF de roedores estavam associados com elevados níveis de metilação de DNA em regiões promotoras do seu gene, além da redução transcricional em dois outros genes (DNMT1 e 3a), associados com a manutenção da metilação de DNA em neurônios adultos. Esses efeitos foram revertidos pelo tratamento com antidepressivo (Melas et al., 2012).

Zimmerman e colaboradores (2012) avaliaram a atividade da DNMT1 em astrócitos (do córtex de ratos) tratados com diferentes antidepressivos. Eles demonstraram que os tricíclicos e a paroxetina (inibidor seletivo da recaptação de serotonina) reduzem a atividade da DNMT1. Isso não foi observado com a venlafaxina (inibidor da recaptação de serotonina e noradrenalina) ou estabilizadores de humor, carbamazepina e ácido valpróico, sugerindo que os antidepressivos são capazes também de afetar a atividade desta enzima. Além disso, os autores demonstraram que esse efeito não era decorrente da ligação à enzima, mas da diminuição da expressão de uma enzima que realiza metilação de histonas e, com isso, acarreta maior metilação de DNA.

Nesse sentido, demonstramos que o estresse de choques inescapáveis nas patas induz aumento nos níveis globais da metilação de DNA, assim como na expressão de DNMTs, no HPC dorsal e CPF de ratos, enquanto que o tratamento repetido (7 dias), mas não agudo, com imipramina reduz os níveis no CPF (Sales & Joca, 2018), sugerindo que a regulação da metilação de DNA seja um mecanismo importante na modulação das alterações comportamentais induzidas pelo estresse e no efeito de drogas antidepressivas.

Assim, os resultados anteriores somados ao fato de que a sinalização intracelular no cérebro regula a remodelação da cromatina, que o estresse altera o nível de metilações de DNA (Tsankova et al., 2007) e que os mecanismos epigenéticos estão envolvidos na regulação de vários processos neurais relacionados ao desenvolvimento da depressão, tem sustentado o aumento no número de estudos focados nesses mecanismos. LaPlant e colaboradores (2010) demonstraram que a inibição de DNMTs no núcleo accumbens (NAc) diminui a latência para imobilidade em animais submetidos ao FST, efeito considerado tipo-antidepressivo. Efeito similar é observado no HPC e CPF de animais submetidos a diferentes modelos animais (FST, TST e LH; Sales et al., 2011; Sales & Joca, 2016). No córtex orbital por sua vez, a administração de DNMTi induz efeito pró-depressivo, sugerindo que a regulação da metilação de DNA é

dependente da estrutura cerebral (Xing et al., 2014). Dessa forma, sugere-se que alterações induzidas pelo estresse na metilação de DNA e consequente transcrição de genes específicos em diferentes regiões cerebrais possa estar associada ao aparecimento das suas consequências comportamentais e emocionais.

Portanto, várias evidências sustentam a hipótese da participação de mecanismos epigenéticos, como a metilação de DNA, na patofisiologia da depressão, embora mais estudos sejam necessários visando uma melhor compreensão desses processos. A regulação da expressão de diferentes genes, tais como BDNF, TrkB, 5-HT_{1A}, NMDA e AMPA, tem sido associada a depressão e ação de drogas antidepressivas (Tsankova et al., 2007; Krishnan & Nestler, 2008). Nesse sentido, o BDNF desempenha um papel crucial no crescimento, sobrevivência, diferenciação e plasticidade neuronal (Huang & Reichardt, 2001), sendo que seus níveis encontram-se reduzidos no HPC e córtex de suicidas (Dwivedi et al., 2003; Karege et al., 2005; Pandey et al., 2008). A expressão de BDNF é regulada por remodelamento epigenético da cromatina, incluindo a metilação de DNA (Homberg et al., 2014). De fato, tem sido demonstrado que o aumento na metilação em regiões promotoras no gene para BDNF está relacionado a diminuição na síntese neuronal dessa proteína (Martinowich et al., 2003). Estudos demonstram que um aumento na metilação no gene para BDNF relaciona-se a depressão em modelos animais e em humanos (Tsankova et al., 2006; Fuchikami et al., 2011), sugerindo uma associação entre os fatores. Kang e colaboradores (2013) observaram em humanos deprimidos que a hipermetilação no promotor do gene para BDNF associa-se a maior incidência de tentativas e ideias suicidas (Kang et al., 2013).

Os principais efeitos do BDNF são mediados pela ligação da sua forma madura ao domínio extracelular do receptor tirosina quinase tipo B, TrkB, seguida de dimerização e ativação do domínio tirosina quinase intracelular (Minichiello, 2009), resultando na autofosforilação dos resíduos de tirosina, que funcionam como sítios para interação de proteínas, ativando assim as cascatas de sinalização intracelular, incluindo as vias Ras-MAPK (Ras-proteína quinase associada a microtúbulos) e PI3K/Akt (fosfatidil inositol-3 quinase/serina treonina quinase; Yoshii & Constantine-Paton, 2010). Keller e colaboradores (2011) demonstraram a presença de hipermetilação nos genes para TrkB, acompanhada da redução nos seus níveis expressos, no córtex e HPC de indivíduos suicidas. A influência do BDNF na transmissão serotoninérgica, e vice-versa, tem sido demonstrada em estudos *in vitro* e *in vivo*, inclusive em humanos (Henningsson et al., 2009; Homberg et al., 2014).

O BDNF pode influenciar a liberação de serotonina (neurotransmissor monoaminérgico) através da modulação de vias intracelulares ativadas pela ligação dessa

neurotrofina ao seu receptores TrkB (Homberg et al., 2014). Em cultura de células hipocampais, o BDNF aumentou a capacidade dos receptores 5-HT_{1A} ativarem proteínas G, um efeito eliminado em nocaute TrkB, sugerindo que a ativação desse receptor aumenta a função do receptor 5-HT_{1A} (Burke et al., 2013). Assim, o aumento na metilação acompanhada de redução de BDNF pode resultar na diminuição da função serotoninérgica, que está associada a depressão (Henningsson et al., 2009).

Os sintomas associados a depressão tem sido associados ao desbalanço na neurotransmissão serotoninérgica normal (Deakin & Graeff, 1991; Graeff et al., 1996; Hale et al., 2012). Nesse sentido, estudos clínicos sugerem que a reduzida função de receptores serotoninérgicos tipo 1A (5-HT_{1A}) está associada com a depressão (Cheetham et al., 1990; Stockmeier et al., 1998). Joca e colaboradores (2003) demonstraram que o bloqueio intra-hipocampal da recaptação de serotonina, assim como a administração de antagonista seletivo 5-HT_{1A} (WAY-100635), impede a alteração comportamental induzida pelo estresse em ratos submetidos ao desamparo aprendido. A ativação desses receptores em estruturas prosencefálicas reverte o comportamento induzido pelo estresse e o tratamento crônico com antidepressivos aumentam sua expressão nessas estruturas (Carr & Lucki, 2011). Mais recentemente, foi relatado que a serotonina e o BDNF são capazes de modular a resposta comportamental ao estresse e mediar a eficácia terapêutica de antidepressivos através de mecanismos epigenéticos (Homberg et al., 2014). Além disso, o receptor 5-HT_{1A} é capaz de modular os níveis de BDNF em resposta ao tratamento antidepressivo (Ivy et al., 2003) e sua expressão pode ser regulada por metilação (Boersma et al., 2014), sendo também de interesse para o presente estudo.

No entanto, a neurobiologia da depressão ainda não está clara. Há mais de 20 anos, foi demonstrado que o antagonismo de receptores NMDA induz efeito tipo-antidepressivo em modelos pré-clínicos (Trullas & Skolnick, 1990) sendo que esse efeito aconteceria de forma rápida e sustentada clinicamente (Berman et al., 2000; Zarate et al., 2006). Ainda, o tratamento crônico mas não agudo com antidepressivos de classes diferentes como inibidores seletivos da recaptação de serotonina e tricíclicos produz alterações adaptativas em receptores NMDA consistentes com a sua redução funcional (Skolnick et al., 1996). Os receptores NMDA compreendem uma família de receptores glutamatérgicos amplamente distribuídos no SNC de mamíferos. Esses canais possuem sítios bloqueados constitutivamente pelo cátion Mg²⁺ (membrana em potencial de repouso), sendo que a ligação de um agonista a estes sítios resulta na ativação do canal. A despolarização da membrana desbloqueia o canal e na presença de glutamato ou glicina (ou D-serina, outro ligante endógeno do sítio da glicina) o canal catiônico

é aberto, permitindo o influxo de íons Ca^{2+} e Na^{2+} para dentro da célula. Duas principais famílias de subunidades, NR1 e NR2, além da subunidade modulatória NR3 foram identificadas. Receptores NMDA funcionais são formados por tetrâmeros com 2 subunidades NR1 e duas NR2. A subunidade NR3 é incapaz de formar receptores homoméricos, enquanto que os formados por NR2 não são funcionais e os constituídos por NR1, embora possuam correntes iônicas baixas, apresentam-se funcionais. Aqueles receptores que co-expressam NR1, NR2 e NR3 resultam por sua vez em uma resposta alterada. Quatro subunidades NR1 (A, B, C e D) e oito *splice* variantes de NR2 foram identificadas (Skolnick et al., 2009).

Antagonistas NMDA como AP-7 e MK-801, assim como o agonista parcial de glicina (ACPC) induzem efeito tipo-antidepressivo em diferentes modelos animais, como FST, teste de suspensão pela cauda (TST) e estresse crônico variado. Ainda, infusão de ketamina (antagonista NMDA) em humanos reduz acentuadamente o *score* na escala Hamilton (HAM-D), utilizada clinicamente para avaliar a severidade dos sintomas comuns em indivíduos deprimidos, sustentando as evidências de que antagonistas NMDA induzem efeito antidepressivo (Berman et al., 2000; Skolnick et al., 2009; Lener et al., 2017). Dessa forma, a neurotransmissão glutamatérgica tem sido associada a patofisiologia da depressão, assim como a ação de drogas antidepressivas (revisado em Musazzi et al., 2013). Os antidepressivos reduzem a liberação de glutamato e a função do receptor NMDA, regulando (*downregulation*) as cascatas iniciadas pela modulação desses receptores glutamatérgicos ionotrópicos (Skolnick et al., 2009).

O glutamato liberado pelo neurônio pré-sináptico pode interagir também com receptores pós-sinápticos ionotrópicos AMPA (α -amino-3-hidroxil-5-metil-ácido 4-isoxazolpropionico) permitindo a entrada de íons Na^{2+} e mediando a despolarização rápida na maioria das sinapses cerebrais (Hashimoto, 2009). Tem sido sugerido que o efeito tipo-antidepressivo da ketamina dependa de desinibição glutamatérgica seguida de ativação de receptores AMPA (Hashimoto, 2011), uma vez que o pré-tratamento com NBQX (antagonista AMPA) atenua seu efeito em camundongos, além de regular a fosforilação de sua subunidade GluR1 no hipocampo (Maeng, 2008). Ainda, diversos moduladores positivos desses receptores (drogas capazes de diminuir sua taxa de dessensibilização e/ou desativação na presença de um agonista) apresentam efeito tipo-antidepressivo em diferentes modelos animais de depressão (Alt, 2006; O'Neill & Witkin, 2007; Sanacora, 2008), sendo que a administração de antagonista AMPA bloqueia tal efeito (Li et al., 2010).

Dessa forma, a neurotransmissão glutamatérgica tem sido associada a patofisiologia da depressão, assim como a ação de drogas antidepressivas (revisado em Musazzi et al., 2013).

Uma vez que esses receptores são regulados por metilação de DNA (Chandrasekar, 2013; Kordi-Tamandani, 2013), existe a possibilidade de que o efeito induzido por moduladores epigenéticos e por antidepressivos convencionais envolva alterações na metilação de DNA nos genes para NMDA e AMPA, assim como a transcrição dos seus RNAm, em animais submetidos ao estresse (por exemplo, desamparo aprendido).

1.7 Hipótese

Diante do exposto anteriormente, a hipótese desse trabalho é de que o tratamento com inibidores de DNMTs, assim como com antidepressivos, reverteria o comportamento induzido pelo estresse em animais submetidos ao modelo do desamparo aprendido. No entanto, uma vez que pertence a uma classe de drogas com mecanismo de ação diferente dos antidepressivos convencionais, os inibidores da metilação seriam capazes de reverter esse efeito comportamental após tratamento agudo, enquanto que os antidepressivos somente após administração repetida. Ainda, essas drogas poderiam também apresentar efeito sustentado uma vez que a metilação de DNA vêm sendo associada a modificações persistentes. Além disso, os inibidores de DNMTs e os antidepressivos poderiam modular os níveis de RNAm e da metilação de DNA de diferentes genes relacionados a patofisiologia da depressão em estruturas límbicas de animais submetidos ao estresse do desamparo aprendido, particularmente HPC (dorsal e ventral) e CPF.

OBJETIVOS

2 OBJETIVOS

O presente estudo teve como objetivo principal investigar a hipótese de que o tratamento com inibidores de DNMTs ou com antidepressivos induziria efeito tipo-antidepressivo no modelo do desamparo aprendido e atenuaria as alterações na metilação de DNA em genes específicos (BDNF, TrkB, 5-HT_{1A}, NMDA e AMPA), bem como na expressão do RNAm dos mesmos, induzida pela exposição ao estresse, em diferentes estruturas encefálicas envolvidas com a neurobiologia da depressão (HPC dorsal, ventral e CPF).

Para tanto, os objetivos específicos foram:

- investigar os efeitos do estresse e da administração sistêmica, aguda e repetida, de antidepressivos (fluoxetina e imipramina) sobre o comportamento de animais submetidos ao LH;
- investigar os efeitos do estresse e da administração aguda de inibidores de DNMTs (5-AzaD e RG108) sobre o comportamento de animais submetidos ao LH;
- investigar os efeitos do tratamento com imipramina sobre os níveis de RNAm, de proteínas e da metilação de DNA de diferentes genes (BDNF, TrkB, 5-HT_{1A}, NMDA e AMPA) em estruturas encefálicas (HPC dorsal, ventral e CPF) de animais submetidos ao LH;
- investigar os efeitos do tratamento com RG108 sobre os níveis de RNAm, de proteínas e da metilação de DNA de diferentes genes (BDNF, TrkB, 5-HT_{1A}, NMDA e AMPA) em estruturas encefálicas (HPC dorsal, ventral e CPF) de animais submetidos ao LH.

MATERIAL E MÉTODOS

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Animais

Foram utilizados ratos *Wistar* com 7 semanas (270-300g), provenientes do Biotério Central do Campus da USP-RP. Os animais foram mantidos agrupados em caixas plásticas (3 rato/caixa de 1147cm²) contendo maravalha durante 1 semana para habituação no biotério do Laboratório de Farmacologia da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto-USP. Após o teste comportamental, os animais foram mantidos isoladamente em caixas plásticas (1 rato/caixa de 570 cm²) contendo maravalha no mesmo biotério durante 1 semana. Durante todo o período, os animais foram trocados de caixa 3 vezes por semana e mantidos em condições controladas: temperatura ($24^{\circ} \pm 1^{\circ}\text{C}$), luz (12h de luz, com ciclo claro iniciando as 06h00) e com livre acesso a alimento e água (trocada diariamente).

Os procedimentos foram conduzidos de acordo com as diretrizes do Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA) dispostas na lei Arouca (11.794/08). Além disso, o presente projeto foi previamente aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais do Campus da USP de Ribeirão Preto (CEUA, Protocolo N. 10.1.136.53.2).

3.2 Fármacos

Para o tratamento farmacológico foram utilizados os seguinte antidepressivos tricíclicos: 1) cloridrato de imipramina (Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA), na dose de 15 mg/Kg (Sales & Joca, 2018): inibidor da recaptação de noradrenalina e serotonina, dissolvido em solução de cloreto de sódio 0,9% estéril; 2) cloridrato de fluoxetina (Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA), um inibidor seletivo da recaptação de serotonina, na dose de 20 mg/Kg (Mendez et al., 2012), dissolvido em Tween 80 2% / solução de NaCl 0,9% estéril.

Foram utilizados também os seguintes inibidores de DNMTs: 5-AzaD (Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA), um inibidor nucleosídico não-seletivo, nas doses de 0,1; 0,2 e 0,6 mg/Kg (Sales et al., 2011), dissolvido em solução de NaCl 0,9% estéril; e RG108 (Tocris Biosciences, USA), um inibidor não-nucleosídico, nas doses de 0,2; 0,4 e 0,6 mg/Kg (Sales et al., 2011), dissolvido em Tween 80 2%/ solução de NaCl 0,9% estéril.

Todas as drogas foram preparadas imediatamente antes do uso.

3.3 Procedimentos experimentais

3.3.1 Modelo do desamparo aprendido (LH) para ratos

Os experimentos foram realizados em caixas de acrílico automatizadas de esquiva ativa para ratos (307 x 333 x 540 mm; modelo EP 11, Insight Equipamentos Científicos), com dois compartimentos de igual tamanho, separados por uma parede com uma porta central aberta (comunicando os dois compartimentos) e equipada com um piso de grade de aço inoxidável através do qual os choques foram aplicados nas patas dos animais. O experimento teve duração de sete dias. No primeiro dia, os animais foram expostos a uma sessão de pré-teste (PT) onde receberam choques inescapáveis nas patas (CI, grupo estressado, 40 choques, 0,4 mA, 10 s de duração, em intervalos de 30-90s), enquanto um grupo independente foi apenas exposto ao aparelho pelo mesmo período (30 min), sem receber choques (controle habituado, Hab). Seis dias depois, os animais foram submetidos ao teste (T, 30 choques escapáveis - CE, 0,4 mA, 10 s de duração - precedidos por 5s de estímulo sonoro, 60 dB, 670 Hz) onde foram registrados: número de fugas (situação na qual o animal cruza para o outro lado da caixa durante o choque e, assim, o interrompe), falhas (situação na qual o animal não cruza para o outro lado da caixa e, assim, não interrompe o choque aplicado) e cruzamentos (número de vezes que o animal cruza para o outro lado da caixa; Sales & Joca, 2018).

Figura 1: Desenho representativo do modelo do Desamparo Aprendido. PT: pré-teste; T: teste; CI: choques inescapáveis; Hab: habituação; CE: choques escapáveis.

3.3.2 Coleta de tecidos

Os animais foram submetidos a sessão PT (CI) e aos tratamentos farmacológicos correspondentes a cada um dos grupos experimentais. No dia 7, 1h após a última injeção, os animais foram profundamente anestesiados com hidrato de cloral 5% (10 ml/Kg) e decapitados em seguida. As estruturas encefálicas (HPC dorsal, HPC ventral e CPF) foram dissecadas e armazenadas em -80°C até o momento da análise. Um grupo adicional não estressado e não tratado (naive) foi conduzido paralelamente para controle das análises moleculares.

Figura 2: Desenho representativo do protocolo experimental para coleta das amostras. PT: pré-teste; CI: choques inescapáveis.

3.3.3 Preparação das amostras e avaliação da expressão gênica por PCR quantitativo em tempo real

A partir do tecido dissecado foi isolado o RNAm com o kit (SV Total RNA Isolation System, Promega), segundo instruções do fabricante. A integridade do RNA foi verificada por eletroforese em gel de agarose 1,5% em TAE (tampão TRIS-acetato-EDTA). Como marcador de ácido nucleico foi utilizado Gel Red Nucleid Acid Gel Stain (Biotium; 3 µL/100 mL de gel). 3 µL de RNA de cada amostra foi submetido a corrida eletroforética (40 minutos, 100V) e as bandas de RNA (28 e 18 S) foram visualizadas através de um transiluminador com luz ultravioleta (Kasvi). As amostras foram quantificadas através do nanofotômetro (P360 Implen) e seu grau de pureza foi determinado através da razão entre as absorbâncias medidas a 260 e 280 nm (A_{260}/A_{280}). O RNA isolado foi considerado adequado para o uso posterior uma vez que estivesse puro e com a A_{260}/A_{280} entre 1,75 e 2,0.

Então, foi realizada a construção do DNA complementar (cDNA) e a pré-amplificação utilizando os kits apropriados (#4374966, LifeTech), também de acordo com as instruções do fabricante. A análise da expressão gênica foi feita por meio de qPCR-*real time* utilizando ensaios TaqMan (LifeTech) nos quais as amostras foram analisadas em triplicata, com o auxílio do aparelho StepOnePlus™ Real-Time PCR Systems (Applied Biosystems). A análise dos níveis de transcritos de BDNF IV (#AI5IRKS), TrkB (#Rn01441749_m1), 5-HT_{1A} (#Rn00561409_s1), NMDA2a (#Rn00561341_m1) e AMPA1 (#Rn00709588_m1), genes sabidamente envolvidos na neurobiologia da depressão e com expressão regulada por metilação do DNA; Jin et al., 2011; Kang et al., 2013; Keller et al., 2011; Boersma et al., 2014; Chandrasekar, 2013; Thompson et al., 2011; Kundakovic et al., 2007), foi realizada utilizando o método $2^{-\Delta\Delta C_t}$. YWHAZ (#Rn00755072_m1), ACTB (#Rn00667869_m1) e HPRT1 (#Rn01527840_m1) foram utilizados como normalizadores endógenos das reações (“housekeeping gene”; Bonfeld et al., 2008). Para cada amostra, o valor de ΔC_t foi obtido subtraindo o valor de C_t do normalizador do valor de C_t do gene de interesse, enquanto que o $\Delta\Delta C_t$ corresponde a subtração do ΔC_t médio do grupo controle pelo ΔC_t da amostra. Assim, os resultados dos genes de interesse foram normalizados por cada um dos normalizadores e também pela média aritmética dos três normalizadores.

3.3.4 Preparação das amostras, imunoprecipitação do DNA metilado (MeDIP) e avaliação da metilação gene-específica de DNA por PCR quantitativo em tempo real

A avaliação da metilação nos genes candidatos cuja expressão gênica é sabidamente regulada por metilação de DNA (BDNF IV, TrkB, 5-HT_{1A}, NMDA e AMPA) foi realizada pelo método de imunoprecipitação de DNA metilado (MeDIP) associado a PCR em tempo real (Ventskovska et al., 2015). Neste método, a imunoprecipitação é utilizada para isolar fragmentos de DNA metilado que serão indiretamente identificados pela associação do anticorpo específico para a 5-metil citosina (5-mC) no DNA. Para tanto, o tecido dissecado foi imediatamente colocado em nitrogênio líquido e armazenado a -80°C até o momento do uso. O DNA total presente na amostra foi extraído com o kit Wizard Genomic DNA Purification (#A1120, Promega) de acordo com instruções do fabricante. As amostras foram quantificadas através do espectrofotômetro (Nanophotometer P360 Implen) e seu grau de pureza foi determinado através da razão entre as absorbâncias medidas a 260 e 280 nm (A_{260}/A_{280}). O

DNA isolado foi considerado adequado para o uso posterior uma vez que A_{260}/A_{280} estivesse entre 1,75 e 2,0.

O DNA foi sonicado (Sonics Vibracell; 6 pulsos de 20 segundos, intervalo de 40 segundos entre os pulsos e amplitude 40%) para a obtenção de fragmentos entre 200-1000 pares de base (pb; Karpova & Umemori, 2015). Uma alíquota de DNA não sonicado foi estocada para controle da sonicação. Amostras de DNA, sonicadas e não sonicadas, foram submetidas a eletroforese em gel de agarose 1,5 % em TAE (tampão TRIS-acetato-EDTA). Como marcador de ácido nucléico foi utilizado Gel Red Nucleid Acid Gel Stain (Biotium; 3 μ L/100 mL de gel). 3 μ L de DNA de cada amostra foi submetido a corrida eletroforética (40 minutos, 100V). Ao fim da corrida, o gel foi analisado através de um transiluminador com luz ultravioleta (Kasvi). Além das amostras de DNA sonicadas e não sonicadas, um marcador de DNA (Promega 100 pb DNA Ladder Molecular Weight Marker) foi utilizado para mensurar o nível de sonicação obtido.

Uma vez confirmada a sonicação do DNA no tamanho desejado (200-1000 pb), uma alíquota de amostra sonificada foi armazenada para normalização dos resultados em função do DNA total não imunoprecipitado (*input*). Com o restante da amostra sonificada foi realizada a imunoprecipitação do DNA metilado usando anticorpo anti-5mC (Abcam, #ab2828) precipitando assim o DNA metilado. O DNA imunoprecipitado (IP) foi purificado pelo kit Wizard DNA *clean-up* System (#A7280, Promega) e, posteriormente, foi submetido à reação de PCR em tempo real para identificação e quantificação do conteúdo dos genes candidatos, utilizando ensaios TaqMan (LifeTech) nos quais as amostras foram analisadas em triplicata, com o auxílio do aparelho StepOnePlus™Real-Time PCR Systems (Applied Biosystems). A análise dos níveis de transcritos de BDNF IV (#AI5IRKS) e TrkB (#Rn01441749_m1) foi realizada utilizando o método $2^{-\Delta\Delta C_t}$. YWHAZ (#Rn00755072_m1), ACTB (#Rn00667869_m1) e HPRT1 (#Rn01527840_m1) foram utilizados como normalizadores endógenos das reações (“*housekeeping gene*”). Para cada amostra, o valor de ΔC_t foi obtido subtraindo o valor de C_t do normalizador do valor de C_t do gene de interesse, enquanto que o $\Delta\Delta C_t$ corresponde a subtração do ΔC_t médio do grupo controle pelo ΔC_t da amostra. Assim, os resultados dos genes de interesse foram normalizados por cada um dos normalizadores e também pela média aritmética dos três normalizadores. O nível de metilação de cada gene candidato foi expresso como a razão do DNA IP pelo DNA total (Karpova & Umemori, 2015).

3.3.5. Preparação das amostras e quantificação dos níveis de BDNF por *Enzyme-Linked Immunosorbent Assay* (ELISA)

O tecido armazenado foi processado para posteriormente ser analisado por ELISA, de acordo com as instruções do fabricante (BDNF Emax® ImmunoAssay Systems, Promega). Resumidamente, o tecido foi homogeneizado em tampão de lise (Tris-HCl 20 mM pH 8,0; NaCl 137 mM; glicerol 10%) suplementado com inibitor de protease (10% v/v; # P2714, Sigma - Aldrich) e centrifugado (4°C, 9000g, 15 minutos). O sobrenadante foi coletado para análise posterior. Uma placa de 96 poços foi incubada *overnight* com 100 µL de anticorpo monoclonal anti-BDNF/ tampão carbonato (pH 9,7) a 4°C, bloqueada por 1 h com 200 µL de tampão de bloqueio, em temperatura ambiente, e lavada uma vez com tampão TBST (Tris-HCl 20mM pH 7,6; NaCl 150 mM 0,05%; Tween 20). Em seguida, 100 µL de amostra ou padrão BDNF (1:2000 - 1:2 diluição seriada) foram adicionadas em cada poço e a placa foi novamente incubada a temperatura ambiente por 2h. Os poços foram lavados cinco vezes com TBST e incubados com 100 µL de anticorpo policlonal *anti-human* BDNF diluído em tampão de bloqueio, em temperatura ambiente por 2 horas. Posteriormente, 100 µL de *anti-IgY conjugated with HRP* diluído em tampão de bloqueio foi adicionado e a placa foi incubada por 1h a temperatura ambiente. Os poços foram, então, lavados cinco vezes com TBST e 100 µL da solução TMB (disponível no kit) foi adicionada em cada poço. Dez minutos depois, a reação foi interrompida pela adição de 100 µL de HCl 1 N. A quantidade de BDNF foi determinada pelo leitor de placas SpectraMax 190 (Version 6.2.1, Molecular Devices, Sunnyvale, CA, USA; absorvância em 450 nm) e calculado com base na curva padrão mostrando uma relação direta entre densidade óptica e concentração de BDNF. Os resultados foram expressos como pg de BDNF por mg de proteína total. A medida de proteínas totais foi realizada pelo ensaio colorimétrico de Bradford (Bradford, 1976) utilizando o soro de albumina bovina como padrão.

3.4 Delineamento experimental

3.4.1 Parte I: Efeito de antidepressivos sobre o comportamento, o nível de transcritos e a metilação de DNA gene-específica em estruturas encefálicas de animais submetidos ao LH.

Esse conjunto de experimentos foi realizado a fim de investigar: 1) o efeito comportamental do tratamento com antidepressivos (fluoxetina ou imipramina) em animais submetidos ao LH; 2) se o estresse dos choques nas patas altera os níveis de RNAm, assim como a metilação de DNA, em diferentes genes (BDNF IV, TrkB, 5-HT_{1A}, NMDA2a e AMPA1) em estruturas encefálicas relacionadas a neurobiologia da depressão (HPC dorsal, ventral e CPF); e 3) se o tratamento repetido, mas não agudo, com antidepressivos reverte as alterações induzidas pelo estresse sobre os níveis de RNAm e metilação de DNA.

Experimento 1: Efeito da administração sistêmica, aguda ou repetida, do antidepressivo fluoxetina sobre o comportamento de ratos submetidos ao LH

Os animais foram submetidos ao PT (grupo estressado: CI, e grupo habituado: Hab) e, imediatamente após, receberam uma injeção sistêmica de fluoxetina (20 mg/Kg, intraperitoneal, i.p.) ou veículo (10 mL/Kg), as quais foram administradas diariamente por mais seis dias, sendo que a última injeção foi realizada 1h antes do T (CE). No grupo agudo, os animais receberam seis injeções de salina e uma de fluoxetina, 1h antes do T (Fig. 3). Assim, tivemos 2 grupos de animais (estressado e habituado), divididos em 3 subgrupos de tratamento (veículo, fluoxetina agudo e repetido), portanto um total de 6 grupos com 9-10 animais/grupo. Subtotal: 56 animais.

Figura 3: Desenho experimental (Experimento 1 - Parte I). PT: pré-teste; T: teste.

Experimento 2: Efeito da administração sistêmica, aguda ou repetida, do antidepressivo imipramina sobre o comportamento de ratos submetidos ao LH

Os animais foram submetidos ao PT (grupo estressado: CI, e grupo habituado: Hab) e, imediatamente após, receberam uma injeção sistêmica de imipramina (15 mg/Kg, i.p.) ou veículo (10 mL/Kg), as quais foram administradas diariamente por mais seis dias, sendo que a última injeção foi realizada 1h antes do T (CE). No grupo agudo, os animais receberam seis injeções de salina e uma de imipramina, 1h antes do T (Fig. 4). Assim, tivemos 2 grupos de animais (estressado e habituado) divididos em 3 subgrupos de tratamento (veículo, imipramina agudo e repetido), portanto um total de 6 grupos com 9-10 animais/grupo. Subtotal: 57 animais.

Figura 4: Desenho experimental (Experimento 2 - Parte I). PT: pré-teste; T: teste.

Experimento 3: Efeito da administração sistêmica, aguda ou repetida, de imipramina sobre os níveis de RNAm e da metilação de DNA em genes candidatos no encéfalo de ratos submetidos ao PT no LH – Coleta das amostras

Os animais foram submetidos ao PT (CI) e, imediatamente após, receberam uma injeção i.p. de imipramina (15 mg/Kg) ou veículo (10 mL/Kg), as quais foram administradas diariamente por mais 6 dias, sendo que a última injeção foi realizada 1h antes do sacrifício e dissecação das estruturas encefálicas (HPC dorsal, ventral e CPF; Fig. 5) para análise posterior dos níveis de RNAm (Exp. 4) e da metilação de DNA em genes candidatos (BDNF IV, TrkB, 5-HT_{1A}, NMDA2a e AMPA1; Exp. 5). Além disso, um grupo naïve (não estressado e não tratado) também foi conduzido para controle das análises moleculares. Assim, tivemos 3 grupos de tratamentos (veículo, imipramina agudo e repetido), além de 1 grupo naïve, portanto um

total de 4 grupos com 6 animais/grupo. Subtotal: 24 animais. As amostras ficaram armazenadas a -80°C até o momento do uso.

Figura 5: Desenho experimental (Experimento 3 - Parte I). PT: pré-teste; CI: choques inescapáveis.

Experimento 4: Efeito da administração sistêmica, aguda ou repetida, de imipramina sobre os níveis de RNAm de genes candidatos no encéfalo de ratos submetidos ao PT no LH

As amostras armazenadas foram processadas, o RNA isolado, sua integridade e pureza avaliadas, e o cDNA construído. As qPCR-RT para os alvos pré-escolhidos (BDNF IV, TrkB, 5-HT_{1A}, NMDA2a e AMPA1) foram então realizadas e os dados obtidos analisados (Fig. 6).

Figura 6: Desenho experimental (Experimento 4 - Parte I). cDNA: DNA complementar.

Experimento 5: Efeito da administração sistêmica, aguda ou repetida, de imipramina sobre a metilação de DNA em genes candidatos no encéfalo de ratos submetidos ao PT no LH

As amostras armazenadas foram processadas, o DNA isolado, sua integridade e pureza avaliadas. O DNA foi, então, sonicado e o DNA metilado imunoprecipitado. Entretanto, embora as amostras tenham sido processadas, a análise dos níveis de metilação nos genes candidatos (BDNF IV, TrkB, 5-HT1_A, NMDA2a e AMPA1), nas estruturas encefálicas de interesse não foi realizada (Fig. 7), uma vez que alterações significativas nos níveis de transcritos induzidas pelo estresse e/ou tratamento não foram observadas.

Figura 7: Desenho experimental (Experimento 5 - Parte I). pb: pares de bases; MeDIP: imunoprecipitação de DNA metilado.

Experimento 6: Efeito da administração sistêmica, aguda ou repetida, de imipramina sobre os níveis de proteínas de genes candidatos no encéfalo de ratos submetidos ao PT no LH

As amostras armazenadas foram processadas para posterior análise dos níveis proteicos dos genes candidatos (BDNF IV, TrkB, 5-HT1_A, NMDA2a e AMPA1), nas estruturas encefálicas de interesse. Entretanto, essas medidas não foram realizadas, uma vez que alterações significativas nos níveis de transcritos induzidas pelo estresse e/ou tratamento não foram observadas.

3.4.2 Parte II: Efeito de DNMTi sobre o comportamento, os níveis de transcritos e a metilação de DNA gene-específica em estruturas encefálicas de animais submetidos ao LH

Esse conjunto de experimentos foi realizado a fim de investigar: 1) se drogas que inibem as enzimas DNMTs, diferente dos antidepressivos convencionais, induzem efeito tipo-antidepressivo agudo e sustentado em animais submetidos ao LH; 2) se o estresse dos choques nas patas altera os níveis de RNAm, assim como a metilação de DNA, de diferentes genes (BDNF IV, TrkB, 5-HT_{1A}, NMDA2a e AMPA1) em estruturas encefálicas relacionadas a neurobiologia da depressão (HPC dorsal, ventral e CPF); e 3) se o tratamento agudo com DNMTi reverte as alterações induzidas pelo estresse sobre os níveis de RNAm e metilação de DNA.

Experimento 1: Efeito da administração sistêmica aguda do inibidor de DNMTs 5-AzaD sobre o comportamento de ratos submetidos ao LH - Determinação da dose efetiva (Efeito Agudo)

Esse experimento foi realizado a fim de identificar a dose de 5-AzaD capaz de induzir efeito tipo-antidepressivo em animais submetidos ao LH, uma vez que o efeito dessa droga ainda não havia sido investigado nesse modelo. Para tanto, os animais foram submetidos ao PT (CI, dia 1). Seis dias depois (dia 7), os animais receberam uma injeção i.p. de 5-AzaD (0,1; 0,2 e 0,6 mg/Kg) ou veículo (10 mL/Kg). Uma hora após a injeção, os animais foram submetidos ao T (CE; Fig. 8). Assim, tivemos um total de 4 grupos (veículo, 5-AzaD doses: 0,1; 0,2 e 0,6 mg/Kg) com 10 - 11 animais/grupo. Subtotal: 42 animais.

Figura 8: Desenho experimental (Experimento 1 - Parte II). PT: pré-teste; T: teste.

Experimento 2: Avaliação do efeito sustentado após administração sistêmica aguda do inibidor de DNMTs 5-AzaD em ratos submetidos ao LH - Determinação da dose efetiva (Efeito Sustentado)

Esse experimento foi realizado a fim de identificar a dose de 5-AzaD capaz de induzir efeito sustentado em animais submetidos ao LH. Para tanto, os animais foram submetidos ao PT (CI, dia 1). Imediatamente depois, os animais receberam uma injeção i.p. de 5-AzaD (0,2 e 0,6 mg/Kg) ou veículo (10 mL/Kg). Seis dias depois, os animais foram submetidos ao T (CE; Fig. 9). Assim, tivemos um total de 3 grupos (veículo, 5-AzaD doses: 0,2 e 0,6 mg/Kg) com 10 animais/grupo. Subtotal: 30 animais.

Figura 9: Desenho experimental (Experimento 2 - Parte II). PT: pré-teste; T: teste; CI: choques inescapáveis.

Experimento 3: Efeito da administração sistêmica, aguda ou sustentada, do inibidor de DNMTs 5-AzaD sobre o comportamento de ratos submetidos ao LH

Os animais foram submetidos ao PT (CI ou Hab) e, imediatamente após, receberam uma injeção i.p. de 5-AzaD (0,6 mg/Kg; injeção no dia 1) ou veículo (10 mL/Kg). Seis dias após, os animais foram submetidos ao T (CE). Grupos independentes de animais também foram submetidos ao PT (CI ou Hab), mas receberam uma injeção i.p. apenas 1h antes do T (CE, injeção no dia 7; 5-AzaD: 0,2 mg/Kg ou veículo). Os animais foram, portanto, divididos em três grupos: 1) agudo dia 1: os animais receberam a injeção de droga imediatamente após o PT, 2) agudo dia 7: receberam a injeção de droga 1h antes do T, e 3) veículo: onde os animais receberam a injeção do respectivo veículo nos dias 1 ou 7 (sendo metade do grupo em cada um

dos dias; Fig. 10). Portanto, os animais foram divididos em 2 grupos (estressado e habituado) e 3 subgrupos (veículo, droga dias 1 e 7), totalizando 6 grupos com 10-13 animais/grupo. Subtotal: 65 animais.

Figura 10: Desenho experimental (Experimento 3 - Parte II). PT: pré-teste; T: teste.

Experimento 4: Efeito da administração sistêmica aguda do inibidor de DNMTs RG108 sobre o comportamento de ratos submetidos ao LH - Determinação da dose efetiva (Efeito Agudo)

Esse experimento foi realizado a fim de identificar a dose de RG108 capaz de induzir efeito tipo-antidepressivo em animais submetidos ao LH, uma vez que o efeito dessa droga ainda não havia sido investigado nesse modelo. Para tanto, os animais foram submetidos ao PT (CI, dia 1). Seis dias depois (dia 7), os animais receberam uma injeção i.p. de RG108 (0,2; 0,4 e 0,6 mg/Kg) ou veículo (10 mL/Kg). Uma hora após a injeção, os animais foram submetidos ao T (CE; Fig. 11). Assim, tivemos um total de 4 grupos (veículo, RG108 0,2; 0,4 e 0,6 mg/Kg) com 11 animais/grupo. Subtotal: 44 animais.

Figura 11: Desenho experimental (Experimento 4 - Parte II). PT: pré-teste; T: teste.

Experimento 5: Avaliação do efeito sustentado após administração sistêmica aguda do inibidor de DNMTs RG108 em ratos submetidos ao LH - Determinação da dose efetiva (Efeito Sustentado)

Esse experimento foi realizado a fim de identificar a dose de RG108 capaz de induzir efeito sustentado em animais submetidos ao LH. Para tanto, os animais foram submetidos ao PT (CI, dia 1). Imediatamente depois, os animais receberam uma injeção i.p. de RG108 (0,2; 0,4 e 0,6 mg/Kg) ou veículo (10 mL/Kg). Seis dias depois, os animais foram submetidos ao T (CE; Fig. 12). Assim, tivemos um total de 4 grupos (veículo, RG108 doses: 0,2; 0,4 e 0,6 mg/Kg) com 10 animais/grupo. Subtotal: 40 animais.

Figura 12: Desenho experimental (Experimento 5 - Parte II). PT: pré-teste; T: teste; CI: choques inescapáveis.

Experimento 6: Efeito da administração sistêmica, aguda ou sustentada, do inibidor de DNMTs RG108 sobre o comportamento de ratos submetidos ao LH

Os animais foram submetidos ao PT (CI ou Hab) e, imediatamente após, receberam uma injeção i.p. de RG108 (0,6 mg/Kg; injeção no dia 1) ou veículo (10 mL/Kg). Seis dias após, os animais foram submetidos ao T (CE). Grupos independentes de animais também foram submetidos ao PT (CI ou Hab), mas receberam uma injeção i.p. apenas 1h antes do T (CE, injeção no dia 7; RG108: 0,6 mg/Kg ou veículo). Ainda, a fim de excluir um possível efeito sobre a consolidação da memória, outro grupo de animais recebeu uma injeção i.p. apenas 24h após o PT (injeção no dia 2; RG108: 0,6 mg/Kg ou veículo) (Fig. 13). Os animais foram, portanto divididos em quatro grupos: 1) agudo dia 1: os animais receberam a injeção de droga imediatamente após o PT, 2) agudo dia 2: receberam a injeção de droga 24h após o PT, 3) agudo dia 7: receberam a injeção de droga 1h antes do T, e 4) veículo: onde os animais receberam a injeção do veículo nos dias 1, 2 ou 7 (1/3 do grupo em cada um dos dias). Assim, tivemos 2 grupos de animais (estressado e habituado) divididos em 3 subgrupos de tratamento (RG108 dias 1, 2 e 7), além de 1 subgrupo veículo, portanto um total de 8 grupos com 10 animais/grupo. Subtotal: 80 animais.

Figura 13: Desenho experimental (Experimento 6 - Parte II). PT: pré-teste; T: teste; CI: choques inescapáveis; CE: choques escapáveis; veic: veículo.

Experimento 7: Efeito da administração sistêmica, aguda ou sustentada, de RG108 sobre os níveis de RNAm e da metilação do DNA em genes candidatos no encéfalo de ratos submetidos ao PT no LH – Coleta das amostras

Os animais foram submetidos ao PT (CI) e, imediatamente após, receberam uma injeção i.p. de RG108 (0,6 mg/Kg) ou veículo (10 mL/Kg). Seis dias após, os animais foram sacrificados, seus cérebros removidos e as estruturas cerebrais dissecadas (HPC dorsal, ventral e CPF). Grupos independentes de animais também foram submetidos ao PT (CI), mas receberam uma injeção i.p. de RG108 (0,6 mg/Kg) ou veículo (10 mL/Kg) 24 horas após o PT ou apenas 1h antes do sacrifício. Os animais foram, portanto, divididos em quatro grupos: 1) agudo dia 1: os animais receberam a injeção de droga imediatamente após o PT; 2) agudo dia 2: receberam 24h após o PT; 3) agudo dia 7: receberam a injeção de droga 1h antes do sacrifício, e 4) veículo: onde os animais receberam a injeção do respectivo veículo nos dias 1, 2 ou 7, sendo 1/3 do grupo em cada dia. Um grupo naive (não estressado e não tratado) foi conduzido paralelamente para controle dos experimentos. Assim, tivemos 5 grupos (naive, veículo, RG108 dia1, RG108 dia2 e RG108 dia7), com 10-12 animais/grupo. Subtotal: 52 animais. No dia 7, os animais foram anestesiados, sacrificados e as estruturas cerebrais de interesse dissecadas para análise molecular (Fig. 14). Todos os animais foram submetidos a dissecação das estruturas encefálicas (HPC dorsal, ventral e CPF) para análise posterior de RNAm (Exp. 8) e da metilação de DNA (Exp. 9) em genes candidatos (BDNF IV, TrkB, 5-HT_{1A}, NMDA2a e AMPA1). As amostras ficaram armazenadas a -80° C até o momento do uso.

Figura 14: Desenho experimental (Experimento 7 - Parte II). PT: pré-teste; CI: choques inescapáveis; veic: veículo.

Experimento 8: Efeito da administração sistêmica, aguda ou sustentada, de RG108 sobre os níveis de RNAm de genes candidatos no encéfalo de ratos submetidos ao PT no LH

As amostras armazenadas foram processadas, o RNA isolado, sua integridade e pureza avaliadas, e o cDNA construído. As qPCR-RT para os alvos pré-selecionados (BDNF IV, TrkB, 5-HT_{1A}, NMDA2a e AMPA1) foram então realizadas e os dados obtidos analisados (Fig. 15).

Figura 15: Desenho experimental (Experimento 8 - Parte II). cDNA: DNA complementar.

Experimento 9: Efeito da administração sistêmica, aguda ou sustentada, de RG108 sobre a metilação de DNA em genes candidatos no encéfalo de ratos submetidos ao PT no LH

As amostras armazenadas foram processadas, o DNA isolado, sua integridade e pureza avaliadas. O DNA foi, então, sonicado e o DNA metilado imunoprecipitado. A análise dos níveis de metilação nos genes candidatos cujos níveis de transcritos foram alterados pelo estresse e/ou tratamento nas estruturas encefálicas de interesse foi realizada por meio de qPCR-RT *real time* (Fig. 16).

Figura 16: Desenho experimental (Experimento 9 - Parte II). pb: pares de bases; MeDIP: imunoprecipitação de DNA metilado.

Experimento 10: Efeito da administração sistêmica, aguda ou sustentada, de RG108 sobre os níveis de proteínas de genes candidatos no encéfalo de ratos submetidos ao PT no LH

As amostras armazenadas foram processadas para posterior análise dos níveis proteicos dos genes candidatos (BDNF IV, TrkB, 5-HT1_A, NMDA2a e AMPA1), nas estruturas encefálicas de interesse. As análises foram realizadas apenas nos alvos e estruturas com significativa alteração nos níveis de transcritos induzidas pelo estresse e/ou tratamento com RG108.

ANÁLISE ESTATÍSTICA

4 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os resultados obtidos no teste comportamental (para determinação das doses que serão posteriormente utilizadas), de animais submetidos ao LH, foram comparados utilizando ANOVA de 1 fator seguido do pós-teste de Dunnett. Os resultados comportamentais (incluindo grupos habituados e estressados) foram comparados utilizando ANOVA de 2 fatores (fatores: condição e tratamento) seguido do pós-teste de Bonferroni. Em caso de interações significativas, os efeitos dos tratamentos foram comparados por condição (estressado X habitado ou tratado) por meio de ANOVA de 1 fator seguido do pós-teste de Dunnett.

Os dados moleculares (análise da metilação de DNA, dos níveis de RNAm e proteínas) de animais submetidos ao LH foram analisados utilizando teste T (grupos veículo estressado X naíve não estressado) e ANOVA de 1 fator (grupos tratado X veículo) seguido do pós-teste de Dunnett.

As análises estatísticas foram realizadas usando GraphPad Prism 7.0a (Graph Pad Software, San Diego, CA). Diferenças com $p < 0,05$ foram consideradas significativas em todos os casos.

RESULTADOS

5 RESULTADOS

5.1 Parte I: Efeito de antidepressivos sobre o comportamento, os níveis de transcritos, proteínas e a metilação de DNA gene-específica em estruturas encefálicas de animais submetidos ao LH

Experimento 1: Efeito da administração sistêmica, aguda ou repetida, do antidepressivo fluoxetina sobre o comportamento de ratos submetidos ao LH

A análise dos dados comportamentais indicou que embora não haja interação (ANOVA de 2 fatores; $p > 0,05$; fugas: $F_{2,50}=1,820$; falhas: $F_{2,50}=1,470$), houve diferença estatisticamente significativa entre as condições (habituação e estressado; ANOVA de 2 fatores seguido de Bonferroni; $p < 0,05$; fugas: $F_{1,50}=10,880$; falhas: $F_{2,50}=15,770$), e do tratamento (ANOVA de 2 fatores seguido de Bonferroni; $p < 0,05$; fugas: $F_{2,50}=0,106$, Fig. 17A, e falhas: $F_{2,50}=3,906$, Fig. 17B). A análise do número de cruzamentos entre os choques durante o teste no LH indicou que não houve efeito significativo da condição ($F_{2,50}=0,220$; $p > 0,05$), dos tratamentos utilizados ($F_{2,50}=0,610$; $p > 0,05$), nem interação entre esses fatores ($F_{2,50}=0,045$; $p > 0,05$; Fig. 17C).

Figura 17: Efeito do tratamento com fluoxetina sobre o comportamento de animais submetidos ao desamparo aprendido. Os animais foram submetidos ao PT (grupo estressado recebeu choques inescapáveis e grupo habituado não) e, imediatamente depois, receberam injeção i.p. de veículo ou fluoxetina (20 mg/Kg). Durante os próximos 6 dias, os animais receberam injeção i.p. de veículo ou fluoxetina (20 mg/Kg) e, uma hora após a última injeção, foram submetidos ao teste do LH. A) número de fugas. B) número de falhas. C) número de cruzamentos. Dados representam a média $\pm$ E.P.M. * $p < 0,05$ estressados *versus* habituados; [#] $p < 0,05$ tratado *versus* respectivo veículo; ANOVA de 2 fatores, $n = 9-10$ animais/grupo. veic: veículo; ag: agudo; repet: repetido.

Experimento 2: Efeito da administração sistêmica, aguda ou repetida, do antidepressivo imipramina sobre o comportamento de ratos submetidos ao LH

A análise dos dados comportamentais referentes ao número de fugas, assim como ao número de falhas, indicou que houve interação (fugas: $F_{2,51}=7,857$; falhas: $F_{2,51}=6,744$; $p<0,05$), portanto as condições (estressado e habituado) foram separadas e analisadas por ANOVA de 1 fator. A análise indicou que o tratamento repetido com imipramina aumentou o número de fugas no teste (ANOVA seguido de Dunnett, $F_{2,27}=16,020$; $p<0,05$; Fig. 18A) e reduziu o número de falhas (ANOVA seguido de Dunnett, $F_{2,27}=24,840$; $p<0,05$; Fig. 18B). A análise do número de cruzamentos entre os choques durante o teste no LH indicou que não houve efeito significativo da condição ($F_{1,51}=1,295$; $p>0,05$), dos tratamentos utilizados ($F_{2,51}=1,213$; $p>0,05$), nem interação entre esses fatores ($F_{2,51}=0,231$; $p>0,05$; Fig. 18C).

Figura 18: Efeito do tratamento com imipramina sobre o comportamento de animais submetidos ao desamparo aprendido. Os animais foram submetidos ao pré-teste (grupo estressado recebeu choques inescapáveis e grupo habituado não) e, imediatamente depois receberam injeção i.p. de veículo ou imipramina (15 mg/Kg). Durante os próximos 6 dias, os animais receberam injeção i.p. de veículo ou imipramina (15 mg/Kg) e, uma hora após a última injeção, foram submetidos ao teste do LH. A) número de fugas. B) número de falhas. C) número de cruzamentos. Dados representam a média $\pm$ E.P.M. * $p < 0,05$ estressados *versus* habituados; # $p < 0,05$ tratado *versus* respectivo veículo; ANOVA de 2 fatores, $n = 9-10$ animais/grupo. veic: veículo; ag: tratamento agudo (1h antes do teste); repet: tratamento repetido (7 dias).

Experimento 3: Efeito da administração sistêmica, aguda ou repetida, de imipramina sobre os níveis de RNAm, proteínas e da metilação de DNA em genes candidatos no encéfalo de ratos submetidos ao PT no LH – Coleta das amostras

Esse experimento foi realizado para coletar as amostras a serem utilizadas nos experimentos 4, 5 e 6. As amostras dissecadas ficaram armazenadas a -80°C até o momento do uso.

Experimento 4: Efeito da administração sistêmica, aguda ou repetida, de imipramina sobre os níveis de RNAm de genes candidatos no encéfalo de ratos submetidos ao PT no LH

Experimento 4.1: Análise da pureza e integridade do RNA isolado

Uma alíquota do RNA isolado, de cada uma das amostras, foi submetida a eletroforese em gel de agarose 1,5%. Duas bandas íntegras foram visualizadas pelo transiluminador (radiação ultravioleta) confirmando a integridade das amostras (Fig. 19).

Todas as amostras foram quantificadas e sua pureza determinada. Todas as amostras utilizadas estavam íntegras e com A_{260}/A_{280} entre 1,75 e 2,0.

Figura 19: Eletroforese de amostras de RNA isolado (Parte I). As amostras previamente coletadas foram processadas, o RNA isolado e submetido a eletroforese em gel de agarose onde foi verificada sua integridade. 1-3: amostragem de RNA isolado em 3 diferentes amostras.

O cDNA foi sintetizado e as qPCR-RT foram então realizadas para analisar os níveis de RNAm dos diferentes genes estudados (BDNF IV, TrkB, 5-HT_{1A}, NMDA2a e AMPA1) no HPC dorsal (Exp. 4.3), HPC ventral (Exp. 4.4) e CPF (Exp. 4.5).

Experimento 4.2: Análise dos normalizadores

Como controles internos das reações foram utilizados três normalizadores (YWHAZ, ACTB e HPRT1), a fim de aumentar a confiabilidade nos resultados obtidos. Como observado nas figuras 20, 21 e 22, não houve alteração na expressão de RNAm dos normalizadores utilizados em nenhuma das estruturas estudadas (Teste t de Student: veículo *versus* naive; ANOVA de 1 fator: tratado *versus* veículo, n=6/grupo; P>0,05; **HPC dorsal:** YWHAZ: $t_{10}=0,546$; $F_{2,15}=0,815$; ACTB: $t_{10}=0,546$; $F_{2,15}=0,185$; HPRT1: $t_{10}=0,367$; $F_{2,15}=0,668$; Fig. 20; **HPC ventral:** YWHAZ: $t_{10}=0,314$; $F_{2,15}=0,632$; ACTB: $t_{10}=0,093$; $F_{2,15}=0,652$; HPRT1: $t_{10}=0,798$; $F_{2,15}=0,028$; Fig. 21; **CPF:** YWHAZ: $t_{10}=1,324$; $F_{2,15}=1,289$; ACTB: $t_{10}=1,226$; $F_{2,15}=0,473$; HPRT1: $t_{10}=0,293$; $F_{2,15}=0,526$; Fig. 22). Uma vez que a análise dos dados moleculares não indicou alteração nos valores obtidos de cT (*cycle threshold*) dos controles utilizados, os mesmos foram utilizados como normalizadores dos ensaios posteriores.

Figura 20: Nenhuma alteração foi observada nos valores de cT dos normalizadores YWHAZ, ACTB e HPRT1 no hipocampo dorsal de animais submetidos ao **desamparo aprendido**. Os animais foram submetidos ao pré-teste (choques inescapáveis) e, imediatamente depois receberam injeção i.p. de veículo ou imipramina (15 mg/Kg). Durante os próximos 6 dias, os animais receberam injeção i.p. de veículo ou imipramina (15 mg/Kg) e, uma hora após a última injeção, foram sacrificados, seus cérebros removidos e o hipocampo dorsal dissecado para a análise molecular. Um grupo independente naive (não estressado e não tratado) foi conduzido paralelamente para controle molecular. A) YWHAZ. B) ACTB. C) HPRT1. Dados representam a média $\pm$ E.P.M. Teste t: veículo *versus* naive; ANOVA de 1 fator: tratado *versus* veículo, n=6 animais/grupo. cT: *cycle threshold*; naive: grupo não estressado e não tratado.

Figura 21: Nenhuma alteração foi observada nos valores de cT dos normalizadores YWHAZ, ACTB e HPRT1 no hipocampo ventral de animais submetidos ao desamparo aprendido. Os animais foram submetidos ao pré-teste (choques inescapáveis) e, imediatamente depois receberam injeção i.p. de veículo ou imipramina (15 mg/Kg). Durante os próximos 6 dias, os animais receberam injeção i.p. de veículo ou imipramina (15 mg/Kg) e, uma hora após a última injeção, foram sacrificados, seus cérebros removidos e o hipocampo ventral dissecado para a análise molecular. Um grupo naive (não estressado e não tratado) foi conduzido paralelamente para controle molecular. A) YWHAZ. B) ACTB. C) HPRT1. Dados representam a média $\pm$ E.P.M. Teste t: veículo *versus* naive; ANOVA de 1 fator: tratado *versus* veículo, $n=6$ animais/grupo. cT: *cycle threshold*; naive: grupo não estressado e não tratado.

Figura 22: Nenhuma alteração foi observada nos valores de cT dos normalizadores YWHAZ, ACTB e HPRT1 no córtex pré-frontal de animais submetidos ao desamparo aprendido. Os animais foram submetidos ao pré-teste (choques inescapáveis) e, imediatamente depois receberam injeção i.p. de veículo ou imipramina (15 mg/Kg). Durante os próximos 6 dias, os animais receberam injeção i.p. de veículo ou imipramina (15 mg/Kg) e, uma hora após a última injeção, foram sacrificados, seus cérebros removidos e o córtex pré-frontal dissecado para a análise molecular. Um grupo naive (não estressado e não tratado) foi conduzido paralelamente para controle molecular. A) YWHAZ. B) ACTB. C) HPRT1. Dados representam a média $\pm$ E.P.M. Teste t: veículo *versus* naive; ANOVA de 1 fator: tratado *versus* veículo, n=6 animais/grupo. cT: *cycle threshold*; naive: grupo não estressado e não tratado.

Experimento 4.3: Análise dos níveis de RNAm no hipocampo dorsal

Em todos os ensaios, os resultados são apresentados para cada um dos três normalizadores utilizados (YWHAZ, ACTB e HPRT1; Fig. A, B e C). Para a análise final dos resultados foi considerada a normalização dos dados pela média dos 3 normalizadores utilizados (Fig. D)

A análise dos dados moleculares no hipocampo dorsal não indicou alteração significativa nos níveis de RNAm de **BDNF IV** quando os animais foram estressados, tratados ou não com imipramina (conforme Fig. 23D; Teste t de Student: veículo *versus* naive; ANOVA de 1 fator: tratado *versus* veículo, $p > 0,05$; $n=6/\text{grupo}$; YWHAZ: $t_{10}=0,286$; $F_{2,15}=0,872$; ACTB: $t_{10}=1,744$; $F_{2,15}=0,775$; HPRT1: $t_{10}=0,633$; $F_{2,15}=0,162$; Média: $t_{10}=0,896$; $F_{3215}=0,017$; Fig. 23).

Figura 23: A expressão de RNAm de BDNF IV no hipocampo dorsal de ratos submetidos ao desamparo aprendido não altera com o estresse ou tratamento com imipramina. Os animais foram submetidos ao pré-teste (PT, choques inescapáveis) e, imediatamente depois receberam injeção i.p. de veículo ou imipramina (15 mg/Kg). Durante os próximos 6 dias, os animais receberam injeção i.p. de veículo ou imipramina (15 mg/Kg) e, uma hora após a última injeção, foram sacrificados, seus cérebros removidos e o hipocampo dorsal dissecado para posterior análise molecular. Um grupo naive (não estressado e não tratado) foi conduzido paralelamente para controle molecular. A) normalização por YWHAZ. B) normalização por ACTB. C) normalização por HPRT1. D) normalização pela média de YWHAZ, ACTB e HPRT1. Dados representam a média $\pm$ E.P.M. Teste t: veículo *versus* naive; ANOVA de 1 fator: tratado *versus* veículo, n=6 animais/grupo.

Os níveis de RNAm do receptor **TrkB** no hipocampo dorsal de animais estressados, tratados ou não com imipramina não modificaram significativamente (conforme Fig. 24D; Teste t de Student: veículo *versus* naive; ANOVA de 1 fator: tratado *versus* veículo, $p > 0,05$; $n=6$ /grupo; YWHAZ: $t_{10}=0,408$; $F_{2,15}=7,18$ ($P < 0,05$); ACTB: $t_{10}=0,355$; $F_{2,15}=0,670$; HPRT1: $t_{10}=0,265$; $F_{2,15}=1,585$; Média: $t_{10}=0,713$; $F_{2,15}=0,594$; Fig. 24).

Figura 24: A expressão de RNAm de TrkB no hipocampo dorsal de ratos submetidos ao desamparo aprendido não altera com o estresse ou tratamento com imipramina. Os animais foram submetidos ao pré-teste (PT, choques inescapáveis) e, imediatamente depois receberam injeção i.p. de veículo ou imipramina (15 mg/Kg). Durante os próximos 6 dias, os animais receberam injeção i.p. de veículo ou imipramina (15 mg/Kg) e, uma hora após a última injeção, foram sacrificados, seus cérebros removidos e o hipocampo dorsal dissecado para posterior análise molecular. Um grupo naive (não estressado e não tratado) foi conduzido paralelamente para controle molecular. A) normalização por YWHAZ. B) normalização por ACTB. C) normalização por HPRT1. D) normalização pela média de YWHAZ, ACTB e HPRT1. Dados representam a média $\pm$ E.P.M. Teste t: veículo *versus* naive; ANOVA de 1 fator: tratado *versus* veículo, n=6 animais/grupo. [#]Dunnett $p < 0,05$; tratado *versus* veículo.

Os níveis de transcritos do receptor **5-HT_{1A}** no hipocampo dorsal de animais estressados, tratados ou não com imipramina não apresentaram diferença significativa (conforme Fig. 25D; Teste t de Student: veículo *versus* naïve; ANOVA de 1 fator: tratado *versus* veículo, $p > 0,05$; $n = 6/\text{grupo}$; YWHAZ: $t_{10} = 0,344$; $F_{2,15} = 0,646$; ACTB: $t_{10} = 0,426$; $F_{2,15} = 0,297$; HPRT1: $t_{10} = 0,184$; $F_{2,15} = 1,226$; Média: $t_{10} = 0,196$; $F_{2,15} = 1,142$; Fig. 25).

Figura 25: A expressão de RNAm de 5-HT_{1A} no hipocampo dorsal de ratos submetidos ao desamparo aprendido não altera com o estresse ou tratamento com imipramina. Os animais foram submetidos ao pré-teste (PT, choques inescapáveis) e, imediatamente depois receberam injeção i.p. de veículo ou imipramina (15 mg/Kg). Durante os próximos 6 dias, os animais receberam injeção i.p. de veículo ou imipramina (15 mg/Kg) e, uma hora após a última injeção, foram sacrificados, seus cérebros removidos e o hipocampo dorsal dissecado para posterior análise molecular. Um grupo naive (não estressado e não tratado) foi conduzido paralelamente para controle molecular. A) normalização por YWHAZ. B) normalização por ACTB. C) normalização por HPRT1. D) normalização pela média de YWHAZ, ACTB e HPRT1. Dados representam a média $\pm$ E.P.M. Teste t: veículo *versus* naive; ANOVA de 1 fator: tratado *versus* veículo, n=6 animais/grupo.

Nenhuma alteração significativa foi encontrada nos níveis de RNAm do receptor **NMDA2a** no hipocampo dorsal de animais estressados, tratados ou não com imipramina (conforme Fig. 26D; Teste t de Student: veículo *versus* naive; ANOVA de 1 fator: tratado *versus* veículo, $p > 0,05$; $n = 6/\text{grupo}$; YWHAZ: $t_{10} = 0,533$; $F_{2,16} = 10,04$ ($p < 0,05$); ACTB: $t_{10} = 0,955$; $F_{2,15} = 2,632$; HPRT1: $t_{10} = 0,209$; $F_{2,15} = 4,655$ ($P < 0,05$); Média: $t_{10} = 1,214$; $F_{2,15} = 2,839$; Fig. 26).

Figura 26: A expressão de RNAm de NMDA2a no hipocampo dorsal de ratos submetidos ao desamparo aprendido não altera com o estresse ou tratamento com imipramina. Os animais foram submetidos ao pré-teste (PT, choques inescapáveis) e, imediatamente depois receberam injeção i.p. de veículo ou imipramina (15 mg/Kg). Durante os próximos 6 dias, os animais receberam injeção i.p. de veículo ou imipramina (15 mg/Kg) e, uma hora após a última injeção, foram sacrificados, seus cérebros removidos e o hipocampo dorsal dissecado para posterior análise molecular. Um grupo naive (não estressado e não tratado) foi conduzido paralelamente para controle molecular. A) normalização por YWHAZ. B) normalização por ACTB. C) normalização por HPRT1. D) normalização pela média de YWHAZ, ACTB e HPRT1. Dados representam a média $\pm$ E.P.M. Teste t: veículo *versus* naive; ANOVA de 1 fator: tratado *versus* veículo, n=6 animais/grupo. [#]Dunnett $p < 0,05$; tratado *versus* veículo.

Os níveis de RNAm do receptor **AMPA1** no hipocampo dorsal de animais estressados, tratados ou não com imipramina não apresentaram diferença significativa (conforme Fig. 27D; Teste t de Student: veículo *versus* naive; ANOVA de 1 fator: tratado *versus* veículo, $p > 0,05$; $n=6$ /grupo; YWHAZ: $t_{10}=1,44$; $F_{2,15}=7,472$ ($p < 0,05$); ACTB: $t_{10}=0,463$; $F_{2,15}=2,798$; HPRT1: $t_{10}=0,327$; $F_{2,15}=9,029$ ($p < 0,05$); Média: $t_{10}=0,942$; $F_{2,15}=3,323$; Fig. 27).

Figura 27: A expressão de RNAm de AMPA1 no hipocampo dorsal de ratos submetidos ao desamparo aprendido não altera com o estresse ou tratamento com imipramina. Os animais foram submetidos ao pré-teste (PT, choques inescapáveis) e, imediatamente depois receberam injeção i.p. de veículo ou imipramina (15 mg/Kg). Durante os próximos 6 dias, os animais receberam injeção i.p. de veículo ou imipramina (15 mg/Kg) e, uma hora após a última injeção, foram sacrificados, seus cérebros removidos e o hipocampo dorsal dissecado para posterior análise molecular. Um grupo naive (não estressado e não tratado) foi conduzido paralelamente para controle molecular. A) normalização por YWHAZ. B) normalização por ACTB. C) normalização por HPRT1. D) normalização pela média de YWHAZ, ACTB e HPRT1. Dados representam a média $\pm$ E.P.M. Teste t: veículo *versus* naive; ANOVA de 1 fator: tratado *versus* veículo, n=6 animais/grupo. [#]Dunnett $p < 0,05$; tratado *versus* veículo.

Experimento 4.4: Análise dos níveis de RNAm no hipocampo ventral

Em todos os ensaios, os resultados são apresentados para cada um dos três normalizadores utilizados (YWHAZ, ACTB e HPRT1), e para a análise dos resultados foi considerada a média dos 3 normalizadores utilizados.

A análise dos dados moleculares do hipocampo ventral não indicou nenhuma alteração nos níveis de RNAm de **BDNF IV** quando os animais foram estressados e tratados ou não com imipramina (conforme Fig. 28D; Teste t de Student: veículo *versus* naive; ANOVA de 1 fator: tratado *versus* veículo, $p > 0,05$; $n=6/\text{grupo}$; YWHAZ: $t_{10}=0,047$; $F_{2,15}=0,300$; ACTB: $t_{10}=0,071$; $F_{2,15}=0,644$; HPRT1: $t_{10}=0,144$; $F_{2,15}=0,681$; Média: $t_{10}=0,356$; $F_{2,15}=0,388$; Fig. 28).

Figura 28: Nenhuma alteração significativa nos níveis de RNAm de **BDNF IV** foi observada com o estresse ou tratamento com imipramina no hipocampo ventral de ratos submetidos ao desamparo aprendido. Os animais foram submetidos ao pré-teste (PT, choques inescapáveis) e, imediatamente depois receberam injeção i.p. de veículo ou imipramina (15 mg/Kg). Durante os próximos 6 dias, os animais receberam injeção i.p. de veículo ou imipramina (15 mg/Kg) e, uma hora após a última injeção, foram sacrificados, seus cérebros removidos e o hipocampo ventral dissecado para análise molecular. Um grupo naive (não estressado e não tratado) foi conduzido paralelamente para controle molecular. A) normalização por YWHAZ. B) normalização por ACTB. C) normalização por HPRT1. D) normalização pela média de YWHAZ, ACTB e HPRT1. Dados representam a média $\pm$ E.P.M. Teste t: veículo *versus* naive; ANOVA de 1 fator: tratado *versus* veículo, n=6 animais/grupo.

No hipocampo ventral de animais submetidos ao estresse e tratados ou não com imipramina não houve diferença significativa nos níveis de RNAm de **TrkB** (conforme Fig. 29D; Teste t de Student: veículo *versus* naive; ANOVA de 1 fator: tratado *versus* veículo, $p>0,05$; $n=6/\text{grupo}$; YWHAZ: $t_{10}=0,122$; $F_{2,15}=1,263$; ACTB: $t_{10}=1,285$; $F_{2,15}=2,341$; HPRT1: $t_{10}=1,546$; $F_{2,15}=0,548$; Média: $t_{10}=0,738$; $F_{2,15}=0,303$; Fig. 29).

Figura 29: A expressão de RNAm de TrkB no hipocampo ventral de ratos submetidos ao desamparo aprendido não altera com o estresse ou tratamento com imipramina. Os animais foram submetidos ao pré-teste (PT, choques inescapáveis) e, imediatamente depois receberam injeção i.p. de veículo ou imipramina (15 mg/Kg). Durante os próximos 6 dias, os animais receberam injeção i.p. de veículo ou imipramina (15 mg/Kg) e, uma hora após a última injeção, foram sacrificados, seus cérebros removidos e o hipocampo ventral dissecado para análise molecular. Um grupo naive (não estressado e não tratado) foi conduzido paralelamente para controle molecular. A) normalização por YWHAZ. B) normalização por ACTB. C) normalização por HPRT1. D) normalização pela média de YWHAZ, ACTB e HPRT1. Dados representam a média $\pm$ E.P.M. Teste t: veículo *versus* naive; ANOVA de 1 fator: tratado *versus* veículo, n=6 animais/grupo.

Nenhuma diferença significativa foi observada nos níveis de RNAm de **5-HT1A** no hipocampo ventral de animais submetidos ao estresse e tratados ou não com imipramina (conforme Fig. 30D; Teste t de Student: veículo *versus* naive; ANOVA de 1 fator: tratado *versus* veículo, $p > 0,05$; $n = 6/\text{grupo}$; YWHAZ: $t_{10} = 0,906$; $F_{2,15} = 2,04$; ACTB: $t_{10} = 0,143$; $F_{2,15} = 2,163$; HPRT1: $t_{10} = 0,107$; $F_{2,15} = 1,054$; Média: $t_{10} = 0,552$; $F_{2,15} = 1,707$; Fig. 30).

Figura 30: A expressão de RNAm de 5-HT_{1A} no hipocampo ventral de ratos submetidos ao desamparo aprendido não altera com o estresse ou tratamento com imipramina. Os animais foram submetidos ao pré-teste (PT, choques inescapáveis) e, imediatamente depois receberam injeção i.p. de veículo ou imipramina (15 mg/Kg). Durante os próximos 6 dias, os animais receberam injeção i.p. de veículo ou imipramina (15 mg/Kg) e, uma hora após a última injeção, foram sacrificados, seus cérebros removidos e o hipocampo ventral dissecado para análise molecular. Um grupo naive (não estressado e não tratado) foi conduzido paralelamente para controle molecular. A) normalização por YWHAZ. B) normalização por ACTB. C) normalização por HPRT1. D) normalização pela média de YWHAZ, ACTB e HPRT1. Dados representam a média $\pm$ E.P.M. Teste t: veículo *versus* naive; ANOVA de 1 fator: tratado *versus* veículo, n=6 animais/grupo.

De forma semelhante, os níveis de RNAm de **NMDA2a** não alteram com o estresse e/ou tratamento com imipramina (conforme Fig. 31D; Teste t de Student: veículo *versus* naïve; ANOVA de 1 fator: tratado *versus* veículo, $p > 0,05$; $n = 6/\text{grupo}$; YWHAZ: $t_{10} = 0,273$; $F_{2,15} = 1,267$; ACTB: $t_{10} = 0,148$; $F_{2,15} = 1,308$; HPRT1: $t_{10} = 0,69$; $F_{2,15} = 0,801$; Média: $t_{10} = 0,195$; $F_{2,15} = 1,267$; Fig. 31).

Figura 31: A expressão de RNAm de NMDA2a no hipocampo ventral de ratos submetidos ao desamparo aprendido não altera com o estresse ou tratamento com imipramina. Os animais foram submetidos ao pré-teste (PT, choques inescapáveis) e, imediatamente depois receberam injeção i.p. de veículo ou imipramina (15 mg/Kg). Durante os próximos 6 dias, os animais receberam injeção i.p. de veículo ou imipramina (15 mg/Kg) e, uma hora após a última injeção, foram sacrificados, seus cérebros removidos e o hipocampo ventral dissecado para análise molecular. Um grupo naive (não estressado e não tratado) foi conduzido paralelamente para controle molecular. A) normalização por YWHAZ. B) normalização por ACTB. C) normalização por HPRT1. D) normalização pela média de YWHAZ, ACTB e HPRT1. Dados representam a média $\pm$ E.P.M. Teste t: veículo *versus* naive; ANOVA de 1 fator: tratado *versus* veículo, n=6 animais/grupo.

Ainda, os níveis de transcritos de **AMPA1** não foram alterados pelo estresse ou tratamento no hipocampo ventral dos ratos (conforme Fig. 32D; Teste t de Student: veículo *versus* naive; ANOVA de 1 fator: tratado *versus* veículo, $p > 0,05$; $n = 6/\text{grupo}$; YWHAZ: $t_{10} = 0,313$; $F_{2,15} = 0,836$; ACTB: $t_{10} = 0,804$; $F_{2,15} = 0,290$; HPRT1: $t_{10} = 0,921$; $F_{2,15} = 0,014$; Média: $t_{10} = 0,980$; $F_{2,15} = 0,043$; Fig. 32).

Figura 32: A expressão de RNAm de AMPA1 no hipocampo ventral de ratos submetidos ao desamparo aprendido não altera com o estresse ou tratamento com imipramina. Os animais foram submetidos ao pré-teste (PT, choques inescapáveis) e, imediatamente depois receberam injeção i.p. de veículo ou imipramina (15 mg/Kg). Durante os próximos 6 dias, os animais receberam injeção i.p. de veículo ou imipramina (15 mg/Kg) e, uma hora após a última injeção, foram sacrificados, seus cérebros removidos e o hipocampo ventral dissecado para análise molecular. Um grupo naive (não estressado e não tratado) foi conduzido paralelamente para controle molecular. A) normalização por YWHAZ. B) normalização por ACTB. C) normalização por HPRT1. D) normalização pela média de YWHAZ, ACTB e HPRT1. Dados representam a média $\pm$ E.P.M. Teste t: veículo *versus* naive; ANOVA de 1 fator: tratado *versus* veículo, n=6 animais/grupo.

Experimento 4.5: Análise dos níveis de RNAm no córtex pré-frontal

Em todos os ensaios, os resultados são apresentados para cada um dos três normalizadores utilizados (YWHAZ, ACTB e HPRT1; Fig. A, B e C). Para a análise final dos resultados foi considerada a normalização dos dados pela média dos 3 normalizadores utilizados (Fig. D)

A análise dos dados moleculares do córtex pré-frontal não indicou alteração nos níveis de RNAm de **BDNF IV** de animais estressados, tratados ou não com imipramina (conforme Fig. 33D; Teste t de Student: veículo *versus* naïve; ANOVA de 1 fator: tratado *versus* veículo, $p > 0,05$; $n=6/\text{grupo}$; YWHAZ: $t_{10}=2,88$ ($p < 0,05$); $F_{2,15}=3,943$ ($p < 0,05$); ACTB: $t_{10}=1,466$; $F_{2,15}=0,104$; HPRT1: $t_{10}=0,463$; $F_{2,15}=0,224$; Média: $t_{10}=1,707$; $F_{2,15}=2,073$; Fig. 33).

Figura 33: Nenhuma alteração significativa nos níveis de RNAm de BDNF IV foi observada com o estresse ou tratamento com imipramina no córtex pré-frontal de ratos submetidos ao desamparo aprendido. Os animais foram submetidos ao pré-teste (PT, choques inescapáveis) e, imediatamente depois receberam injeção i.p. de veículo ou imipramina (15 mg/Kg). Durante os próximos 6 dias, os animais receberam injeção i.p. de veículo ou imipramina (15 mg/Kg) e, uma hora após a última injeção, foram sacrificados, seus cérebros removidos e o córtex pré-frontal dissecado para análise molecular. Um grupo naive (não estressado e não tratado) foi conduzido paralelamente para controle molecular. A) normalização por YWHAZ. B) normalização por ACTB. C) normalização por HPRT1. D) normalização pela média de YWHAZ, ACTB e HPRT1. Dados representam a média $\pm$ E.P.M. Teste t: veículo *versus* naive; ANOVA de 1 fator: tratado *versus* veículo, n=6 animais/grupo. * $p < 0,05$; veículo *versus* naive. # $p < 0,05$; tratado *versus* veículo.

Os níveis de RNAm de **TrkB** não alteram quando os animais são estressados, tratados ou não com imipramina (conforme Fig. 34D; Teste t de Student: veículo *versus* naive; ANOVA de 1 fator: tratado *versus* veículo, $p > 0,05$; $n = 6/\text{grupo}$; YWHAZ: $t_{10} = 0,245$; $F_{2,15} = 0,711$; ACTB: $t_{10} = 0,283$; $F_{2,15} = 0,896$; HPRT1: $t_{10} = 0,673$; $F_{2,15} = 1,419$; Média: $t_{10} = 0,284$; $F_{2,15} = 0,870$; Fig. 34).

Figura 34: Os níveis de RNAm de TrkB no córtex pré-frontal de ratos submetidos ao desamparo aprendido, tratados ou não com imipramina. Os animais foram submetidos ao pré-teste (PT, choques inescapáveis) e, imediatamente depois receberam injeção i.p. de veículo ou imipramina (15 mg/Kg). Durante os próximos 6 dias, os animais receberam injeção i.p. de veículo ou imipramina (15 mg/Kg) e, uma hora após a última injeção, foram sacrificados, seus cérebros removidos e o córtex pré-frontal dissecado para análise molecular. Um grupo naive (não estressado e não tratado) foi conduzido paralelamente para controle molecular. A) normalização por YWHAZ. B) normalização por ACTB. C) normalização por HPRT1. D) normalização pela média de YWHAZ, ACTB e HPRT1. Dados representam a média $\pm$ E.P.M. Teste t: veículo *versus* naive; ANOVA de 1 fator: tratado *versus* veículo, n=6 animais/grupo.

Os níveis de RNAm de **5-HT1A** não modificam com o estresse e/ou tratamento com imipramina (conforme Fig. 35D; Teste t de Student: veículo *versus* naive; ANOVA de 1 fator: tratado *versus* veículo, $p > 0,05$; $n=6$ /grupo; YWHAZ: $t_{10}=1,236$; $F_{2,15}=0,816$; ACTB: $t_{10}=1,719$; $F_{2,15}=1,284$; HPRT1: $t_{10}=1,058$; $F_{2,15}=0,438$; Média: $t_{10}=0,339$; $F_{2,15}=0,533$; Fig. 35).

Figura 35: Os níveis de RNAm de 5-HT_{1A} no córtex pré-frontal de ratos submetidos ao desamparo aprendido, tratados ou não com imipramina não são alterados significativamente. Os animais foram submetidos ao pré-teste (PT, choques inescapáveis) e, imediatamente depois receberam injeção i.p. de veículo ou imipramina (15 mg/Kg). Durante os próximos 6 dias, os animais receberam injeção i.p. de veículo ou imipramina (15 mg/Kg) e, uma hora após a última injeção, foram sacrificados, seus cérebros removidos e o córtex pré-frontal dissecado para análise molecular. Um grupo naive (não estressado e não tratado) foi conduzido paralelamente para controle molecular. A) normalização por YWHAZ. B) normalização por ACTB. C) normalização por HPRT1. D) normalização pela média de YWHAZ, ACTB e HPRT1. Dados representam a média $\pm$ E.P.M. Teste t: veículo *versus* naive; ANOVA de 1 fator: tratado *versus* veículo, n=6 animais/grupo.

Ainda, os níveis de RNAm de **NMDA2a** não foram alterados com o estresse e/ou tratamento com imipramina (conforme Fig. 36D; Teste t de Student: veículo *versus* naive; ANOVA de 1 fator: tratado *versus* veículo, $p > 0,05$; $n = 6/\text{grupo}$; YWHAZ: $t_{10} = 0,479$; $F_{2,15} = 0,665$; ACTB: $t_{10} = 0,416$; $F_{2,15} = 0,903$; HPRT1: $t_{10} = 0,097$; $F_{2,15} = 0,966$; Média: $t_{10} = 1,471$; $F_{2,15} = 0,221$; Fig. 36).

Figura 36: Nenhuma alteração foi observada nos níveis de RNAm de NMDA2a no córtex pré-frontal de ratos submetidos ao desamparo aprendido, tratados ou não com imipramina. Os animais foram submetidos ao pré-teste (PT, choques inescapáveis) e, imediatamente depois receberam injeção i.p. de veículo ou imipramina (15 mg/Kg). Durante os próximos 6 dias, os animais receberam injeção i.p. de veículo ou imipramina (15 mg/Kg) e, uma hora após a última injeção, foram sacrificados, seus cérebros removidos e o córtex pré-frontal dissecado para análise molecular. Um grupo naive (não estressado e não tratado) foi conduzido paralelamente para controle molecular. A) normalização por YWHAZ. B) normalização por ACTB. C) normalização por HPRT1. D) normalização pela média de YWHAZ, ACTB e HPRT1. Dados representam a média $\pm$ E.P.M. Teste t: veículo *versus* naive; ANOVA de 1 fator: tratado *versus* veículo, n=6 animais/grupo.

Os níveis de transcritos de **AMPA1** não modificam com o estresse e/ou tratamento com imipramina (conforme Fig. 37D; Teste t de Student: veículo *versus* naive; ANOVA de 1 fator: tratado *versus* veículo, $p > 0,05$; $n=6$ /grupo; YWHAZ: $t_{10}=0,525$; $F_{2,15}=0,172$; ACTB: $t_{10}=0,519$; $F_{2,15}=0,394$; HPRT1: $t_{10}=0,150$; $F_{2,15}=0,911$; Média: $t_{10}=0,483$; $F_{2,15}=0,395$; Fig. 37).

Figura 37: Os níveis de RNAm de AMPA1 no córtex pré-frontal de ratos submetidos ao desamparo aprendido, tratados ou não com imipramina não alteram significativamente. Os animais foram submetidos ao pré-teste (PT, choques inescapáveis) e, imediatamente depois receberam injeção i.p. de veículo ou imipramina (15 mg/Kg). Durante os próximos 6 dias, os animais receberam injeção i.p. de veículo ou imipramina (15 mg/Kg) e, uma hora após a última injeção, foram sacrificados, seus cérebros removidos e o córtex pré-frontal dissecado para análise molecular. Um grupo naive (não estressado e não tratado) foi conduzido paralelamente para controle molecular. A) normalização por YWHAZ. B) normalização por ACTB. C) normalização por HPRT1. D) normalização pela média de YWHAZ, ACTB e HPRT1. Dados representam a média $\pm$ E.P.M. Teste t: veículo *versus* naive; ANOVA de 1 fator: tratado *versus* veículo, n=6 animais/grupo.

Experimento 5: Efeito da administração sistêmica, aguda ou repetida, de imipramina sobre a metilação de DNA em genes candidatos no encéfalo de ratos submetidos ao PT no LH

As amostras foram processadas porém, a análise dos níveis de metilação em genes candidatos (BDNF IV, TrkB, 5-HT_{1A}, NMDA2a e AMPA1), nas estruturas encefálicas de interesse não foi realizada, uma vez que alterações significativas nos níveis de transcritos induzidas pelo estresse e/ou tratamento não foram observadas (conforme resultados do Exp. 4).

Experimento 6: Efeito da administração sistêmica, aguda ou repetida, de imipramina sobre os níveis de proteínas de genes candidatos no encéfalo de ratos submetidos ao PT no LH

As amostras foram processadas porém, a análise dos níveis proteicos dos genes candidatos (BDNF, TrkB, 5-HT_{1A}, NMDA2a e AMPA1), nas estruturas encefálicas de interesse não foi realizada, uma vez que alterações significativas nos níveis de transcritos induzidas pelo estresse e/ou tratamento não foram observadas (conforme resultados do Exp. 4).

5.2 Parte II: Efeito de DNMTi sobre o comportamento, os níveis de transcritos, proteínas e a metilação de DNA gene-específica em estruturas encefálicas de animais submetidos ao LH.

Experimento 1: Efeito da administração sistêmica aguda do inibidor de DNMTs 5-AzaD sobre o comportamento de ratos submetidos ao LH - Determinação da dose efetiva (Efeito Agudo)

O número de fugas foi significativamente aumentado em ratos que receberam injeção i.p. de 5-AzaD 1h antes do teste (dia 7: 0,2 mg/Kg; ANOVA de 1 fator seguido de Dunnett, $F_{3,38}=3,328$; $p<0,05$; Fig. 38A) e foram submetidos ao LH. A análise estatística indicou também que o tratamento resultou em redução no número de falhas (ANOVA de 1 fator seguido de Dunnett: $F_{3,38}=3,223$; $p<0,05$; Fig. 38B). Nenhuma alteração foi observada no número de cruzamentos (ANOVA de 1 fator: $F_{3,38}=0,207$; $p>0,05$; Fig. 38C).

Figura 38: O tratamento agudo com 5-AzaD (0,2 mg/Kg) aumentou o número de fugas e atenuou os efeitos do estresse sobre o número de falhas em animais submetidos ao modelo do desamparo aprendido. Os animais foram submetidos ao pré-teste (PT; choques inescapáveis: CI) e, após 6 dias, receberam administração i.p. de veículo ou 5-AzaD. 1h após a injeção foram submetidos ao teste (choques escapáveis, CE). A) número de fugas. B) número de falhas. C) número de cruzamentos. * $p < 0,05$ grupo tratado *versus* veículo; $n = 10-11$ animais/grupo. Dados representam a média $\pm$ E.P.M; ANOVA de 1 fator seguido de Dunnett.

Experimento 2: Avaliação de efeito sustentado após administração sistêmica aguda do inibidor de DNMTs 5-AzaD sobre o comportamento de ratos submetidos ao LH - Determinação da dose efetiva (Efeito Sustentado)

A análise dos dados comportamentais indicou que o tratamento agudo com 5-AzaD (dia 1: 0,6 mg/Kg; ANOVA de 1 fator seguido de Dunnett) induziu aumento do número de fugas ($F_{2,27}=3,794$; $p<0,05$; Fig.39A) e redução no número de falhas ($F_{2,27}=3,703$; $p<0,05$; Fig. 39B). A análise do número de cruzamentos entre os choques durante o teste no LH indicou que não houve efeito significativo ($F_{2,27}=0,207$; $p>0,05$; Fig. 39C).

Figura 39: O tratamento agudo com 5-AzaD (0,6 mg/Kg) induz efeito sustentado aumentando o número de fugas e reduzindo o número de falhas em animais submetidos ao modelo do desamparo aprendido. Os animais foram submetidos ao pré-teste (PT; choques inescapáveis: CI) e, imediatamente depois, receberam administração i.p. de veículo ou 5-AzaD. 6 dias depois foram submetidos ao teste (choques escapáveis, CE). A) número de fugas. B) número de falhas. C) número de cruzamentos. * $p < 0,05$ grupo tratado *versus* veículo; $n = 10$ animais/grupo. Dados representam a média $\pm$ E.P.M; ANOVA de 1 fator seguido de Dunnett.

Experimento 3: Efeito da administração sistêmica, aguda e sustentada, do inibidor de DNMTs 5-AzaD sobre o comportamento de ratos submetidos ao LH

A análise comportamental demonstrou que houve efeito da condição ($F_{1,69}=28,080$; $p<0,05$), interação ($F_{2,69}=4,273$; $p<0,05$), e efeito do tratamento ($F_{2,69}=3,395$; $p<0,05$) sobre o número de fugas no teste (Fig. 40A). ANOVA de 1 fator seguido de Dunnett mostrou que o tratamento com 5-AzaD aumentou o número de fugas em animais estressados ($F_{2,33}=12,910$; $p<0,05$).

Com relação ao número de falhas, houve interação ($F_{2,69}=3,879$; $P<0,05$) e efeito da condição ($F_{1,69}=22,18$; $p<0,05$), porém não houve efeito do tratamento ($F_{2,69}=3,002$; $p>0,05$). O tratamento com 5-AzaD atenuou o número de falhas induzida pelo estresse (ANOVA de 1 fator seguido de Dunnett, $F_{2,33}=18,060$; $p<0,05$; Fig. 40B). Nenhuma alteração foi encontrada com relação ao número de cruzamentos (ANOVA de 2 fatores, interação: $F_{2,69}=0,057$; $p>0,05$; condição: $F_{1,69}=0,623$; $p<0,05$; tratamento: $F_{2,69}=0,063$; $p>0,05$; Fig. 40C).

Figura 40: O estresse alterou, enquanto que o tratamento agudo de 5-AzaD reverteu, o comportamento de animais submetidos ao modelo do desamparo aprendido. Os animais foram submetidos ao pré-teste (grupo estressado recebeu choques inescapáveis e grupo habituado não) e, imediatamente depois (dia 1) ou 1h antes do teste (dia 7), receberam injeção i.p. de veículo ou 5-AzaD (0,6 e 0,2 mg/kg, respectivamente). Dados representam a média $\pm$ E.P.M. A) número de fugas. B) número de falhas. C) número de cruzamentos. * $p < 0,05$ estressados *versus* habituados; #tratado *versus* veículo. ANOVA de 2 fatores, $n=10-13$ animais/grupo. veic: veículo, dia1: injeção imediatamente após o PT, dia7: injeção 1h antes do teste.

Experimento 4: Efeito da administração sistêmica aguda do inibidor de DNMTs RG108 sobre o comportamento de ratos submetidos ao LH - Determinação da dose efetiva (Efeito Agudo)

A análise dos dados comportamentais indicou aumento no número de fugas em ratos que receberam injeção i.p. de RG108 1h antes do teste (dia 7: 0,6 mg/Kg; ANOVA de 1 fator seguido de Dunnett, $F_{3,40}=3,503$; $p<0,05$; Fig. 41A) e foram submetidos ao LH. Ainda, foi observado redução no número de falhas (0,6 mg/Kg; ANOVA de 1 fator seguido de Dunnett: $F_{3,40}=3,323$; $p<0,05$; Fig. 41B). Nenhuma alteração foi observada no número de cruzamentos entre os choques (ANOVA de 1 fator; $F_{3,40}=0,817$; $p>0,05$; Fig. 41C).

Figura 41: O tratamento agudo com RG108 (0,6 mg/Kg), administrado 1h antes do teste, aumentou o número de fugas e atenuou os efeitos do estresse sobre o número de falhas em animais submetidos ao modelo do desamparo aprendido. Os animais foram submetidos ao pré-teste e, após 6 dias, receberam administração i.p. de veículo ou RG108. 1h após a injeção foram submetidos ao teste. A) número de fugas. B) número de falhas. C) número de cruzamentos. Dados representam a média $\pm$ E.P.M.; ANOVA de 1 fator seguido de Dunnett. * $p < 0,05$ grupo tratado *versus* veículo; $n = 11$ animais/grupo. veic: veículo.

Experimento 5: Avaliação de efeito sustentado após administração sistêmica aguda do inibidor de DNMTs RG108 em ratos submetidos ao LH - Determinação da dose efetiva (Efeito Sustentado)

A análise dos dados comportamentais indicou aumento no número de fugas em ratos que receberam injeção i.p. de RG108 imediatamente após o pré-teste (dia 1: 0,6 mg/Kg; ANOVA de 1 fator seguido de Dunnett, $F_{3,36}=4,724$; $p<0,05$; Fig. 42A) e foram submetidos ao LH. Ainda, foi observado redução no número de falhas (0,6 mg/kg; ANOVA de 1 fator seguido de Dunnett: $F_{3,36}=12,460$; $p<0,05$; Fig. 42B). Nenhuma alteração foi observada no número de cruzamentos entre os choques (ANOVA de 1 fator: $F_{3,36}=0,553$; $p>0,05$; Fig. 42C).

Figura 42: O tratamento agudo com RG108 (0,6 mg/Kg), administrado imediatamente após o pré-teste, aumentou o número de fugas e atenuou os efeitos do estresse sobre o número de falhas em animais submetidos ao modelo do desamparo aprendido. Os animais foram submetidos ao pré-teste (PT) e, imediatamente após, receberam administração i.p. de veículo ou RG108. Seis dias após o PT foram submetidos ao teste. A) número de fugas. B) número de falhas. C) número de cruzamentos. Dados representam a média $\pm$ E.P.M.; ANOVA de 1 fator seguido de Dunnett. * $p < 0,05$ grupo tratado *versus* veículo; $n = 10$ animais/grupo. veic: veículo.

Experimento 6: Efeito da administração sistêmica, aguda ou sustentada, do inibidor de DNMTs RG108 sobre o comportamento de ratos submetidos ao LH

A análise dos dados comportamentais indicou que houve efeito da condição ($F_{1,72}=9,777$; $p<0,05$), porém não houve interação ($F_{3,72}=2,080$; $p>0,05$), nem efeito do tratamento ($F_{3,72}=1,823$; $p>0,05$) sobre o número de fugas no teste (Fig. 43A).

Efeito semelhante foi observado no número de falhas (ANOVA de 2 fatores, interação: $F_{3,72}=2,377$; $p>0,05$; condição: $F_{1,72}=10,780$; $p<0,05$; tratamento: $F_{3,72}=2,131$; $p>0,05$; Fig. 43B). A análise do número de cruzamentos entre os choques durante o teste no LH indicou que não houve efeito significativo da condição ($F_{1,72}=0,282$; $p>0,05$), dos tratamentos utilizados ($F_{3,72}=1,372$; $p>0,05$), nem interação entre esses fatores ($F_{3,72}=0,329$; $p>0,05$; Fig. 43C).

Figura 43: Efeito do tratamento com RG108 sobre o comportamento de animais submetidos ao desamparo aprendido. Os animais foram submetidos ao pré-teste (grupo estressado recebeu choques inescapáveis e grupo habituado não) e, imediatamente ou 24h depois (dia 1 e dia 2, respectivamente) ou 1h antes do teste (dia 7), receberam injeção i.p. de veículo ou RG108 (0,6 mg/Kg). A) número de fugas. B) número de falhas. C) número de cruzamentos. Dados representam a média $\pm$ E.P.M.; ANOVA de 2 fatores seguido de Bonferroni. * $p < 0,05$ grupo estressado *versus* habituado; $n = 10$ animais/grupo. veic: veículo; dia1: injeção imediatamente após o PT; dia2: injeção 24h após o PT; dia 7: injeção 1h antes do teste.

Experimento 7: Efeito da administração sistêmica, aguda ou sustentada, de RG108 sobre os níveis de RNAm, proteínas e da metilação de DNA em genes candidatos no encéfalo de ratos submetidos ao PT no LH – Coleta das amostras

Esse experimento foi realizado para coletar as amostras a serem utilizadas nos experimentos 8 e 9. As amostras dissecadas ficaram armazenadas a -80°C até o momento do uso.

Experimento 8: Efeito da administração sistêmica, aguda ou sustentada, de RG108 sobre os níveis de RNAm de genes candidatos no encéfalo de ratos submetidos ao PT no LH

Experimento 8.1: Análise da pureza e integridade do RNA isolado

Uma alíquota do RNA isolado, de cada uma das amostras, foi submetida a eletroforese em gel de agarose 1,5%. Duas bandas íntegras foram visualizadas pelo transiluminador (radiação ultravioleta) confirmando a integridade das amostras (Fig. 44).

Todas as amostras foram quantificadas e sua pureza determinada. As amostras utilizadas estavam íntegras e com A_{260}/A_{280} entre 1,75 e 2,0.

Figura 44: Eletroforese de amostras de RNA isolado (Parte II). As amostras previamente coletadas foram processadas, o RNA isolado e submetido a eletroforese em gel de agarose onde foi verificada sua integridade. 1-3: amostragem de RNA isolado em 3 diferentes amostras.

O cDNA foi sintetizado e as qPCR-RT foram então realizadas para analisar os níveis de RNAm dos diferentes genes estudados (BDNF IV, TrkB, 5-HT_{1A}, NMDA2a e AMPA1) no HPC dorsal (Exp. 8.3), HPC ventral (Exp. 8.4) e CPF (Exp. 8.5).

Experimento 8.2: Análise dos normalizadores

Como controles internos das reações foram utilizados três normalizadores YWHAZ, ACTB e HPRT1, cujas expressões dos transcritos não apresentaram variações entre os tratamentos realizados (Teste t de Student: veículo *versus* naïve; ANOVA de 1 fator: tratado *versus* veículo, n=9/grupo; p>0,05; **HPC dorsal:** YWHAZ: $t_{16}=0,442$; $F_{3,32}=0,500$; ACTB: $t_{16}=1,553$; $F_{3,32}=1,622$; HPRT1: $t_{16}=0,759$; $F_{3,32}=0,631$; Fig. 45; **HPC ventral:** YWHAZ: $t_{16}=0,445$; $F_{3,32}=0,260$; ACTB: $t_{16}=1,085$; $F_{3,32}=0,457$; HPRT1: $t_{16}=1,197$; $F_{3,32}=0,808$; Fig. 46; **CPF:** YWHAZ: $t_{16}=0,887$; $F_{3,32}=0,819$; ACTB: $t_{16}=0,529$; $F_{3,32}=0,988$; HPRT1: $t_{16}=2,132$; $F_{3,32}=2,589$; Fig. 47). Uma vez que a análise dos dados moleculares não indicou alteração nos valores obtidos de cT (*cycle threshold*) dos controles avaliados, os mesmos foram utilizados como normalizadores nos ensaios posteriores.

Figura 45: Nenhuma alteração foi observada nos valores de cT dos normalizadores YWHAZ, ACTB e HPRT1 no hipocampo dorsal de animais submetidos ao desamparo aprendido. Os animais foram submetidos ao pré-teste (choques inescapáveis) e, imediatamente depois (dia 1), 24 h depois (dia 2) ou 1h antes do sacrifício (dia 7), receberam injeção i.p. de veículo ou RG108 (0,6 mg/Kg). Um grupo independente naive (não estressado e não tratado) foi conduzido paralelamente para controle molecular. Os animais foram sacrificados no dia 7, seus cérebros removidos e o hipocampo dorsal dissecado para análise molecular. A) YWHAZ. B) ACTB. C) HPRT1. Dados representam a média $\pm$ E.P.M. Teste t: veículo *versus* naive; ANOVA de 1 fator: tratado *versus* veículo, n=9 animais/grupo. cT: *cycle threshold*.

Figura 46: Os valores de cT dos normalizadores YWHAZ, ACTB e HPRT1 no hipocampo ventral não alteram com o estresse nem com os tratamentos. Os animais foram submetidos ao pré-teste (choques inescapáveis) e, imediatamente depois (dia 1), 24 h depois (dia 2) ou 1h antes do sacrifício (dia 7), receberam injeção i.p. de veículo ou RG108 (0,6 mg/Kg). Um grupo independente naive (não estressado e não tratado) foi conduzido paralelamente para controle molecular. Os animais foram sacrificados no dia 7, seus cérebros removidos e o hipocampo dorsal dissecado para análise molecular. A) YWHAZ. B) ACTB. C) HPRT1. Dados representam a média $\pm$ E.P.M. Teste t: veículo *versus* naive; ANOVA de 1 fator: tratado *versus* veículo, n=9 animais/grupo. cT: *cycle threshold*.

Figura 47: No córtex pré-frontal de ratos submetidos ao desamparo aprendido e tratados ou não com RG108, os valores de cT dos normalizadores YWHAZ, ACTB e HPRT1 não alteram. Os animais foram submetidos ao pré-teste (choques inescapáveis) e, imediatamente depois (dia 1), 24 h depois (dia 2) ou 1h antes do sacrifício (dia 7), receberam injeção i.p. de veículo ou RG108 (0,6 mg/Kg). Um grupo independente naive (não estressado e não tratado) foi conduzido paralelamente para controle molecular. Os animais foram sacrificados no dia 7, seus cérebros removidos e o hipocampo dorsal dissecado para análise molecular. A) YWHAZ. B) ACTB. C) HPRT1. Dados representam a média $\pm$ E.P.M. Teste t: veículo *versus* naive; ANOVA de 1 fator: tratado *versus* veículo, n=9 animais/grupo. cT: *cycle threshold*.

Experimento 8.3: Análise dos níveis de RNAm no hipocampo dorsal

Em todos os ensaios, os resultados são apresentados para cada um dos três normalizadores utilizados (YWHAZ, ACTB e HPRT1; Fig. A, B e C). Para a análise final dos resultados foi considerada a normalização dos dados pela média dos 3 normalizadores utilizados (Fig. D)

A análise dos dados moleculares não indicou alteração nos níveis do RNAm de **BDNF IV** quando os animais foram estressados, tratados ou não com RG108 (conforme Fig. 48D; Teste t de Student: veículo *versus* naive; ANOVA de 1 fator: tratado *versus* veículo, $p > 0,05$; $n=9$ /grupo; YWHAZ: $t_{16}=0,759$; $F_{3,32}=0,056$; ACTB: $t_{16}=0,428$; $F_{3,32}=0,252$; HPRT1: $t_{16}=0,611$; $F_{3,32}=0,412$; Média: $t_{16}=1,061$; $F_{3,32}=0,450$; Fig. 48).

Figura 48: Os níveis de RNAm de BDNF IV no hipocampo dorsal não modificam com o estresse nem com os tratamentos. Os animais foram submetidos ao pré-teste (choques inescapáveis) e, imediatamente depois (dia 1), 24h depois (dia 2) ou 1h antes do sacrifício (dia 7), receberam injeção i.p. de veículo ou RG108 (0,6 mg/Kg). Um grupo independente naive (não estressado e não tratado) foi conduzido paralelamente para controle das análises moleculares. Os animais foram sacrificados no dia 7, seus cérebros removidos e o hipocampo dorsal dissecado para análise molecular. A) normalização por YWHAZ. B) normalização por ACTB. C) normalização por HPRT1. D) normalização pela média de YWHAZ, ACTB e HPRT1. Dados representam a média $\pm$ E.P.M. Teste t: veículo *versus* naive; ANOVA de 1 fator: tratado *versus* veículo, n=9 animais/grupo.

O estresse dos choques nas patas não alterou os níveis de RNAm do receptor **TrkB**, no entanto, um aumento nos níveis desse transcrito foi observado em animais tratados com RG108 24h após o PT (conforme Fig. 49D; Teste t de Student: veículo *versus* naive, $p > 0,05$; ANOVA de 1 fator seguido de Dunnett: tratado *versus* veículo, $p < 0,05$; $n = 9/\text{grupo}$; YWHAZ: $t_{16} = 1,106$; $F_{3,32} = 6,916$; ACTB: $t_{16} = 0,195$; $F_{3,32} = 5,784$; HPRT1: $t_{16} = 1,13$; $F_{3,32} = 7,239$; Média: $t_{16} = 0,912$; $F_{3,32} = 9,594$; Fig. 49).

Figura 49: O tratamento com RG108 24h após o PT resultou em aumento nos níveis de RNAm de TrkB no hipocampo dorsal de ratos submetidos ao estresse dos choques nas patas. Os animais foram submetidos ao pré-teste (choques inescapáveis) e, imediatamente depois (dia 1), 24h depois (dia 2) ou 1h antes do sacrifício (dia 7), receberam injeção i.p. de veículo ou RG108 (0,6 mg/Kg). Um grupo independente naive (não estressado e não tratado) foi conduzido paralelamente para controle das análises moleculares. Os animais foram sacrificados no dia 7, seus cérebros removidos e o hipocampo dorsal dissecado para análise molecular. A) normalização por YWHAZ. B) normalização por ACTB. C) normalização por HPRT1. D) normalização pela média de YWHAZ, ACTB e HPRT1. Dados representam a média $\pm$ E.P.M. Teste t: veículo *versus* naive; ANOVA de 1 fator seguido de Dunnett: tratado *versus* veículo, n=9 animais/grupo. * $p < 0,05$ tratado *versus* veículo.

A análise dos transcritos de **5-HT_{1A}** não demonstrou nenhuma alteração entre as condições analisadas (conforme Fig. 50D; Teste t de Student: veículo *versus* naïve; ANOVA de 1 fator: tratado *versus* veículo; $p > 0,05$; $n = 9/\text{grupo}$; YWHAZ: $t_{16} = 0,456$; $F_{3,32} = 0,390$; ACTB: $t_{16} = 0,989$; $F_{3,32} = 0,485$; HPRT1: $t_{16} = 0,695$; $F_{3,32} = 0,864$; Média: $t_{16} = 0,098$; $F_{3,32} = 0,490$; Fig. 50).

Figura 50: Os níveis de RNAm de 5-HT_{1A} no hipocampo dorsal não são alterados pelo estresse dos choques nas patas nem pelo tratamento com RG108. Os animais foram submetidos ao pré-teste (choques inescapáveis) e, imediatamente depois (dia 1), 24h depois (dia 2) ou 1h antes do sacrifício (dia 7), receberam injeção i.p. de veículo ou RG108 (0,6 mg/Kg). Um grupo independente naive (não estressado e não tratado) foi conduzido paralelamente para controle das análises moleculares. Os animais foram sacrificados no dia 7, seus cérebros removidos e o hipocampo dorsal dissecado para análise molecular. A) normalização por YWHAZ. B) normalização por ACTB. C) normalização por HPRT1. D) normalização pela média de YWHAZ, ACTB e HPRT1. Dados representam a média $\pm$ E.P.M. Teste t: veículo *versus* naive; ANOVA de 1 fator: tratado *versus* veículo, n=9 animais/grupo.

Efeito semelhante foi observado nos níveis de RNAm do **NMDA2a** (conforme Fig. 51D; Teste t de Student: veículo *versus* naïve; ANOVA de 1 fator: tratado *versus* veículo; $p > 0,05$; $n = 9$ /grupo; YWHAZ: $t_{16} = 0,535$; $F_{3,32} = 0,821$; ACTB: $t_{16} = 1,313$; $F_{3,32} = 0,236$; HPRT1: $t_{16} = 0,284$; $F_{3,32} = 1,12$; Média: $t_{16} = 1,05$; $F_{3,32} = 0,839$; Fig. 51).

Figura 51: Os níveis de RNAm de NMDA2a no hipocampo dorsal não modificam com o estresse dos choques nas patas nem com o tratamento com RG108. Os animais foram submetidos ao pré-teste (choques inescapáveis) e, imediatamente depois (dia 1), 24h depois (dia 2) ou 1h antes do sacrifício (dia 7), receberam injeção i.p. de veículo ou RG108 (0,6 mg/Kg). Um grupo independente naive (não estressado e não tratado) foi conduzido paralelamente para controle das análises moleculares. Os animais foram sacrificados no dia 7, seus cérebros removidos e o hipocampo dorsal dissecado para análise molecular. A) normalização por YWHAZ. B) normalização por ACTB. C) normalização por HPRT1. D) normalização pela média de YWHAZ, ACTB e HPRT1. Dados representam a média $\pm$ E.P.M. Teste t: veículo *versus* naive; ANOVA de 1 fator: tratado *versus* veículo, n=9 animais/grupo.

Ainda, os níveis de RNAm de **AMPA1** também não apresentam diferença significativa entre os grupos (conforme Fig. 52D; Teste t de Student: veículo *versus* naive; ANOVA de 1 fator: tratado *versus* veículo; $p > 0,05$; $n = 9/\text{grupo}$; YWHAZ: $t_{16} = 0,087$; $F_{3,32} = 0,480$; ACTB: $t_{16} = 0,603$; $F_{3,32} = 0,425$; HPRT1: $t_{16} = 0,410$; $F_{3,32} = 0,890$; Média: $t_{16} = 0,502$; $F_{3,32} = 0,156$; Fig. 52).

Figura 52: Os níveis de RNAm de AMPA1 no hipocampo dorsal não são modificam significativamente em ratos submetidos ao desamparo aprendido e tratados ou não com RG108. Os animais foram submetidos ao pré-teste (choques inescapáveis) e, imediatamente depois (dia 1), 24h depois (dia 2) ou 1h antes do sacrifício (dia 7), receberam injeção i.p. de veículo ou RG108 (0,6 mg/Kg). Um grupo independente naive (não estressado e não tratado) foi conduzido paralelamente para controle das análises moleculares. Os animais foram sacrificados no dia 7, seus cérebros removidos e o hipocampo dorsal dissecado para análise molecular. A) normalização por YWHAZ. B) normalização por ACTB. C) normalização por HPRT1. D) normalização pela média de YWHAZ, ACTB e HPRT1. Dados representam a média $\pm$ E.P.M. Teste t: veículo *versus* naive; ANOVA de 1 fator: tratado *versus* veículo, n=9 animais/grupo.

Experimento 8.4: Análise dos níveis de RNAm no hipocampo ventral

Em todos os ensaios, os resultados são apresentados para cada um dos três normalizadores utilizados (YWHAZ, ACTB e HPRT1; Fig. A, B e C). Para a análise final dos resultados foi considerada a normalização dos dados pela média dos 3 normalizadores utilizados (Fig. D)

A análise dos dados moleculares não indicou alteração nos níveis do RNAm de **BDNF IV** quando os animais foram estressados, tratados ou não com RG108 (conforme Fig. 53D; Teste t de Student: veículo *versus* naive; ANOVA de 1 fator: tratado *versus* veículo; $p > 0,05$; $n = 9/\text{grupo}$; YWHAZ: $t_{16} = 1,227$; $F_{3,32} = 2,293$; ACTB: $t_{16} = 0,697$; $F_{3,32} = 0,214$; HPRT1: $t_{16} = 0,835$; $F_{3,32} = 0,222$; Média: $t_{16} = 1,575$; $F_{3,32} = 0,093$; Fig. 53).

Figura 53: Os níveis de RNAm de BDNF IV no hipocampo ventral não alteram com o estresse nem entre os tratamentos. Os animais foram submetidos ao pré-teste (choques inescapáveis) e, imediatamente depois (dia 1), 24h depois (dia 2) ou 1h antes do sacrifício (dia 7), receberam injeção i.p. de veículo ou RG108 (0,6 mg/Kg). Um grupo independente naive (não estressado e não tratado) foi conduzido paralelamente para controle das análises moleculares. Os animais foram sacrificados no dia 7, seus cérebros removidos e o hipocampo ventral dissecado para análise molecular. A) normalização por YWHAZ. B) normalização por ACTB. C) normalização por HPRT1. D) normalização pela média de YWHAZ, ACTB e HPRT1. Dados representam a média $\pm$ E.P.M. Teste t: veículo *versus* naive; ANOVA de 1 fator: tratado *versus* veículo, n=9 animais/grupo.

De forma semelhante, nenhuma alteração nos níveis de RNAm de **TrkB** foi observada quando os animais foram estressados, tratados ou não com RG108 (conforme Fig. 54D; Teste t de Student: veículo *versus* naïve; ANOVA de 1 fator: tratado *versus* veículo; $p > 0,05$; $n=9$ /grupo; YWHAZ: $t_{16}=1,334$; $F_{3,32}=1,917$; ACTB: $t_{16}=0,394$; $F_{3,32}=1,691$; HPRT1: $t_{16}=0,842$; $F_{3,32}=0,802$; Média: $t_{16}=1,173$; $F_{3,32}=1,283$; Fig. 54).

Figura 54: O estresse, assim como o tratamento com RG108, não modifica os níveis de RNAm do TrkB no hipocampo ventral de ratos submetidos ao desamparo aprendido. Os animais foram submetidos ao pré-teste (choques inescapáveis) e, imediatamente depois (dia 1), 24h depois (dia 2) ou 1h antes do sacrifício (dia 7), receberam injeção i.p. de veículo ou RG108 (0,6 mg/Kg). Um grupo independente naive (não estressado e não tratado) foi conduzido paralelamente para controle das análises moleculares. Os animais foram sacrificados no dia 7, seus cérebros removidos e o hipocampo ventral dissecado para análise molecular. A) normalização por YWHAZ. B) normalização por ACTB. C) normalização por HPRT1. D) normalização pela média de YWHAZ, ACTB e HPRT1. Dados representam a média $\pm$ E.P.M. Teste t: veículo *versus* naive; ANOVA de 1 fator: tratado *versus* veículo, n=9 animais/grupo.

O mesmo foi observado nos níveis dos transcritos de **5-HT_{1A}** (conforme Fig. 55D; Teste t de Student: veículo *versus* naive; ANOVA de 1 fator: tratado *versus* veículo; $p > 0,05$; $n=9$ /grupo; YWHAZ: $t_{16}=0,020$; $F_{3,32}=0,746$; ACTB: $t_{16}=1,378$; $F_{3,32}=0,546$; HPRT1: $t_{16}=0,224$; $F_{3,32}=0,572$; Média: $t_{16}=0,216$; $F_{3,32}=0,312$; Fig. 55).

Figura 55: Os níveis de RNAm de 5-HT_{1A} no hipocampo ventral não alteram com o estresse nem com os tratamentos. Os animais foram submetidos ao pré-teste (choques inescapáveis) e, imediatamente depois (dia 1), 24h depois (dia 2) ou 1h antes do sacrifício (dia 7), receberam injeção i.p. de veículo ou RG108 (0,6 mg/Kg). Um grupo independente naive (não estressado e não tratado) foi conduzido paralelamente para controle das análises moleculares. Os animais foram sacrificados no dia 7, seus cérebros removidos e o hipocampo ventral dissecado para análise molecular. A) normalização por YWHAZ. B) normalização por ACTB. C) normalização por HPRT1. D) normalização pela média de YWHAZ, ACTB e HPRT1. Dados representam a média $\pm$ E.P.M. Teste t: veículo *versus* naive; ANOVA de 1 fator: tratado *versus* veículo, n=9 animais/grupo.

Ainda, a ausência de alterações nos níveis de RNAm também ocorre para o **NMDA2a** (conforme Fig. 56D; Teste t de Student: veículo *versus* naive; ANOVA de 1 fator: tratado *versus* veículo; $p > 0,05$; $n = 9/\text{grupo}$; YWHAZ: $t_{16} = 0,292$; $F_{3,32} = 0,255$; ACTB: $t_{16} = 0,394$; $F_{3,32} = 0,845$; HPRT1: $t_{16} = 0,159$; $F_{3,32} = 0,442$; Média: $t_{16} = 0,134$; $F_{3,32} = 0,764$; Fig. 56).

Figura 56: Os níveis de RNAm de NMDA subunidade 2a no hipocampo ventral não alteram com o estresse nem com os tratamentos. Os animais foram submetidos ao pré-teste (choques inescapáveis) e, imediatamente depois (dia 1), 24h depois (dia 2) ou 1h antes do sacrifício (dia 7), receberam injeção i.p. de veículo ou RG108 (0,6 mg/Kg). Um grupo independente naive (não estressado e não tratado) foi conduzido paralelamente para controle das análises moleculares. Os animais foram sacrificados no dia 7, seus cérebros removidos e o hipocampo ventral dissecado para análise molecular. A) normalização por YWHAZ. B) normalização por ACTB. C) normalização por HPRT1. D) normalização pela média de YWHAZ, ACTB e HPRT1. Dados representam a média $\pm$ E.P.M. Teste t: veículo *versus* naive; ANOVA de 1 fator: tratado *versus* veículo, n=9 animais/grupo.

De forma semelhante, os níveis de RNAm de **AMPA1** não alteram com o estresse e/ou tratamento com RG108 (conforme Fig. 57D; Teste t de Student: veículo *versus* naïve; ANOVA de 1 fator: tratado *versus* veículo; $p > 0,05$; $n = 9/\text{grupo}$; YWHAZ: $t_{16} = 0,635$; $F_{3,32} = 0,591$; ACTB: $t_{16} = 1,085$; $F_{3,32} = 1,206$; HPRT1: $t_{16} = 0,369$; $F_{3,32} = 0,965$; Média: $t_{16} = 0,786$; $F_{3,32} = 0,793$; Fig. 57).

Figura 57: No hipocampo ventral, os níveis de RNAm de AMPA1 não modificam com o estresse nem com os tratamentos. Os animais foram submetidos ao pré-teste (choques inescapáveis) e, imediatamente depois (dia 1), 24h depois (dia 2) ou 1h antes do sacrifício (dia 7), receberam injeção i.p. de veículo ou RG108 (0,6 mg/Kg). Um grupo independente naive (não estressado e não tratado) foi conduzido paralelamente para controle das análises moleculares. Os animais foram sacrificados no dia 7, seus cérebros removidos e o hipocampo ventral dissecado para análise molecular. A) normalização por YWHAZ. B) normalização por ACTB. C) normalização por HPRT1. D) normalização pela média de YWHAZ, ACTB e HPRT1. Dados representam a média $\pm$ E.P.M. Teste t: veículo *versus* naive; ANOVA de 1 fator: tratado *versus* veículo, n=9 animais/grupo.

Experimento 8.5: Análise dos níveis de RNAm no córtex pré-frontal

Em todos os ensaios, os resultados são apresentados para cada um dos três normalizadores utilizados (YWHAZ, ACTB e HPRT1; Fig. A, B e C). Para a análise final dos resultados foi considerada a normalização dos dados pela média dos 3 normalizadores utilizados (Fig. D)

A análise molecular indicou que uma redução nos níveis dos transcritos de **BDNF IV** induzido pelo estresse dos choques nas patas (conforme Fig. 58D; Teste t de Student: veículo *versus* naive ($p < 0,05$); ANOVA de 1 fator seguido de Dunnett: tratado *versus* veículo ($p > 0,05$); $n=9$ /grupo; YWHAZ: $t_{16}=2,552$; $F_{3,32}=0,787$; ACTB: $t_{16}=3,327$; $F_{3,32}=3,615$ ($p < 0,05$); HPRT1: $t_{16}=4,613$; $F_{3,32}=1,192$; Média: $t_{16}=3,498$; $F_{3,32}=2,302$; Fig. 58).

Figura 58: O estresse reduziu os níveis de RNAm de BDNF IV no córtex pré-frontal de ratos submetidos ao desamparo aprendido. Os animais foram submetidos ao pré-teste (choques inescapáveis) e, imediatamente depois (dia 1), 24h depois (dia 2) ou 1h antes do sacrifício (dia 7), receberam injeção i.p. de veículo ou RG108 (0,6 mg/Kg). Um grupo independente naive (não estressado e não tratado) foi conduzido paralelamente para controle das análises moleculares. Os animais foram sacrificados no dia 7, seus cérebros removidos e o córtex pré-frontal dissecado para análise molecular. A) normalização por YWHAZ. B) normalização por ACTB. C) normalização por HPRT1. D) normalização pela média de YWHAZ, ACTB e HPRT1. Dados representam a média $\pm$ E.P.M. Teste t: veículo *versus* naive; ANOVA de 1 fator: tratado *versus* veículo, n=9 animais/grupo. * $p < 0,05$ grupo veículo *versus* naive; # $p < 0,05$ grupo tratado *versus* veículo.

Os níveis de RNAm de **TrkB** no córtex pré-frontal de animais estressados encontram-se reduzidos (conforme Fig. 59D; Teste t de Student: veículo *versus* naïve; ANOVA de 1 fator: tratado *versus* veículo; $p > 0,05$; $n = 9/\text{grupo}$; YWHAZ: $t_{16} = 2,064$ ($p = 0,05$); $F_{3,32} = 0,734$; ACTB: $t_{16} = 0,931$ ($p > 0,05$); $F_{3,32} = 1,093$; HPRT1: $t_{16} = 2,661$ ($p < 0,05$); $F_{3,32} = 1,007$; Média: $t_{16} = 2,047$ ($p = 0,05$); $F_{3,32} = 0,348$; Fig. 59).

Figura 59: O estresse reduziu os níveis de RNAm de TrkB no córtex pré-frontal de ratos submetidos ao desamparo aprendido. Os animais foram submetidos ao pré-teste (choques inescapáveis) e, imediatamente depois (dia 1), 24h depois (dia 2) ou 1h antes do sacrifício (dia 7), receberam injeção i.p. de veículo ou RG108 (0,6 mg/Kg). Um grupo independente naive (não estressado e não tratado) foi conduzido paralelamente para controle das análises moleculares. Os animais foram sacrificados no dia 7, seus cérebros removidos e o córtex pré-frontal dissecado para análise molecular. A) normalização por YWHAZ. B) normalização por ACTB. C) normalização por HPRT1. D) normalização pela média de YWHAZ, ACTB e HPRT1. Dados representam a média $\pm$ E.P.M. Teste t: veículo *versus* naive; ANOVA de 1 fator: tratado *versus* veículo, $n=9$ animais/grupo. * $p \leq 0,05$ grupo veículo *versus* naive

Nenhuma alteração foi observada nos níveis de RNAm de **5-HT_{1A}** no córtex pré-frontal de animais estressados e tratados ou não com RG108 (conforme Fig. 60D; Teste t de Student: veículo *versus* naïve; ANOVA de 1 fator: tratado *versus* veículo; $p > 0,05$; $n = 9/\text{grupo}$; YWHAZ: $t_{16} = 0,141$; $F_{3,32} = 1,356$; ACTB: $t_{16} = 0,519$; $F_{3,32} = 0,946$; HPRT1: $t_{16} = 0,563$; $F_{3,32} = 1,468$; Média: $t_{16} = 0,047$; $F_{3,32} = 2,252$; Fig. 60).

Figura 60: Nenhuma modificação ocorre nos níveis de transcritos de 5-HT_{1A} no córtex pré-frontal de ratos submetidos ao desamparo aprendido. Os animais foram submetidos ao pré-teste (choques inescapáveis) e, imediatamente depois (dia 1), 24h depois (dia 2) ou 1h antes do sacrifício (dia 7), receberam injeção i.p. de veículo ou RG108 (0,6 mg/Kg). Um grupo independente naive (não estressado e não tratado) foi conduzido paralelamente para controle das análises moleculares. Os animais foram sacrificados no dia 7, seus cérebros removidos e o córtex pré-frontal dissecado para análise molecular. A) normalização por YWHAZ. B) normalização por ACTB. C) normalização por HPRT1. D) normalização pela média de YWHAZ, ACTB e HPRT1. Dados representam a média ± E.P.M. Teste t: veículo *versus* naive; ANOVA de 1 fator: tratado *versus* veículo, n=9 animais/grupo.

Ainda, os níveis de RNAm de **NMDA2a** no córtex pré-frontal de animais estressados e tratados ou não com RG108 não alteram entre os grupos (conforme Fig. 61D; Teste t de Student: veículo *versus* naïve; ANOVA de 1 fator: tratado *versus* veículo; $p > 0,05$; $n = 9/\text{grupo}$; YWHAZ: $t_{16} = 0,464$; $F_{3,32} = 0,048$; ACTB: $t_{16} = 1,124$; $F_{3,32} = 0,645$; HPRT1: $t_{16} = 0,687$; $F_{3,32} = 2,239$; Média: $t_{16} = 0,399$; $F_{3,32} = 0,656$; Fig. 61).

Figura 61: Os níveis de RNAm de NMDA2a no córtex pré-frontal não modificam em ratos submetidos ao desamparo aprendido. Os animais foram submetidos ao pré-teste (choques inescapáveis) e, imediatamente depois (dia 1), 24h depois (dia 2) ou 1h antes do sacrifício (dia 7), receberam injeção i.p. de veículo ou RG108 (0,6 mg/Kg). Um grupo independente naive (não estressado e não tratado) foi conduzido paralelamente para controle das análises moleculares. Os animais foram sacrificados no dia 7, seus cérebros removidos e o córtex pré-frontal dissecado para análise molecular. A) normalização por YWHAZ. B) normalização por ACTB. C) normalização por HPRT1. D) normalização pela média de YWHAZ, ACTB e HPRT1. Dados representam a média $\pm$ E.P.M. Teste t: veículo *versus* naive; ANOVA de 1 fator: tratado *versus* veículo, n=9 animais/grupo.

Nenhuma alteração significativa foi observada nos níveis de RNAm de **AMPA1** no córtex pré-frontal de animais estressados e tratados ou não com RG108 (conforme Fig. 62D; Teste t de Student: veículo *versus* naive; ANOVA de 1 fator: tratado *versus* veículo; $p > 0,05$; $n = 9$ /grupo; YWHAZ: $t_{16} = 0,126$; $F_{3,32} = 1,322$; ACTB: $t_{16} = 0,962$; $F_{3,32} = 0,169$; HPRT1: $t_{16} = 2,126$ ($p < 0,05$); $F_{3,32} = 1,523$; Média: $t_{16} = 0,268$; $F_{3,32} = 1,155$; Fig. 62).

Figura 62: Os níveis de RNAm do receptor AMPA1 no córtex pré-frontal não modificam em ratos submetidos ao desamparo aprendido. Os animais foram submetidos ao pré-teste (choques inescapáveis) e, imediatamente depois (dia 1), 24h depois (dia 2) ou 1h antes do sacrifício (dia 7), receberam injeção i.p. de veículo ou RG108 (0,6 mg/Kg). Um grupo independente naive (não estressado e não tratado foi conduzido paralelamente para controle das análises moleculares. Os animais foram sacrificados no dia 7, seus cérebros removidos e o córtex pré-frontal dissecado para análise molecular. A) normalização por YWHAZ. B) normalização por ACTB. C) normalização por HPRT1. D) normalização pela média de YWHAZ, ACTB e HPRT1. Dados representam a média $\pm$ E.P.M. Teste t: veículo *versus* naive; ANOVA de 1 fator: tratado *versus* veículo, n=9 animais/grupo. * $p < 0,05$ grupo veículo *versus* naive.

Experimento 9: Efeito da administração sistêmica, aguda ou sustentada, de RG108 sobre a metilação de DNA em genes candidatos no encéfalo de ratos submetidos ao PT no LH

Uma vez que as alterações nos níveis de transcritos induzidas pelo estresse e/ou tratamento com RG108 foram observadas apenas para BDNF IV e TrkB no CPF (conforme resultados do Exp. 8), somente as análises da metilação de DNA nesses genes e nessa estrutura foram realizadas.

Experimento 9.1: Análise da pureza e integridade do DNA isolado

Uma alíquota do DNA isolado, de cada uma das amostras, foi submetida a eletroforese em gel de agarose 1,0%. Uma banda íntegra foi visualizada pelo transiluminador (radiação ultravioleta) confirmando a integridade das amostras (Fig. 63).

Todas as amostras foram quantificadas e sua pureza determinada. Todas as amostras utilizadas estavam íntegras e com A_{260}/A_{280} entre 1,75 e 2,0.

Figura 63: Eletroforese de amostras de DNA isolado. As amostras previamente coletadas foram processadas, o DNA isolado e submetido a eletroforese em gel de agarose onde foi verificada sua integridade.

Experimento 9.2: Análise da sonicação do DNA

Uma alíquota do DNA sonicado, de cada uma das amostras, foi submetida a eletroforese em gel de agarose 1,5%. Posteriormente, o gel foi submetido a análise no transiluminador

(radiação ultravioleta). Todas as amostras utilizadas apresentaram DNA sonicado entre 200 e 1000 pb (Fig. 64).

Figura 64: Eletroforese das amostras de DNA sonicado. A) Imagem representativa do marcador de peso molecular utilizado (Promega 100 pb DNA Ladder Molecular Weight Marker). B) As amostras de DNA previamente isolado foram submetidas a sonicação sendo fragmentadas em 200-1000 pb. Primeira coluna corresponde ao padrão (100 pb) e as demais as amostras de DNA sonicado.

Experimento 9.3: Análise dos normalizadores

Como controles internos das reações foram utilizados os mesmos três normalizadores (YWHAZ, ACTB e HPRT1) das análises dos níveis de transcritos.

Como observado na figura 65, não houve alteração nos valores de *cT* (*cycle threshold*) dos normalizadores utilizados no CPF (Teste t de Student: veículo *versus* naive; ANOVA de 1 fator: tratado *versus* veículo; $p > 0,05$; $n = 9/\text{grupo}$; **DNA total (input):** YWHAZ: $t_{16} = 0,240$; $F_{3,32} = 0,329$; ACTB: $t_{16} = 1,339$; $F_{3,32} = 2,245$; HPRT1: $t_{16} = 0,154$; $F_{3,32} = 0,848$; Fig. 65; **DNA metilado imunoprecipitado (IP):** YWHAZ: $t_{16} = 0,549$; $F_{3,32} = 0,637$; ACTB: $t_{16} = 1,359$; $F_{3,32} = 2,578$; HPRT1: $t_{16} = 1,513$; $F_{3,32} = 0,947$; Fig. 66)

Assim, esses normalizadores foram utilizados nos ensaios. A análise dos resultados foi realizada considerando a média dos três normalizadores, em todos os casos.

Figura 65: Os valores de cT dos controles YWHAZ, ACTB e HPRT1 das amostras não imunoprecipitadas (*input*) não alteram com o estresse nem com o tratamento. Os animais foram submetidos ao pré-teste (choques inescapáveis) e, imediatamente depois (dia 1), 24h depois (dia 2) ou 1h antes do sacrifício (dia 7), receberam injeção i.p. de veículo ou RG108 (0,6 mg/Kg). Um grupo independente naive (não estressado e não tratado) foi conduzido paralelamente para controle das análises moleculares. Os animais foram sacrificados no dia 7, seus cérebros removidos e o córtex pré-frontal dissecado para análise molecular. A) YWHAZ. B) ACTB. C) HPRT1. Dados representam a média ± E.P.M. Teste t: veículo *versus* naive; ANOVA de 1 fator: tratado *versus* veículo, n=9 animais/grupo. *Input*: DNA total não imunoprecipitado; *cT*: cycle threshold.

Figura 66: Os valores de cT dos controles YWHAZ, ACTB e HPRT1 das amostras imunoprecipitadas (IP) não alteram com o estresse nem com o tratamento. Os animais foram submetidos ao pré-teste (choques inescapáveis) e, imediatamente depois (dia 1), 24h depois (dia 2) ou 1h antes do sacrifício (dia 7), receberam injeção i.p. de veículo ou RG108 (0,6 mg/Kg). Um grupo independente naive (não estressado e não tratado) foi conduzido paralelamente para controle das análises moleculares. Os animais foram sacrificados no dia 7, seus cérebros removidos e o córtex pré-frontal dissecado para análise molecular. A) YWHAZ. B) ACTB. C) HPRT1. Dados representam a média ± E.P.M. Teste t: veículo *versus* naive; ANOVA de 1 fator: tratado *versus* veículo, n=9 animais/grupo. IP: DNA metilado imunoprecipitado; cT: cycle threshold.

Experimento 9.4: Análise da metilação de DNA no gene do BDNF no córtex pré-frontal

A análise dos dados moleculares indicou aumento na metilação de DNA no **BDNF IV** quando os animais foram estressados, e redução com o tratamento com RG108 (conforme Fig. 67D; Teste t de Student: veículo *versus* naive; ANOVA de 1 fator seguido de Dunnett: tratado *versus* veículo; $p < 0,05$; $n = 9/\text{grupo}$; YWHAZ: $t_{16} = 3,327$; $F_{3,32} = 5,501$; ACTB: $t_{16} = 2,857$; $F_{3,32} = 9,479$; HPRT1: $t_{16} = 2,535$; $F_{3,32} = 1,603$ ($p > 0,05$); Média: $t_{16} = 3,107$; $F_{3,32} = 5,174$; Fig. 67).

Figura 67: Os níveis de metilação de DNA no gene para BDNF (éxon IV) no córtex pré-frontal modificam em ratos tratados ou não com RG108 e submetidos ao desamparo aprendido. Os animais foram submetidos ao pré-teste (choques inescapáveis) e, imediatamente depois (dia 1), 24h depois (dia 2) ou 1h antes do sacrifício (dia 7), receberam injeção i.p. de veículo ou RG108 (0,6 mg/Kg). Um grupo independente naive (não estressado e não tratado) foi conduzido paralelamente para controle das análises moleculares. Os animais foram sacrificados no dia 7, seus cérebros removidos e o córtex pré-frontal dissecado para análise molecular. A) normalização por YWHAZ. B) normalização por ACTB. C) normalização por HPRT1. D) normalização pela média de YWHAZ, ACTB e HPRT1. Dados representam a média $\pm$ E.P.M. Teste t: veículo *versus* naive; ANOVA de 1 fator seguido de Dunnett: tratado *versus* veículo, n=9 animais/grupo. * $p < 0,05$ grupo veículo *versus* naive; # $p < 0,05$ grupo tratado *versus* veículo.

Experimento 9.5: Análise da metilação de DNA no gene do TrkB no córtex pré-frontal

O estresse aumentou os níveis de metilação do DNA no **TrkB** (conforme Fig. 68D; Teste t de Student: veículo *versus* naive ($p < 0,05$); ANOVA de 1 fator: tratado *versus* veículo ($p > 0,05$); $n = 9/\text{grupo}$; YWHAZ: $t_{16} = 2,326$; $F_{3,32} = 0,321$; ACTB: $t_{16} = 1,917$ ($p > 0,05$); $F_{3,32} = 1,967$; HPRT1: $t_{16} = 3,695$; $F_{3,32} = 1,113$; Média: $t_{16} = 4,335$; $F_{3,32} = 2,384$; Fig. 68).

Figura 68: Os níveis de metilação do DNA no gene do TrkB no córtex pré-frontal modificam em ratos tratados ou não com RG108 e submetidos ao desamparo aprendido.

Os animais foram submetidos ao pré-teste (choques inescapáveis) e, imediatamente depois (dia 1), 24h depois (dia 2) ou 1h antes do sacrifício (dia 7), receberam injeção i.p. de veículo ou RG108 (0,6 mg/Kg). Um grupo independente naive (não estressado e não tratado) foi conduzido paralelamente para controle das análises moleculares. Os animais foram sacrificados no dia 7, seus cérebros removidos e o córtex pré-frontal dissecado para análise molecular. A) normalização por YWHAZ. B) normalização por ACTB. C) normalização por HPRT1. D) normalização pela média de YWHAZ, ACTB e HPRT1. Dados representam a média $\pm$ E.P.M. Teste t: veículo *versus* naive; ANOVA de 1 fator: tratado *versus* veículo, n=9 animais/grupo.

*p<0,05 grupo veículo *versus* naive.

Experimento 10: Efeito da administração sistêmica, aguda ou sustentada, de RG108 sobre os níveis de proteínas de genes candidatos no encéfalo de ratos submetidos ao PT no LH

Uma vez que as alterações nos níveis de transcritos induzidas pelo estresse e/ou tratamento com RG108 foram observadas apenas para BDNF IV e TrkB no CPF (conforme resultados do Exp. 8), somente as análises dos níveis dessas proteínas foram realizadas.

A análise molecular não indicou alteração nos níveis de BDNF IV no CPF de ratos tratados ou não com RG108 e submetidos ao LH (Teste t de Student: veículo *versus* naïve; ANOVA de 1 fator; $n=6$ /grupo; $t_{10}=0,136$; $F_{3,20}=0,912$; Fig. 69).

Figura 69: Os níveis de BDNF no córtex pré-frontal não modificam em ratos tratados ou não com RG108 e submetidos ao desamparo aprendido. Os animais foram submetidos ao pré-teste (choques inescapáveis) e, imediatamente depois (dia 1), 24h depois (dia 2) ou 1h antes do sacrifício (dia 7), receberam injeção i.p. de veículo ou RG108 (0,6 mg/Kg). Um grupo independente naïve (não estressado e não tratado) foi conduzido paralelamente para controle das análises moleculares. Os animais foram sacrificados no dia 7, seus cérebros removidos e o córtex pré-frontal dissecado para análise molecular. Dados representam a média $\pm$ E.P.M. Teste t: veículo *versus* naïve; ANOVA de 1 fator: tratado *versus* veículo, $n=6$ animais/grupo.

Problemas experimentais (dicutidos posteriormente) impediram a realização das medidas dos níveis de TrkB.

DISCUSSÃO

6 DISCUSSÃO

Os resultados do presente estudo demonstraram que a administração sistêmica repetida, mas não aguda, de antidepressivos convencionais (fluoxetina e imipramina) induz efeito tipo-antidepressivo em ratos submetidos ao desamparo aprendido. Adicionalmente, pioneiramente demonstramos que diferente dos antidepressivos convencionais, a administração aguda de inibidores de DNMTs (DNMTi; nucleosídico: 5-AzaD e, não-nucleosídico: RG108) resulta em efeito tipo-antidepressivo agudo e sustentado (7 dias após administração única da droga) no desamparo aprendido, corroborando achados anteriores do nosso grupo de pesquisa de que drogas que inibem essas enzimas apresentam efeito tipo-antidepressivo agudo em diferentes modelos animais (Sales et al., 2011; Sales & Joca, 2016). Nenhuma alteração locomotora foi observada nesses animais, conforme evidenciado pela análise do número de cruzamentos entre os choques, indicando que esses efeitos não seriam decorrentes de alterações locomotoras inespecíficas. Foi observado, ainda, que o estresse dos choques nas patas reduziu os níveis de RNAm e aumentou a metilação de DNA em BDNF IV e TrkB no córtex pré-frontal de ratos.

O modelo do desamparo aprendido foi desenvolvido nos anos 60 a partir do condicionamento Pavloviano (Overmier & Seligman, 1967; Seligman & Maier, 1967). No protocolo original desenvolvido por Seligman e colaboradores (1975), observou-se que os animais que não haviam sido previamente submetidos aos CI (PT) aprendiam, por tentativa e erro, que podiam evitar os choques cruzando sobre a barreira entre os compartimentos e com isso, apresentaram elevado número de fugas associado a reduzido número de falhas. Já, os animais previamente submetidos a sessão de PT faziam pouca ou nenhuma tentativa de fuga, e logo aceitavam os choques passivamente (comportamento considerado de “desamparo”). Assim, apresentaram reduzido número de fugas associado a elevado número de falhas para fuga/esquiva. De fato, corroborando os resultados demonstrados nos trabalhos originais e em diversos outros estudos, foi possível observar com nosso protocolo o comportamento de desamparo em animais estressados, uma vez que esses apresentaram maior número de falhas associado a menor número de fugas no dia do teste. Além disso, o comportamento de desamparo foi sensível ao tratamento repetido, mas não agudo, com antidepressivos de diferentes classes: fluoxetina e imipramina, assim como descrito em outros trabalhos (Joca et al., 2003; Joca et al., 2006; Pryce et al., 2011; Fernandez Macedo et al., 2013; Sales & Joca, 2018). Assim, como esperado, os animais tratados durante 7 dias com fluoxetina ou imipramina apresentaram redução no número de falhas acompanhado de aumento no número de fugas. Nenhuma

alteração na atividade locomotora foi verificada através da análise do número de cruzamentos, confirmando que o resultado observado é decorrente de um efeito tipo-antidepressivo (Ceoffroy & Christensen, 1993; Joca et al., 2003; Sales & Joca, 2018).

Evidências na literatura sugerem que o estresse, assim como o tratamento repetido com antidepressivos, resulta em alterações na expressão de diferentes genes, como por exemplo BDNF, TrkB, 5-HT_{1A}, NMDA e AMPA em diversas estruturas encefálicas, tais como HPC e CPF (Tsankova et al., 2007; Krishnan & Nestler, 2008; Ampuero et al., 2010; Donev & Alawan, 2015; Castren & Kojima, 2017). No entanto, nossos resultados não indicaram alterações induzidas pelo estresse e/ou tratamento com imipramina nos níveis dos transcritos estudados. Uma possibilidade seria o fato de que em nosso protocolo experimental para coleta das amostras, os animais não são submetidos a sessão teste, sendo sacrificados no momento em que seriam testados. Nesse sentido, estudos mostram a ocorrência de diferenças individuais quanto a reatividade ao estresse (Febbraro et al., 2017), por exemplo alguns ratos submetidos ao desamparo aprendido são susceptíveis, enquanto outros mostram-se resilientes aos efeitos dos choques inescapáveis (Vollmayr & Henn, 2001). Dessa forma, nossos dados moleculares não são diretamente correlacionados com o comportamento e portanto, embora nenhuma alteração molecular significativa tenha sido observada, não podemos excluir a possibilidade do estresse e/ou tratamento com imipramina ser capaz de modular a transcrição dos diversos genes analisados.

Os mecanismos epigenéticos vêm sendo propostos a fim de explicar como o ambiente poderia interferir no comportamento tipo-depressivo, o que seria de grande relevância para a compreensão da fisiopatologia da depressão, uma vez que é sabido que o estresse (fator ambiental) predispõe o indivíduo a depressão (Shelton, 2007; McCrory et al., 2012). De fato, evidências científicas têm sugerido o envolvimento de mecanismos epigenéticos em diversas doenças mentais e neurológicas, tais como epilepsia, esquizofrenia, doença de Parkinson e Alzheimer (Urduingio et al., 2009; Qureshi & Mehler, 2010; Iraola-Guzman et al., 2011; Maric & Svrakic, 2012). Segundo Mehler (2008), a epigenética desempenharia um papel crucial na modulação, desenvolvimento celular e do organismo, na homeostase, envelhecimento e na herança transgeracional. Assim, os mecanismos epigenéticos estariam relacionados com a neurogênese, migração celular, conectividade sináptica e plasticidade neural, além de orquestrar as funções cognitivas, incluindo aprendizagem e memória (revisado em Jobe & Zhao, 2017; Yuen et al., 2017).

Dentre os mecanismos epigenéticos mais estudados, podemos destacar a metilação de DNA que consiste na adição do radical metil ao carbono 5 da citosina em ICGs catalisada pelas

enzimas DNMTs (Borrelli et al., 2008). O mapeamento do genoma humano (Lander et al., 2001) indicou cerca de 29000 ICGs existentes (Grayson & Guidotti, 2013). As ICGs são regiões do DNA que contém sequências de dinucleotídeos citosina-guanina, frequentemente presentes em mais de 70% dos promotores, estando amplamente distribuídas pelo DNA. Uma vez estabelecida durante o desenvolvimento, o padrão de metilação de DNA foi por muito tempo considerado estável em células diferenciadas do sistema nervoso. No entanto, estudos em roedores demonstraram que a metilação de DNA muda dinamicamente em resposta a estímulos diversos, tais como fatores psicossociais, dieta ou drogas (Sharma et al., 2010).

Várias evidências sugerem que padrões anormais de metilação de DNA estejam envolvidos com a neurobiologia da depressão. De fato, foi demonstrado que o bloqueio da metilação de DNA no NAc (LaPlant et al., 2010), no HPC (Sales et al., 2011) ou mesmo a administração sistêmica de DNMTi induz efeito tipo-antidepressivo no FST (Sales et al., 2011; Sales & Joca, 2016). Além disso, a análise do cérebro de pacientes deprimidos demonstrou níveis alterados de metilação de DNA em diversas regiões encefálicas em comparação a controles saudáveis (Poulter et al., 2008; Guidotti & Grayson, 2011).

Embora diversos estudos tenham sugerido que a metilação de DNA no cérebro esteja intimamente relacionada com a plasticidade sináptica e depressão (Illingworth & Bird, 2009; Sales et al., 2011; Sales & Joca, 2016, 2018), o real envolvimento desse mecanismo na patofisiologia da depressão permanece pouco compreendida. O processo de metilação do DNA é catalisado pelas DNMTs que inclui DNMT1, DNMT2, DNMT3a, DNMT3b e DNMT3L (Aapola et al., 2001; Chedin et al., 2002; Ginno et al., 2012). A DNMT3L facilitaria a ligação do radical metil catalisada pelos outros subtipos das DNMTs, e dessa forma facilitaria a metilação *in vivo* (Kareta et al., 2006) enquanto que a DNMT2 parece ser pouco ou nada ativa. No sistema nervoso, DNMT1 e DNMT3a são predominantes em termos de função neuronal pós-mitótica (Feng et al., 2005). Enquanto a DNMT3b encontra-se mais expressa durante os estágios iniciais de neurogênese, a DNMT3a está presente predominantemente em neurônios pós-mitóticos e alguns oligodendrócitos. DNMT1 é expressa em altos níveis durante a embriogênese e maturação no cérebro. De modo geral, DNMTs 3a e 3b associam-se com as novas metilações (“*de novo*”) e DNMT1 estaria mais relacionada com a propagação da metilação durante as gerações (Hermann et al., 2004). DNMT3L é cataliticamente inativa, sua função seria estimular e direcionar a atividade das DNMTs 3a e 3b (Grayson & Guidotti, 2013).

Poulter e colaboradores (2008) observaram que suicidas deprimidos tem alteração nos níveis de DNMT1 e DNMT3b em diversas regiões cerebrais, tais como córtex e amígdala, sugerindo o participação dessas enzimas no transtorno depressivo. Além disso, estudos tem

demonstrado que os antidepressivos alteram a expressão gênica no cérebro (Manji et al., 1999; Coyle & Duman, 2003) sugerindo que alteração na síntese proteica seja um dos principais fatores envolvidos na patofisiologia da depressão. Assim, uma vez que os mecanismos epigenéticos podem alterar a expressão de diversos genes, e a metilação de DNA é catalisada pelas DNMTs, há possibilidade de que os antidepressivos possam alterar esse mecanismo e dessa forma alterar a expressão de genes envolvidos nesse transtorno por meio de mecanismos epigenéticos.

Nesse contexto, Zimmermann e colaboradores (2012) demonstraram que em cultura cortical de astrócitos de ratos, antidepressivos, como os tricíclicos, atenuavam a atividade da enzima DNMT1, sem se ligarem diretamente a essa enzima, sugerindo que os antidepressivos poderiam de fato afetar a metilação de DNA indiretamente. Recentemente, mostramos que o estresse dos choques nas patas aumenta os níveis globais de metilação de DNA, assim como de DNMT3a e 3b, no HPC dorsal e CPF de ratos submetidos ao LH, enquanto que o tratamento repetido com imipramina é capaz de atenuar esses efeitos no CPF (Sales & Joca, 2018), sugerindo que a metilação de DNA nessa estrutura cerebral seja importante na modulação das respostas comportamentais induzidas pelo estresse e pelo tratamento com antidepressivos.

Embora diversas evidências indiquem que o estresse e o tratamento com antidepressivos são capazes de alterar a metilação de DNA, no presente trabalho não realizamos essas análises uma vez que não identificamos alterações nos níveis de transcritos induzidos pelo estresse ou tratamento com imipramina dos diferentes genes estudados. No entanto, é possível ainda que outros genes, não investigados nesse estudo, tenham tido sua expressão regulada pelo tratamento por meio de mecanismos epigenéticos.

Em decorrência do grande número de doenças causadas por alterações do epigenoma, incluindo o câncer, muitas pesquisas têm sido realizadas visando reverter esses mecanismos anormais. Atualmente tem sido utilizados alguns fármacos que interferem na ação das DNMTs, porém, como não se conhece ainda os mecanismos que os direcionam para sítios específicos no DNA, os estudos se baseiam na reversão global da metilação de DNA. Dentre os fármacos utilizados clinicamente, destaca-se o 5-AzaD que é um análogo nucleosídico, sendo incorporado à molécula do DNA como citosina durante a replicação e, se ligando covalentemente a enzima DNMT. Esta ligação resulta na inibição da metilação de DNA (Gowher & Jeltsch, 2004; Yoo & Jones, 2006; Fandy, 2009). Essa droga apresenta baixa estabilidade química, especificidade e significantes efeitos adversos decorrentes de sua citotoxicidade (Stresemann & Lyko, 2008; Gros et al., 2012). O RG108 é outro fármaco que inibe a metilação de DNA, porém não é análogo de um nucleosídeo, de modo que age

interferindo no sítio catalítico da enzima DNMT, bloqueando o reconhecimento do substrato (Fandy, 2009) e resultando em menos efeitos adversos (Xu et al., 2016). Os estudos são controversos com relação a sua potência e seletividade, especialmente nos ensaios biológicos (Fahy et al., 2012), sendo considerado um inibidor não-seletivo (Yang et al., 2017) ou preferencial de DNMT1 (Singh et al., 2013; Dikmen, 2017). Portanto, nesse trabalho optamos pela utilização dessas duas drogas quimicamente não relacionadas e que, por mecanismos diferentes, são capazes de inibir as DNMTs, conferindo maior segurança de que os resultados observados com a administração dessas drogas estariam relacionados a inibição da metilação de DNA.

Anteriormente, havíamos demonstrado que a administração aguda de 5-AzaD resulta na diminuição no tempo de imobilidade, efeito considerado tipo-antidepressivo, em camundongos submetidos ao FST (Sales & Joca, 2016). Além disso, a administração de RG108 em camundongos também induziu efeito similar nesses animais, de maneira semelhante ao observado em animais tratados com antidepressivos convencionais (desipramina e fluoxetina), sugerindo que a inibição das DNMTs esteja envolvida com a resposta aguda ao estresse (Sales & Joca, 2016). Outros trabalhos também sugerem que a inibição das DNMTs induz efeito tipo-antidepressivo e que, portanto, a metilação de DNA estaria intimamente relacionada a resposta ao estresse inescapável e a neurobiologia da depressão (LaPlant et al., 2010; Sales et al., 2011; Uchida et al., 2011; Xing et al., 2014; Dyrvig et al., 2015; Sales & Joca, 2016). No entanto, nenhum desses trabalhos avaliou se uma única injeção seria capaz de induzir efeito antidepressivo, utilizando um modelo que não responde ao tratamento agudo com antidepressivos convencionais. Nesse sentido, nossos resultados mostram que a administração sistêmica aguda de DNMTi (i.p., 5-AzaD e RG108), diferente de antidepressivos convencionais, resulta em efeito tipo-antidepressivo agudo (1h após a injeção). Interessantemente, a administração de uma única injeção de DNMTi (5-AzaD e RG108) resulta em efeito sustentado (7 dias após a injeção) nos animais submetidos ao LH.

Os mecanismos associados a memória e aprendizado devem ser considerados quando avaliamos os efeitos comportamentais observados no LH. Evidências na literatura sugerem que animais submetidos a estressores, como choques nas patas, apresentam déficits de atenção, aprendizagem e memória (Song et al., 2006; Yang et al., 2016), semelhante ao que é evidenciado em pacientes deprimidos (Clark et al., 2009; Hammar & Ardal, 2009; Marazziti et al., 2010). Enquanto que o tratamento repetido com antidepressivos é capaz de atenuar essas alterações em animais e humanos (Song et al., 2006; Clark et al., 2009; Hammar et al., 2009; Schulz et al., 2010; Marazziti et al., 2010). A fim de excluir um possível efeito sustentado

induzido por prejuízo na consolidação da memória aversiva, realizamos também uma única injeção 24h após a sessão PT (CI) e, de forma similar a injeção imediatamente após o PT, os animais apresentaram efeito tipo-antidepressivo no dia do teste (6 dias após a injeção), sustentando assim a hipótese de que essa classe de drogas poderia apresentar efeito duradouro uma vez que a metilação de DNA vêm sendo associada a modificações persistentes (Champagne et al., 2003).

Nesse sentido, estudos pré-clínicos tem demonstrado que a ketamina, droga com ação antidepressiva aguda e duradoura, apresenta rápido aumento na sinaptogênese cortical (Li et al., 2010; 2011) e hipocampal (Ardalan et al. 2016). Assim, os DNMTi agudamente poderiam levar a alteração na expressão de genes importantes para a plasticidade sináptica e efeito tipo-antidepressivo mantendo seu efeito por longo prazo (7 dias após uma única injeção), mesmo após a droga ter sido totalmente eliminada do organismo (tempo de meia-vida; RG108: 4 horas, Schneeberger et al., 2015; e 5-AzaD: 40 minutos, Marcucci et al., 2005).

Nossos resultados mostraram que o estresse dos choques nas patas induziu aumento na metilação de DNA acompanhado de redução nos níveis de RNAm para BDNF exon IV e TrkB no CPF, enquanto que o tratamento com RG108 atenuou os níveis de metilação no BDNF, sugerindo que o estresse e a inibição das DNMTs no CPF são importantes para o comportamento de ratos submetidos ao LH. De fato, o CPF parece estar envolvido com a resposta ao estresse e depressão. Estudos realizados em roedores estressados, assim como em humanos deprimidos, relatam reduzida atividade e conectividade sináptica nessa estrutura encefálica (Savitz & Drevets, 2009; Li et al., 2011; Kang et al., 2012; Treadway et al., 2015). Ainda, diferentes estressores são capazes de alterar (aumentando ou reduzindo, dependendo do estressor) a metilação de DNA no BDNF IV, assim como os níveis de seu RNAm e proteína (Mallei et al., 2018; Boersma et al., 2014).

O BDNF é uma neurotrofina amplamente expressa no SNC associada com sobrevivência e diferenciação celular (Courtney et al., 1997; Shelly et al., 2007; Yu et al., 2008), organização e manutenção da atividade neural no SNC (Castren, 2005), além de ter sido relacionada a neurobiologia da depressão (Karege et al., 2005; Duman & Monteggia, 2006; Krishnan & Nestler, 2008). Ainda, estudos sugerem que o estresse é capaz de alterar os níveis de metilação de DNA e consequentemente a expressão de BDNF em diferentes estruturas cerebrais. Ratos submetidos a cuidados maternos reduzidos, por exemplo, apresentam aumentados níveis de metilação de DNA no BDNF IV acompanhados de reduzidos níveis de proteína expressa no CPF (Roth et al., 2009).

No cérebro, o BDNF é expresso por neurônios glutamatérgicos (Andreska et al., 2014; Zafra et al., 1992), células da glia como astrócitos (Aliaga, Mendoza, & Tapia-Arancibia, 2009) e micróglia (Parkhurst et al., 2013). A estrutura do gene para BDNF é complexa com 11 diferentes exons em humanos e 9 em roedores, além de 9 promotores alternativos em ambos, sendo possível múltiplos transcritos a partir da mesma sequência gênica. Dados recentes indicam que 22 diferentes RNAm podem ser obtidos do gene para BDNF (revisado em Diniz et al., 2018). O BDNF é sintetizado como um pré-pro-peptídeo, clivado para pro-BDNF e convertido para BDNF maduro. O BDNF formado é armazenado em vesículas sendo liberado de forma dependente, ou não, de estímulos tais como estresse ou hipóxia. Uma vez secretados na matriz extracelular, o BDNF interage com seus receptores. A ativação dos receptores TrkB pelo BDNF ativa três principais vias intracelulares: via da proteína quinase ativada por mitógeno MAPK-ERK, via da fosfolipase $C\gamma$ (PLC γ 1)-PKC e a via da fosfatidil inositol quinase PI3K-AKT-mTOR. Estudo *in vivo* mostra que um agonista TrkB, 7,8 dihidroflavona (7,8 DHF) é capaz de induzir efeito tipo-antidepressivo em camundongos submetidos ao FST e TST, além de atenuar a redução nos níveis de PSD-95 (proteína de densidade pós-sináptica, *postsynaptic density protein 95*, marcador de sinaptogênese) induzida pelo estresse de derrota social no CPF e HPC (Zhang et al., 2015). Ainda, a infusão bilateral de 7,8 DHF no CPF medial (infralímbico, IL) induz efeito tipo-antidepressivo em ratos submetidos ao LH, sugerindo que a ativação desse receptor no CPF seria importante para a resposta comportamental ao estresse (Shirayama et al., 2015). A metilação de DNA no gene para TrkB também tem sido associada aos efeitos do estresse. Por exemplo, as análises realizadas no córtex de indivíduos suicidas demonstram aumento na metilação de DNA acompanhada de redução na expressão de TrkB (Maussion et al., 2014).

A sinalização mediada por BDNF-TrkB tem sido implicada no efeito antidepressivo rápido e sustentado induzido por drogas como a ketamina. Estudos demonstram que a administração de ketamina rapidamente aumenta as conexões sinápticas no CPF e reverte os déficits causados pelo estresse crônico (Li et al., 2010, 2011). Embora o esperado para o antagonismo de receptores NMDA seja o bloqueio da neurotransmissão excitatória glutamatérgica, foi mostrado que baixas doses de ketamina seriam capazes de aumentar a liberação de glutamato, possivelmente através de sua interação com receptores NMDA presentes em interneurônios GABAérgicos inibindo assim sua ação inibitória e desinibindo os neurônios piramidais nesta estrutura. O glutamato ativaria os receptores AMPA pós-sinápticos resultando na rápida liberação de BDNF que ativaria seus receptores TrkB desencadeando cascatas intracelulares que culminariam na ativação de mTOR (proteína alvo da rapamicina em

mamíferos, *mammalian target of rapamycin*) e posterior síntese de diferentes proteínas associadas a resposta ao estresse (revisado em Zanos & Gould, 2018). Embora os mecanismos acima não tenham sido descritos para as DNMTi, uma vez que pioneiramente identificamos efeito tipo-antidepressivo rápido e sustentado, é possível que essas drogas aumentem a liberação de BDNF (e ativação de TrkB) resultando na ativação de cascatas que culminem com a transcrição gênica. Assim, o estresse poderia contribuir para o aumento no nível de metilação de DNA e redução nos níveis de transcritos para BDNF IV e TrkB no CPF. Por outro lado, RG108 impediria a metilação por se ligar diretamente as enzimas DNMTs, reduzindo a metilação de DNA e aumentando a transcrição nesses genes, regulando assim via prejudicadas pelo estresse.

Tem sido demonstrado que assim como a metilação de DNA, os níveis de RNAm também podem ser agudamente modulados em resposta ao estresse. Mifsud e colaboradores (2017) avaliaram os níveis de RNAm para GR no HPC de ratos submetidos ao FST (15 minutos de natação forçada) e encontraram reduzidos níveis de transcritos 45 minutos após o estresse. Nesse sentido, a administração de RG108 1h antes do teste, de forma semelhante as realizadas imediatamente ou 24h após o PT, resultou na atenuação dos efeitos induzidos pelo estresse nos níveis de RNAm para BDNF e TrkB no CPF.

A análise dos níveis da proteína BDNF não demonstrou alteração induzida pelo estresse ou tratamento com RG108 no presente trabalho, entretanto nossos dados refletem o BDNF total sintetizado, não separando BDNF maduro e pro-BDNF. É sabido que o pro-BDNF apresenta maior afinidade pelo receptor de neurotrofina p75, enquanto que o BDNF maduro apresenta pelo receptor TrkB, desencadeando assim a ativação de cascatas intracelulares resultando em seus efeitos. Os processos mediados pelo pro-BDNF parecem ter efeitos opostos aos mediados pelo BDNF maduro, tais como apoptose e redução de arborização, embora também possa mediar efeitos que facilitam a plasticidade sináptica como a maturação de espinhos dendríticos (revisado em Diniz et al., 2018). Dessa forma, a medida dos níveis da proteína BDNF nos animais estressados e tratados ou não com RG108 que realizamos neste estudo reflete a somatória de pro-BDNF e BDNF maduro, que no caso não resultou em alteração significativa. Ainda, as amostras utilizadas para o ELISA foram armazenadas por um longo período podendo ter comprometido a integridade das proteínas e, consequentemente o resultado obtido pela técnica. Em virtude da descontinuidade do fornecimento da linhagem de animais utilizados (ratos *Wistar*) pela Universidade, não conseguimos repetir o experimento para coletar novas amostras e, assim, refazer essas medidas para confirmar ou não o resultado obtido, e dessa

forma, esse resultado não foi considerado confiável. Em virtude do possível problema com a integridade das amostras, não realizamos as medidas dos níveis proteicos de TrkB.

Ainda, os mecanismos moleculares envolvidos na resposta aguda (1h) induzida pelo tratamento com DNMTi não são claros. Até o momento, a inibição das enzimas DNMTs é o único mecanismo de ação descrito para essa classe de drogas. Entretanto não podemos excluir a possibilidade da existência de outros mecanismos associados a sua administração aguda.

Curiosamente, o efeito induzido pelo estresse sobre os níveis de transcritos foram divergentes entre os experimentos com imipramina e RG108. Entretanto, vale lembrar que: 1) os veículos utilizados são diferentes, sendo salina para o grupo imipramina e salina + tween para o grupo RG108; 2) embora o principal estressor seja similar (choques nas patas), o protocolo de injeções (outro estressor a ser considerado) é diferente, o grupo imipramina é submetido a 7 injeções sistêmicas enquanto que o grupo RG108 recebe apenas uma única injeção; e 3) os experimentos foram realizados em momentos diferentes onde a variação individual dos animais deve ser considerada; 4) no protocolo para coleta das amostras, os animais não são submetidos a sessão teste e portanto não é possível uma correlação entre comportamento e dado molecular.

Ainda, embora nossos dados não indiquem alterações em outras estruturas (HPC dorsal e ventral) e nos demais genes analisados (5-HT_{1A}, NMDA2a e AMPA1), não podemos excluir a possibilidade de que a metilação de DNA e os níveis de transcritos e proteínas sejam modulados pelo estresse e/ou tratamentos utilizados em virtude das limitações do trabalho (detalhadas a seguir).

LIMITAÇÕES DO TRABALHO

7 LIMITAÇÕES DO TRABALHO

O presente estudo apresentou importantes limitações que devem consideradas:

1) no protocolo experimental realizado para coleta das amostras, os animais não são submetidos a sessão teste e, portanto, o efeito comportamental do estresse e/ou tratamento nesses animais é desconhecido;

2) as amostras utilizadas no ELISA para BDNF foram armazenadas por um longo período sendo possível um comprometimento na integridade das proteínas;

3) embora haja amplas evidências que suportam o papel funcional da metilação em ICGs localizadas em promotores como repressor transcricional (Stein et al., 1982; De Smet et al., 1999; Weber et al., 2007), vários genes não apresentam correlação entre ICGs hipermetiladas e estado transcricional (Oakes et al., 2007; Illingworth et al., 2008; Rauch et al., 2009). De fato, embora ICGs apresentem-se co-localizadas com promotores de quase todos os genes expressos constitutivamente (Larsen et al., 1992), várias ICGs metiladas localizam-se em regiões intergênicas, fora de promotores, sendo que sua função regulatória nessas regiões permanece indeterminada (Echardt et al., 2006; Illingworth et al., 2008; Rauch et al., 2009). Portanto, ao realizar apenas a imunoprecipitação, toda citosina metilada é isolada, não sendo possível separar as metilações nas citosinas de ICGs das localizadas em outras regiões;

4) com relação aos genes selecionados, nenhuma alteração foi observada para 5-HT_{1A}, NMDA2a e AMPA1. É importante salientar que apenas 1 tipo de cada receptor foi analisado (5-HT_{1A}, NMDA2a e AMPA1), não podendo, portanto, excluir alguma alteração nos demais tipos.

CONCLUSÃO

8 CONCLUSÃO

A administração de drogas inibidoras de DNMTs, diferente dos antidepressivos convencionais, é capaz de induzir efeito tipo-antidepressivo agudo e sustentado. O estresse dos choques nas patas aumentou os níveis de metilação de DNA e reduziu os de RNAm para BDNF IV e TrkB no CPF. O tratamento com RG108 é capaz de atenuar tais alterações induzidas pelo estresse, sugerindo que a regulação da metilação de DNA nessa estrutura seja um mecanismo importante na modulação das alterações comportamentais induzidas pelo estresse e no efeito tipo-antidepressivo.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

9 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Aapola U et al. (2001) "Isolation and initial characterization of the mouse Dnmt3l gene." Cytogenetics and cell genetics 92:122-126.
- Abdallah CG et al. (2016) "Ketamine's mechanism of action: a path to rapid-acting antidepressants." Depress Anxiety 33(8):689-97.
- Abdallah CG et al. (2018) "The neurobiology of depression, ketamine and rapid-acting antidepressants: Is it glutamate inhibition or activation?" Pharmacol Ther. pii: S0163-7258(18)30090-1.
- Adachi M et al. (2008) "Selective loss of brain-derived neurotrophic factor in the dentate gyrus attenuates antidepressant efficacy." Biological psychiatry 63:642-649.
- Agid Y et al. (2007) "How can drug discovery for psychiatric disorders be improved?" Nature reviews Drug discovery 6:189-201.
- Alt A, Nisenbaum ES, Bleakman D, Witkin JM (2006) "A role for AMPA receptors in mood disorders." Biochemical pharmacology. 71(9):1273-88.
- Aliaga EE, Mendoza I, Tapia-Arancibia L (2009) Distinct subcellular localization of BDNF transcripts in cultured hypothalamic neurons and modification by neuronal activation." J Neural Transm (Vienna). 116(1):23-32.
- American Psychiatric Association (2013). Diagnostic and statistical manual of mental disorders 5th ed., Washington DC:APA Press.
- Ampuero et al. (2010) "Chronic fluoxetine treatment induces structural plasticity and selective changes in glutamate receptor subunits in the rat cerebral cortex." Neuroscience. 11;169(1):98-108.
- Andrade C & Rao NS (2010) "How antidepressant drugs act: A primer on neuroplasticity as the eventual mediator of antidepressant efficacy." Indian journal of psychiatry 52:378-386.
- Andreska T, Aufmkolk S, Sauer M, Blum R (2014) "High abundance of BDNF within glutamatergic presynapses of cultured hippocampal neurons." Front Cell Neurosci. 11;8:107.
- Anisman H & Matheson K (2005) "Stress, depression, and anhedonia: caveats concerning animal models." Neuroscience and biobehavioral reviews 29:525-546.
- Ardalan M et al. (2016) Neurovascular plasticity of the hippocampus one week after a single dose of ketamine in genetic rat model of depression." Hippocampus 26(11):1414-1423.

- Bachman KE, Rountree MR, Baylin SB. (2001) "Dnmt3a and Dnmt3b are transcriptional repressors that exhibit unique localization properties to heterochromatin." The Journal of biological chemistry 276:32282-32287.
- Bannister AJ & Kouzarides T (2011) "Regulation of chromatin by histone modifications." Cell research 21:381-395.
- Barbas H (1995) "Anatomic basis of cognitive-emotional interactions in the primate prefrontal cortex." Neuroscience and biobehavioral reviews 19:499-510.
- Bartlett AA, Singh R, Hunter RG (2017) "Anxiety and Epigenetics." Adv Exp Med Biol. 978:145-166.
- Berman RM et al. (2000) "Antidepressant effects of ketamine in depressed patients." Biol Psychiatry 47(4): 351-354.
- Berton O & Nestler EJ (2006) "New approaches to antidepressant drug discovery: beyond monoamines." Nature reviews Neuroscience 7:137-151.
- Besson A, Privat AM, Eschalier A, Fialip J (1996) "Effects of morphine, naloxone and their interaction in the learned-helplessness paradigm in rats." Psychopharmacology 123(1):71-8.
- Bijl RV & Ravelli A (2000). "Current and residual functional disability associated with psychopathology: findings from the Netherlands Mental Health Survey and Incidence Study (NEMESIS)." Psychol Med 30(3): 657-668.
- Björkholm C & Monteggia LM (2016) "BDNF – a key transducer of antidepressant effects." Neuropharmacology 102:72-9.
- Bilang-Bleuel A et al. (2005) "Psychological stress increases histone H3 phosphorylation in adult dentate gyrus granule neurons: involvement in a glucocorticoid receptor-dependent behavioural response." The European journal of neuroscience 22:1691-1700.
- Boersma GJ et al. (2014) "Prenatal stress decreases Bdnf expression and increases methylation of Bdnf exon IV in rats." Epigenetics 9(3):437-47.
- Bocchio-Chiavetto L et al. (2010) "Serum and plasma BDNF levels in major depression: a replication study and meta-analyses." World J Biol Psychiatry 11(6):763-73.
- Bonefeld BE, Elfving B, Wegener G (2008) "Reference genes for normalization: a study of rat brain tissue." Synapse 62(4):302-9.
- Borrelli E et al. (2008) "Decoding the epigenetic language of neuronal plasticity." Neuron 60:961-974.

Bourc'his D & Bestor TH (2004) "Meiotic catastrophe and retrotransposon reactivation in male germ cells lacking Dnmt3L." Nature 431:96-99.

Bourc'his D et al. (2001) "Dnmt3L and the establishment of maternal genomic imprints." Science 294:2536-2539.

Bradford MM (1976) "A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding." Anal Biochem. 7;72:248-54.

Brown SM, Henning S, Wellman CL (2005) "Mild, short-term stress alters dendritic morphology in rat medial prefrontal cortex." Cerebral cortex 15:1714-1722.

Burke TF et al. (2013) "Sensitivity of hippocampal 5-HT1A receptors to mild stress in BDNF-deficient mice." Int J Neuropsychopharmacol 16(3): 631-645.

Carr, G. V. and I. Lucki (2011). "The role of serotonin receptor subtypes in treating depression: a review of animal studies." Psychopharmacology (Berl) 213(2-3): 265-287.

Castren E (2005) "Is mood chemistry?" Nature reviews Neuroscience 6:241-246.

Castren E & Rantamaki T (2010) "The role of BDNF and its receptors in depression and antidepressant drug action: Reactivation of developmental plasticity." Developmental neurobiology 70:289-297.

Castren E & Kojima M (2017) "Brain-derived neurotrophic factor in mood disorders and antidepressant treatments." Neurobiol. Dis. 97(Pt B):119-126.

Cattaneo A et al. (2015) "Inflammation and neuronal plasticity: a link between childhood trauma and depression pathogenesis." Front Cell Neurosci. 31;9:40.

Ceoffroy M & Christensen AV (1993) "Psychomotor stimulants versus antidepressants in the learned helplessness model of depression." Drug Development Research 29:4&55.

Champagne FA et al. (2003) "Variations in maternal care in the rat as a mediating influence for the effects of environment on development." Physiology & behavior 79:359-371.

Chandramohan Y et al. (2008) "The forced swimming-induced behavioural immobility response involves histone H3 phospho-acetylation and c-Fos induction in dentate gyrus granule neurons via activation of the N-methyl-D-aspartate/extracellular signal-regulated kinase/mitogen- and stress-activated kinase signalling pathway." The European journal of neuroscience 27:2701-2713.

Chandrasekar R (2013) "Alcohol and NMDA receptor: current research and future direction." Front Mol Neurosci 6: 14.

Charney DS & Manji HK (2004) "Life stress, genes, and depression: multiple pathways lead to increased risk and new opportunities for intervention." Science's STKE: signal transduction knowledge environment 2004:re5.

Chedin F, Lieber MR, Hsieh CL (2002) "The DNA methyltransferase-like protein DNMT3L stimulates de novo methylation by Dnmt3a." Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 99:16916-16921.

Chen S et al. (2010) "HDAC6 regulates mitochondrial transport in hippocampal neurons." PloS one 5:e10848.

Cheetham SC, Crompton MR, Katona CL, Horton RW (1990) "Brain 5-HT₁ binding sites in depressed suicides." Psychopharmacology (Berl) 102(4): 544-548.

Chourbaji S et al. (2005) "Learned helplessness: validity and reliability of depressive-like states in mice." Brain Res Brain Res Protocol. 16(1-3):70-8.

Clark L, Chamberlain SR, Sahakian BJ (2009) "Neurocognitive mechanisms in depression: implications for treatment." Annu Ver Neurosci. 32:57-74.

Cook SC & Wellman CL (2004) "Chronic stress alters dendritic morphology in rat medial prefrontal cortex." Journal of neurobiology 60:236-248.

Coppen A (1972) "Indoleamines and affective disorders." Journal of psychiatric research 9:163-171.

Coppens CM et al. (2011) "Social defeat during adolescence and adulthood differentially induce BDNF-regulated immediate early genes." Front Behav Neurosci. 2;5:72.

Courtney MJ, Akerman KE, Coffey ET (1997) "Neurotrophins protect cultured cerebellar granule neurons against the early phase of cell death by a two-component mechanism." The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience 17:4201-4211.

Covington HE.^{3rd} et al. (2009) "Antidepressant actions of histone deacetylase inhibitors." The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience 29:11451-11460.

Coyle JT & Duman RS (2003) "Finding the intracellular signaling pathways affected by mood disorder treatments." Neuron 38:157-160.

Cryan JF, Markou A, Lucki I (2002) "Assessing antidepressant activity in rodents: recent developments and future needs." Trends in pharmacological sciences 23:238-245.

Czeh B et al. (2008) "Chronic stress-induced cellular changes in the medial prefrontal cortex and their potential clinical implications: does hemisphere location matter?" Behav Brain Res 190:1-13.

- Deakin JF & Graeff FG (1991). "5-HT and mechanisms of defence." J Psychopharmacol 5(4): 305-315.
- Dean J & Keshanan M (2017) "The neurobiology of depression: an integrated view." Asian J Psychiatr. 27:101-111.
- De Smet et al. (1999) "DNA methylation is the primary silencing mechanism for a set of germ line- and tumor-specific genes with a CpG-rich promoter." Mol Cell Biol. 19(11):7327-35.
- Dess NK et al. (1988) "Stressors in the learned helplessness paradigm: effects on body weight and conditioned taste aversion in rats." Physiology & behavior 44:483-490.
- Dikmen M (2017) "Comparison of the effects of curcumin and RG108 on NGF-induced PC-12 adh cell differentiation and neurite outgrowth." J Med Food. 20(4):376-384.
- Diniz CRAF, Casarotto PC, Resstel L, Joca SRL (2018) "Beyond good and evil: A putative continuum-sorting hypothesis for the functional role of proBDNF/BDNF-propeptide/mBDNF in antidepressant treatment." Neurosci Biobehav Rev. 90:70-83.
- Donev R & Alawam K (2015) "Alterations in gene expression in depression: prospects for personalize patient treatment." Adv Protein Chem Struct Biol. 101:97-124.
- Duman RS (2004) "Role of neurotrophic factors in the etiology and treatment of mood disorders." Neuromolecular medicine 5:11-25.
- Duman RS, Heninger GR, Nestler EJ (1997) "A molecular and cellular theory of depression." Archives of general psychiatry 54:597-606.
- Dyrvig M, Gotzsche CR, Woldbye DP, Lichota J (2015) "Epigenetic regulation of Dnmt3a and Arc gene expression after eletroconvulsive stimulation in the rat." Mol Cell Neurosci. 67:137-43.
- Duman RS & Monteggia LM (2006) "A neurotrophic model for stress-related mood disorders." Biological psychiatry 59:1116-1127.
- Duncan GE et al. (1996) "Functional classification of antidepressants based on antagonism of swim stress-induced fos-like immunoreactivity." The Journal of pharmacology and experimental therapeutics 277:1076-1089.
- Dwivedi Y et al. (2003). "Altered gene expression of brain-derived neurotrophic factor and receptor tyrosine kinase B in postmortem brain of suicide subjects." Arch Gen Psychiatry 60(8): 804-815.
- Dwyer JM & Duman RS (2013) "Activation of mammalian target of rapamycin and synaptogenesis: role in the actions of rapid-acting antidepressants." Biol Psychiatry 15;73(12):1189-98.

- Eckhardt F et al. (2006) "DNA methylation profiling of human chromosomes 6,20 and 22." Nat Genet. 38(12):1378-85.
- Efstathopoulos P et al. (2018) "NR3C1 hypermethylation in depressed and bullied adolescents." Transl Psychiatry. 19;8(1):121.
- Elliott E et al. (2010) "Resilience to social stress coincides with functional DNA methylation of the Crf gene in adult mice." Nature neuroscience 13:1351-1353.
- Espallergues J et al. (2012) "HDAC6 regulates glucocorticoid receptor signaling in serotonin pathways with critical impact on stress resilience." The Journal of neuroscience: the official journal of the Society for Neuroscience 32:4400-4416.
- Fabbri C, Di Girolamo G, Serretti A (2013) "Pharmacogenetics of antidepressant drugs: an update after almost 20 years of research." American journal of medical genetics Part B, Neuropsychiatric genetics: the official publication of the International Society of Psychiatric Genetics 162B:487-520.
- Fahy J, Jeltsch A, Arimondo PB (2012) "DNA methyltransferase inhibitors in cancer: a chemical and therapeutic patent overview and selected clinical studies." Expert Opin Ther Pat. 22:1427-42.
- Fandy TE (2009) "Development of DNA methyltransferase inhibitors for the treatment of neoplastic diseases." Current medicinal chemistry 16:2075-2085.
- Fanselow MS & Dong HW (2010) "Are the dorsal and ventral hippocampus functionally distinct structures?" Neuron 65(1): 7-19.
- Febbraro F et al. (2017) "Neuronal substrates underlying stress resilience and susceptibility in rats." PLoS One. 16;12(6):e0179434.
- Feng J et al. (2005) "Dynamic expression of de novo DNA methyltransferases Dnmt3a and Dnmt3b in the central nervous system." Journal of neuroscience research 79:734-746.
- Feng J et al. (2010) "Dnmt1 and Dnmt3a maintain DNA methylation and regulate synaptic function in adult forebrain neurons." Nature neuroscience 13:423-430.
- Fernandez Macedo GV et al. (2013) "Effects of fluoxetine on CRF and CRF1 expression in rats exposed to the learned helplessness paradigm." Psychopharmacology (Berl) 225:647-659.
- Ferrari F & Villa RF (2017) "The neurobiology of depression: an integrated overview from biological theories to clinical evidence." Mol Neurobiol. 54(7):4847-4865.
- Fitzgerald PB et al. (2008) "A meta-analytic study of changes in brain activation in depression." Human brain mapping 29:683-695.

- Fox JH & Lowry CA (2013) "Corticotropin-releasing factor-related peptides, serotonergic systems, and emotional behavior." Frontiers in neuroscience 7:169.
- Fredman L., Weissman MM, Leaf PJ, Bruce ML (1988). "Social functioning in community residents with depression and other psychiatric disorders: results of the New Haven Epidemiologic Catchment Area Study." J Affect Disord **15**(2): 103-112.
- Fuchikami M et al. (2009) "Single immobilization stress differentially alters the expression profile of transcripts of the brain-derived neurotrophic factor (BDNF) gene and histone acetylation at its promoters in the rat hippocampus." The international journal of neuropsychopharmacology / official scientific journal of the Collegium Internationale Neuropsychopharmacologicum 12:73-82.
- Fuchikami M et al. (2011) "DNA methylation profiles of the brain-derived neurotrophic factor (BDNF) gene as a potent diagnostic biomarker in major depression." PLoS One 6(8): e23881.
- Fukada M et al. (2012) "Loss of deacetylation activity of Hdac6 affects emotional behavior in mice." PloS one 7:e30924.
- Gallagher P, Reid KS, Ferrier IN (2009) "Neuropsychological functioning in health and mood disorder: Modulation by glucocorticoids and their receptors." Psychoneuroendocrinology 34 Suppl 1:S196-207.
- Gardiner-Garden M & Frommer M (1987) "CpG islands in vertebrate genomes." J Mol Biol. 20;196(2):261-82.
- Geuze E et al. (2008) "Thinner prefrontal cortex in veterans with posttraumatic stress disorder." NeuroImage 41:675-681.
- Ginno PA et al. (2012) "R-loop formation is a distinctive characteristic of unmethylated human CpG island promoters." Molecular Cell 45:814-825.
- Girotti M et al. (2018) "Prefrontal cortex executive processes affected by stress in health and disease." Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry. 13;85:161-179.
- Golden SA et al. (2013) "Epigenetic regulation of RAC1 induces synaptic remodeling in stress disorders and depression." Nature medicine 19:337-344.
- Gowher H & Jeltsch A (2004) "Mechanism of inhibition of DNA methyltransferases by cytidine analogs in cancer therapy." Cancer biology & therapy 3:1062-1068.
- Gowher H et al. (2005) "De novo methylation of nucleosomal DNA by the mammalian Dnmt1 and Dnmt3A DNA methyltransferases." Biochemistry 44:9899-9904.
- Graeff FG, Guimarães FS, De Andrade TG, Deakin JF (1996) "Role of 5-HT in stress, anxiety, and depression." Pharmacol Biochem Behav 54(1): 129-141.

Grayson DR & Guidotti A (2013) "The dynamics of DNA methylation in schizophrenia and related psychiatric disorders." Neuropsychopharmacology : official publication of the American College of Neuropsychopharmacology 38:138-166.

Griffith JS & Mahler HR (1969) "DNA ticketing theory of memory." Nature 223:580-582.

Grigoryan G, Segal M (2016) "Lasting differential effects on plasticity induced by prenatal stress in dorsal and ventral hippocampus." Neural Plast. 2016:2540462.

Gros C et al. (2012) "DNA methylation inhibitors in câncer: recente and future approaches." Biochimie 94:2280-96.

Guidotti A & Grayson DR (2011) "A neurochemical basis for an epigenetic vision of psychiatric disorders (1994-2009)." Pharmacological research : the official journal of the Italian Pharmacological Society 64:344-349.

Hale MW, Shekhar A, Lowry CA (2012) "Stress-related serotonergic systems: implications for symptomatology of anxiety and affective disorders." Cell Mol Neurobiol. 32(5):695-708.

Hammar A & Ardal G (2009) "Cognitive functioning in major depression- a summary." Front Hum Neurosci. 3:26.

Harmer CJ, Duman RS, Cowen PJ (2017) "How do antidepressants work? New perspectives for refining future treatment approaches." Lancet Psychiatry 4(5):409-418.

Henningsson S et al. (2009) "Genetic variation in brain-derived neurotrophic factor is associated with serotonin transporter but not serotonin-1A receptor availability in men." Biol Psychiatry 66(5): 477-485.

Harmer CJ et al. (2006) "Antidepressant drug treatment modifies the neural processing of nonconscious threat cues." Biological psychiatry 59:816-820.

Hashimoto K (2011) "Role of the mTOR signaling pathway in the rapid antidepressant action of ketamine." Expert Rev Neurother. 11(1):33-6.

Hauer MH, Gasser SM (2017) "Chromatin and nucleosome dynamics in DNA damage and repair." Genes Dev. 15;31(22):2204-2221.

Herman JG & Baylin SB (2003) "Gene silencing in cancer in association with promoter hypermethylation." The New England journal of medicine 349:2042-2054.

Hermann A, Goyal R, Jeltsch A (2004) "The Dnmt1 DNA-(cytosine-C5)-methyltransferase methylates DNA processively with high preference for hemimethylated target sites." The Journal of biological chemistry 279:48350-48359.

Hervouet E et al. (2018) "Specific or not specific recruitment of DNMTs for DNA methylation, an epigenetic dilemma." Clin Epigenetics 9;10:17.

Higuchi F et al. (2011) "State-dependent changes in the expression of DNA methyltransferases in mood disorder patients." Journal of psychiatric research 45:1295-1300.

Hing B, Sathyaputri L, Potash JB (2018) "A comprehensive review of genetic and epigenetic mechanisms that regulate BDNF expression and function with relevance to major depressive disorder." Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet. 177(2):143-167.

Hobara T et al. (2010) "Altered gene expression of histone deacetylases in mood disorder patients." Journal of psychiatric research 44:263-270.

Holliday R (2006) "Epigenetics: a historical overview." Epigenetics : official journal of the DNA Methylation Society 1:76-80.

Holliday R & Pugh JE (1975) "DNA modification mechanisms and gene activity during development." Science 187:226-232.

Homberg JR, Molteni R, Calabrese F, Riva MA (2014) "The serotonin-BDNF duo: Developmental implications for the vulnerability to psychopathology." Neurosci Biobehav Rev 43C: 35-47.

Holsboer F (2000) "The corticosteroid receptor hypothesis of depression." Neuropsychopharmacology: official publication of the American College of Neuropsychopharmacology 23:477-501.

Homberg JR, Molteni R, Calabrese F, Riva MA (2014) "The serotonin-BDNF duo: Developmental implications for the vulnerability to psychopathology." Neurosci Biobehav Rev 43C: 35-47.

Horard B et al. (2009) "Global analysis of DNA methylation and transcription of human repetitive sequences." Epigenetics: official journal of the DNA Methylation Society 4:339-350.

Huang EJ & Reichardt LF (2001) "Neurotrophins: roles in neuronal development and function." Annu Rev Neurosci 24: 677-736.

Hunsberger JG et al. (2009) "Cellular mechanisms underlying affective resiliency: the role of glucocorticoid receptor- and mitochondrially-mediated plasticity." Brain research 1293:76-84.

Iraola-Guzman S, Estivill X, Rabionet R (2011) "DNA methylation in neurodegenerative disorders: a missing link between genome and environment?" Clinical genetics 80:1-14.

Illingworth R et al. (2008) "A novel CpG island set identifies tissue-specific methylation at developmental gene loci." PLoS Biol. 6(1):e22.

- Illingworth RS & Bird AP (2009) "CpG islands-'a rough guide'." FEBS letters 583:1713-1720.
- Ivy AS et al. (2003) "Noradrenergic and serotonergic blockade inhibits BDNF mRNA activation following exercise and antidepressant." Pharmacol Biochem Behav 75(1): 81-88.
- Jang HS et al. (2017) "CpG and non-CpG methylation in epigenetic gene regulation and brain function." Genes (Basel). 23;8(6). pii: E148.
- Jeltsch A (2006) "Molecular enzymology of mammalian DNA methyltransferases." Current topics in microbiology and immunology 301:203-225.
- Jenuwein T & Allis CD (2001) "Translating the histone code." Science 293:1074-1080.
- Jin W et al. (2011) "DNA methylation-dependent regulation of TrkA, TrkB, and TrkC genes in human hepatocellular carcinoma." Biochem Biophys Res Commun 406(1): 89-95.
- Jobe EM & Zhao X (2017) "DNA methylation and adult neurogenesis." Brain Plast 9;3(1):5-26.
- Joca SR, Padovan CM, Guimarães FS (2003) "Activation of post-synaptic 5-HT(1A) receptors in the dorsal hippocampus prevents learned helplessness development." Brain research 978:177-184.
- Joca SR, Zanelati T, Guimarães FS (2006) "Post-stress facilitation of serotonergic, but not noradrenergic, neurotransmission in the dorsal hippocampus prevents learned helplessness development in rats." Brain research 1087:67-74.
- Jochems J et al. (2013) "Antidepressant-Like Properties of Novel HDAC6-Selective Inhibitors with Improved Brain Bioavailability." Neuropsychopharmacology : official publication of the American College of Neuropsychopharmacology.
- Kang HJ et al. (2012) "Decreased expression of synapse-related genes and loss of synapses in major depressive disorder." Nat Med. 18(9):1413-7.
- Kang HJ et al. (2013) "BDNF promoter methylation and suicidal behavior in depressive patients." J Affect Disord 151(2): 679-685.
- Karahoca M & Momparler RL (2013) "Pharmacokinetic and pharmacodynamic analysis of 5-aza-2'-deoxycytidine (decitabine) in the design of its dose-schedule for cancer therapy." Clin Epigenetics 1;5(1):3.
- Karege F et al. (2005). "Neurotrophin levels in postmortem brains of suicide victims and the effects of antemortem diagnosis and psychotropic drugs." Brain Res Mol Brain Res 136(1-2): 29-37.
- Kareta MS et al. (2006) "Reconstitution and mechanism of the stimulation of de novo methylation by human DNMT3L." The Journal of biological chemistry 281:25893-25902.

- Karpova NN & Umemori J (2015) "Protocol for methylated DNA immunoprecipitation (MeDIP) analysis." In: Nina N. Karpova (Org.). *Epigenetic Methods in Neuroscience Research*. 1ed. New York: Springer, v.105, p.149-159.
- Keller S et al. (2010) "Increased BDNF promoter methylation in the Wernicke area of suicide subjects." *Archives of general psychiatry* 67:258-267.
- Keller S et al. (2011) "TrkB gene expression and DNA methylation state in Wernicke area does not associate with suicidal behavior." *J Affect Disord* 135(1-3): 400-404.
- Kessler RC, Akiskal HS, Ames, M, Birnbaum, HP, et al (2006). "Prevalence and effects of mood disorders on work performance in a nationally representative sample of U.S. workers." *Am J Psychiatry* 163(9): 1561-1568.
- Kim JK, Samaranayake M, Pradhan S (2009) "Epigenetic mechanisms in mammals." *Cellular and molecular life sciences* : CMLS 66:596-612.
- Kimpton J (2012) "The brain derived neurotrophic factor and influences of stress in depression." *Psychiatria Danubina* 24 Suppl 1:S169-171.
- Koenigs M et al. (2008) "Distinct regions of prefrontal cortex mediate resistance and vulnerability to depression." *The Journal of neuroscience*: the official journal of the Society for Neuroscience 28:12341-12348.
- Krishnan V & Nestler EJ (2008) "The molecular neurobiology of depression." *Nature* 455:894-902.
- Kular L & Kular S (2018) "Epigenetics applied to psychiatry: clinical opportunities and future challenges." *Psychiatry Clin Neurosci*. 72(4):195-211.
- Kundakovic M, Chen Y, Costa E, Grayson DR (2007). "DNA methyltransferase inhibitors coordinately induce expression of the human reelin and glutamic acid decarboxylase 67 genes." *Mol Pharmacol* 71(3): 644-653.
- Lander ES et al. (2001) "International Human Genome Sequencing C. Initial sequencing and analysis of the human genome." *Nature* 409:860-921.
- LaPlant Q et al. (2010) "Dnmt3a regulates emotional behavior and spine plasticity in the nucleus accumbens." *Nature neuroscience* 13:1137-1143.
- Larsen F, Gundersen G, Prydz H (1992) "Choice of enzymes for mapping based on CpG islands in the human genome." *Genet Anal Tech Appl*. 9(3):80-5.
- Lee JB et al. (2012) "Histone deacetylase 6 gates the synaptic action of acute stress in prefrontal cortex." *The Journal of physiology* 590:1535-1546.

- Lener MS (2017) "Ketamine and beyond: investigations into the potential of glutamatergic agents to treat depression." Drugs 77(4):381-401.
- Leonardo ED et al. (2006) "Molecular heterogeneity along the dorsal-ventral axis of the murine hippocampal CA1 field: a microarray analysis of gene expression." Neuroscience 137(1): 177-186.
- Lepack et al. (2014) "BDNF release is required for the behavioral actions of ketamine." Int J Neuropsychopharmacol. 31;18(1). Pii: pyu033.
- Levenson JM et al. (2006) "Evidence that DNA (cytosine-5) methyltransferase regulates synaptic plasticity in the hippocampus." The Journal of biological chemistry 281:15763-15773.
- Li X et al. (2001) "Antidepressant-like actions of an AMPA receptor potentiator (LY392098)." Neuropharmacology 40(8):1028-33.
- Li N et al. (2010) "mTOR-dependent synapse formation underlies the rapid antidepressant effects of NMDA antagonists." Science 329(5994):959-64.
- Li N et al. (2011) "Glutamate N-methyl-D-aspartate receptor antagonists rapidly reverse behavioral and synaptic deficits caused by chronic stress exposure." Biol Psychiatry 15;69(8):754-61.
- Liston C et al. (2006) "Stress-induced alterations in prefrontal cortical dendritic morphology predict selective impairments in perceptual attentional set-shifting." The Journal of neuroscience: the official journal of the Society for Neuroscience 26:7870-7874.
- Liu L et al. (2003) "Aging, cancer and nutrition: the DNA methylation connection." Mechanisms of ageing and development 124:989-998.
- Liu et al. (2017) "The role of neural plasticity in depression: from hippocampus to prefrontal cortex." Neural Plast. 2017:6871089.
- Lopez-Figueroa MO, Itoi K, Watson SJ (1998) "Regulation of nitric oxide synthase messenger RNA expression in the rat hippocampus by glucocorticoids." Neuroscience 87:439-446.
- Lorenzetti V et al. (2009) "Structural brain abnormalities in major depressive disorder: a selective review of recent MRI studies." Journal of affective disorders 117:1-17.
- Lyko F & Brown R (2005) "DNA methyltransferase inhibitors and the development of epigenetic cancer therapies." J Natl Cancer Inst. 19;97(20):1498-506.
- Malberg JE & Duman RS (2003) "Cell proliferation in adult hippocampus is decreased by inescapable stress: reversal by fluoxetine treatment." Neuropsychopharmacology : official publication of the American College of Neuropsychopharmacology 28:1562-1571.

Mallei A, Ieraci A, Popoli M (2018) "Chronic social defeat stress differentially regulates the expression of BDNF transcripts and epigenetic modifying enzymes in susceptible and resilient mice." World J Biol Psychiatry 30:1-32.

Manji HK et al. (1999) "Modulation of CNS signal transduction pathways and gene expression by mood-stabilizing agents: therapeutic implications." The Journal of clinical psychiatry 60 Suppl 2:27-39; discussion 40-21, 113-116.

Mao X et al. (2011) "The tricyclic antidepressant amitriptyline inhibits D-cyclin transactivation and induces myeloma cell apoptosis by inhibiting histone deacetylases: in vitro and in silico evidence." Molecular pharmacology 79:672-680.

Marazziti D et al. (2010) "Cognitive impairment in major depression." Eur J Pharmacol. 10;626(1):83-6.

Marcucci G et al. (2005) "Bioavailability of azacitidine subcutaneous versus intravenous in patients with the myelodysplastic syndromes." J Clin Pharmacol. 45(5):597-602.

Maric NP & Svrakic DM (2012) "Why schizophrenia genetics needs epigenetics: a review." Psychiatria Danubina 24:2-18.

Martinowich K et al. (2003) "DNA methylation-related chromatin remodeling in activity-dependent BDNF gene regulation." Science 302(5646): 890-893.

MauSSION G et al. (2014) "Functional DNA methylation in a transcript specific 3'UTR region of TrkB associates with suicide." Epigenetics. 9(8):1061-70.

McCrory E, De Brito SA, Viding E (2012) "The link between child abuse and psychopathology: a review of neurobiological and genetic research." Journal of the Royal Society of Medicine 105:151-156.

McGowan PO & Kato T (2008) "Epigenetics in mood disorders." Environmental health and preventive medicine 13:16-24.

McGowan PO et al. (2009) "Epigenetic regulation of the glucocorticoid receptor in human brain associates with childhood abuse." Nature neuroscience 12:342-348.

Mehler MF (2008) "Epigenetics and the nervous system." Annals of neurology 64:602-617.

Melas PA et al. (2012) "Antidepressant treatment is associated with epigenetic alterations in the promoter of P11 in a genetic model of depression." The international journal of neuropsychopharmacology / official scientific journal of the Collegium Internationale Neuropsychopharmacologicum 15:669-679.

- Mendez P et al. (2012) "Direct alteration of a specific inhibitory circuit of the hippocampus by antidepressants." The Journal of neuroscience: the official journal of the Society for Neuroscience 32:16616-16628.
- Mersfelder EL & Parthun MR (2006) "The tale beyond the tail: histone core domain modifications and the regulation of chromatin structure." Nucleic acids research 34:2653-2662.
- Mifsud KR (2017) "Rapid down-regulation of glucocorticoid receptor gene expression. In the dentate gyrus after acute stress in vivo: role of DNA methylation and microRNA activity." Neuroendocrinology 104(2):157-169.
- Miller CA & Sweatt JD (2007) "Covalent modification of DNA regulates memory formation." Neuron 53:857-869.
- Minichiello L (2009) "TrkB signalling pathways in LTP and learning." Nat Rev Neurosci 10(12): 850-860.
- Mitchellmore C & Gede L (2014) "Brain derived neurotrophic factor: epigenetic regulation in psychiatric disorders." Brain Res. 24;1586:162-72.
- Momparler RL (2005) "Pharmacology of 5-Aza-2'-deoxycytidine (decitabine)." Semin Hematol. 42(3 Suppl 2):S9-16.
- Momparler RL, Rivard GE, Gyger M (1985) "Clinical trial on 5-aza-2'-deoxycytidine in patients with acute leukemia." Pharmacol Ther. 30(3):277-86.
- Monteggia LM et al. (2007) "Brain-derived neurotrophic factor conditional knockouts show gender differences in depression-related behaviors." Biological psychiatry 61:187-197.
- Mora F et al. (2012) "Stress, neurotransmitters, corticosterone and body-brain integration." Brain research 1476:71-85.
- Murgatroyd C et al. (2009) "Dynamic DNA methylation programs persistent adverse effects of early-life stress." Nature neuroscience 12:1559-1566.
- Nasca C et al. (2013) "L-acetylcarnitine causes rapid antidepressant effects through the epigenetic induction of mGlu2 receptors." Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 110:4804-4809.
- Nelson ED, Kavalali ET, Monteggia LM (2008) "Activity-dependent suppression of miniature neurotransmission through the regulation of DNA methylation." The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience 28:395-406.
- Nestler EJ et al. (2002) "Neurobiology of depression." Neuron 34:13-25.

- Nibuya M, Morinobu S, Duman RS (1995) "Regulation of BDNF and trkB mRNA in rat brain by chronic electroconvulsive seizure and antidepressant drug treatments." J Neurosci. 15(11):7539-47.
- Oakes CC (2007) "Developmental acquisition of genome-wide DNA methylation occurs prior to meiosis in male germ cells." Dev Biol. 15;307(2):368-79.
- Oberlander TF et al. (2008) "Prenatal exposure to maternal depression, neonatal methylation of human glucocorticoid receptor gene (NR3C1) and infant cortisol stress responses." Epigenetics: official journal of the DNA Methylation Society 3:97-106.
- Okano M et al. (1999) "DNA methyltransferases Dnmt3a and Dnmt3b are essential for de novo methylation and mammalian development." Cell 99:247-257.
- O'Neil MF & Moore NA (2003) "Animal models of depression: are there any?" Human psychopharmacology 18:239-254.
- O'Neil MJ, Witkin JM (2007) "AMPA receptor potentiators: application for depression and Parkinson's disease." Curr Drug Targets. 8(5):603-20. Review.
- Onishchenko N et al. (2008) "Long-lasting depression-like behavior and epigenetic changes of BDNF gene expression induced by perinatal exposure to methylmercury." Journal of neurochemistry 106:1378-1387.
- Ooi SK et al. (2007) "DNMT3L connects unmethylated lysine 4 of histone H3 to de novo methylation of DNA." Nature 448:714-717.
- Overmier JB & Seligman ME (1967) "Effects of inescapable shock upon subsequent escape and avoidance responding." Journal of comparative and physiological psychology 63:28-33.
- Pandey GN et al. (2008) "Brain-derived neurotrophic factor and tyrosine kinase B receptor signalling in post-mortem brain of teenage suicide victims." Int J Neuropsychopharmacol 11(8): 1047-1061.
- Parkhurst CN et al. (2013) "Microglia promote learning-dependent synapse formation through brain-derived neurotrophic factor." Cell 19;155(7):1596-609.
- Pereira VS et al. (2013) "Antidepressant- and anticomulsive-like effects of purinergic receptor blockade: Involvement of nitric oxide." European neuropsychopharmacology: the journal of the European College of Neuropsychopharmacology.
- Peyrot WJ et al. (2013) "Strong effects of environmental factors on prevalence and course of major depressive disorder are not moderated by 5-HTTLPR polymorphisms in a large Dutch sample." Journal of affective disorders 146:91-99.

- Pittenger C & Duman RS (2008) "Stress, depression, and neuroplasticity: a convergence of mechanisms." Neuropsychopharmacology: official publication of the American College of Neuropsychopharmacology 33:88-109.
- Pizarro JM et al. (2004) "Acute social defeat reduces neurotrophin expression in brain cortical and subcortical areas in mice." Brain Res. 29;1025(1-2):10-20.
- Post RM & Silberstein SD (1994) "Shared mechanisms in affective illness, epilepsy, and migraine." Neurology 44:S37-47.
- Post RJ & Warden MR (2018) "Depression: the search for separable behaviors and circuits." Curr Opin Neurobiol. 49:192-200.
- Poulter MO et al. (2008) "GABAA receptor promoter hypermethylation in suicide brain: implications for the involvement of epigenetic processes." Biological psychiatry 64:645-652.
- Pradhan S et al. (1999) "Recombinant human DNA (cytosine-5) methyltransferase. I. Expression, purification, and comparison of de novo and maintenance methylation." The Journal of biological chemistry 274:33002-33010.
- Price JL & Drevets WC (2010) "Neurocircuitry of mood disorders." Neuropsychopharmacology : official publication of the American College of Neuropsychopharmacology 35:192-216.
- Pryce CR et al. (2011) "Helplessness: a systematic translational review of theory and evidence for its relevance to understanding and treating depression." Pharmacology & therapeutics 132:242-267.
- Quirk GJ, Garcia R, Gonzalez-Lima F (2006) "Prefrontal mechanisms in extinction of conditioned fear." Biological psychiatry 60:337-343.
- Qureshi IA & Mehler MF (2010) "Epigenetic mechanisms underlying human epileptic disorders and the process of epileptogenesis." Neurobiology of disease 39:53-60.
- Rauch TA et al. (2009) "A human B cell methylome at 100-base pair resolution." Proc Natl Acad Sci USA 20; 106(3):671-8.
- Resstel LB & Correa FM (2006) "Involvement of the medial prefrontal cortex in central cardiovascular modulation in the rat." Autonomic neuroscience : basic & clinical 126-127:130-138.
- Resstel LB et al. (2006) "Involvement of medial prefrontal cortex neurons in behavioral and cardiovascular responses to contextual fear conditioning." Neuroscience 143:377-385.

- Richel DJ, Colly LP, Kluin-Nelemans JC, Willemze R (1991) "The antileukaemic activity of 5-Aza-2-deoxycytidine (Aza-dC) in patients with relapsed and resistant leukaemia." Br J Cancer 64(1):144-8.
- Richter SH et al. (2013) "Where have I been? Where should I go? Spatial working memory on a radial arm maze in a rat model of depression." PLoS One 22;8(4):e62458.
- Riggs AD (1975) "X inactivation, differentiation, and DNA methylation." Cytogenetics and cell genetics 14:9-25.
- Rivard GE et al. (1981) "Phase I study on 5-aza-2'-deoxycytidine in children with acute leukemia." Leuk Res; 5(6):453-62.
- Rocher C (2004) "Acute stress-induced changes in hippocampal/prefrontal circuits in rats: effects of antidepressants." Cerebral cortex 14:224-229.
- Rodrigues SM, LeDoux JE, Sapolsky RM (2009) "The influence of stress hormones on fear circuitry." Annual review of neuroscience 32:289-313.
- Rosenzweig-Lipson S et al. (2007) "Differentiating antidepressants of the future: efficacy and safety." Pharmacology & therapeutics 113:134-153.
- Roth TL, Lubin FD, Funk AJ, Sweatt JD (2009) "Lasting epigenetic influence of early-life adversity on the BDNF gene." Biol Psychiatry 1;65(9):760-9.
- Russo SJ & Charney DS (2013) "Next generation antidepressants." Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 110:4441-4442.
- Saarelainen T et al. (2003) "Activation of the TrkB neurotrophin receptor is induced by antidepressant drugs and is required for antidepressant-induced behavioral effects." The Journal of neuroscience: the official journal of the Society for Neuroscience 23:349-357.
- Sales AJ et al. (2011) "Antidepressant-like effect induced by systemic and intra-hippocampal administration of DNA methylation inhibitors." Br J Pharmacol 164:1711-1721.
- Sales AJ & Joca SR (2016) "Effects of DNA methylation inhibitors and conventional antidepressants on mice behaviour and brain DNA methylation levels." Acta Neuropsychiatr. 28(1):11-22.
- Sales AJ & Joca SRL (2018) "Antidepressant administration modulates stress-induced DNA methylation and DNA methyltransferase expression in rat prefrontal cortex and hippocampus." Behav Brain Res. 2;343:8-15.

- Sanacora G, Zarate CA, Krystal JH, Manji HK (2008) "Targeting the glutamatergic system to develop novel, improved therapeutics for mood disorders." Nature reviews Drug discovery. 7(5):426-37.
- Savitz J & Drevets WC. (2009) "Bipolar and major depressive disorder: neuroimaging the developmental-degenerative divide." Neurosci Biobehav Rev. 33(5):699-771.
- Schildkraut JJ (1965) "The catecholamine hypothesis of affective disorders: a review of supporting evidence." The American journal of psychiatry 122:509-522.
- Schildkraut JJ (1995) "The catecholamine hypothesis of affective disorders: a review of supporting evidence. 1965." The Journal of neuropsychiatry and clinical neurosciences 7:524-533; discussion 523-524.
- Schneeberger Y et al. (2016) "Pharmacokinetics of the experimental non-nucleosidic DNA methyltransferase inhibitor N-phthalyl-L-tryptophan (RG108) in rats." Basic Clin Pharmacol Toxicol. 118(5):327-32.
- Schule C et al. (2009) "Hypothalamic-pituitary-adrenocortical system dysregulation and new treatment strategies in depression." Expert review of neurotherapeutics 9:1005-1019.
- Schulz D, Mirrione MM, Henn FA (2010) "Cognitive aspects of congenital learned helplessness and its reversal by the monoamine oxidase (MAO)-B inhibitor deprenyl." Neurobiol Learn Mem. 93(2):291-301.
- Seligman ME & Beagley G (1975) "Learned helplessness in the rat." Journal of comparative and physiological psychology 88:534-541.
- Seligman ME & Maier SF (1967) "Failure to escape traumatic shock." Journal of experimental psychology 74:1-9.
- Serafini G (2012) "Neuroplasticity and major depression, the role of modern antidepressant drugs." World journal of psychiatry 2:49-57.
- Sharma RP, Gavin DP, Grayson DR (2010) "CpG methylation in neurons: message, memory, or mask?" Neuropsychopharmacology : official publication of the American College of Neuropsychopharmacology 35:2009-2020.
- Sheline YI, Gado MH, Kraemer HC (2003) "Untreated depression and hippocampal volume loss." The American journal of psychiatry 160:1516-1518.
- Shelly M et al. (2007) "LKB1/STRAD promotes axon initiation during neuronal polarization." Cell 129:565-577.
- Shelton RC (2007) "The molecular neurobiology of depression." The Psychiatric clinics of North America 30:1-11.

- Shelton RC, Osuntokun O, Heinloth AN, Corya SA (2010) "Therapeutic options for treatment-resistant depression." CNS Drugs. 24(2):131-61.
- Sherman AD, Sacquitne JL, Petty F (1982) "Specificity of the learned helplessness model of depression." Pharmacology, biochemistry, and behavior 16:449-454.
- Shirayama Y et al. (2002) "Brain-derived neurotrophic factor produces antidepressant effects in behavioral models of depression." J Neurosci. 15;22(8):3251-61.
- Shirayama Y et al. (2015) "Alterations in brain-derived neurotrophic factor (BDNF) and its precursor proBDNF in the brain regions of a learned helplessness rat model and the antidepressant effects of a TrkB agonist and antagonist." Eur Neuropsychopharmacol. 25(12):2449-58.
- Singh V, Sharma P, Capalash N (2013) "DNA methyltransferase- 1 inhibitors as epigenetic therapy for cancer." Curr Cancer Drug Targets 13(4):379-99.
- Skolnick P et al. (1996) "Adaptation of N-methyl-D-aspartate (NMDA) receptors following antidepressant treatment: implications for the pharmacotherapy of depression." Pharmacopsychiatry 29(1): 23-26.
- Skolnick P, Popik P, Trullas R (2009) "Glutamate-based antidepressants: 20 years on." Trends Pharmacol Sci 30(11): 563-569.
- Slack JM (2002) Conrad Hal Waddington: the last Renaissance biologist? Nature reviews Genetics 3:889-895.
- Smith MA, Makino S, Kvetnansky R, Post RM (1995) "Stress and glucocorticoids affect the expression of brain-derived neurotrophic factor and neurotrophin-3 mRNAs in the hippocampus." J Neurosci. 15(3 pt1):1768-77.
- Söderlund J & Lindskog M (2018) "Relevance of rodent models of depression in clinical practice: can we overcome the obstacles in translational neuropsychiatry?" Int J Neuropsychopharmacol. 1;21(7):668-676.
- Song L (2006) "Impairment of the spatial learning and memory induced by learned helplessness and chronic mild stress." Pharmacol Biochem Behav. 83:186-193.
- Sorm F, Piskala A, Cihák A, Veselý J (1964) "5-Azacytidine, a new, highly effective cancerostatic." Experientia 15;20(4):202-3.
- Sorm F, Veselý J (1968) "Effect of 5-aza-2'-deoxycytidine against leukemic and hemopoietic tissues in ARK mice." Neoplasma 15(4):339-43.

Stein R, Razin A, Cedar H (1982) "In vitro methylation of the hamster adenine phosphoribosyltransferase gene inhibits its expression in mouse L cells." Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 79:3418-3422.

Stockmeier CA et al. (1998) "Increase in serotonin-1A autoreceptors in the midbrain of suicide victims with major depression-postmortem evidence for decreased serotonin activity." J Neurosci 18(18): 7394-7401.

Strekalova T et al. (2004) "Stress-induced anhedonia in mice is associated with deficits in forced swimming and exploration." Neuropsychopharmacology : official publication of the American College of Neuropsychopharmacology 29:2007-2017.

Stresemann C & Lyko F (2008) "Modes of action of the DNA methyltransferase inhibitors azacytidine and decitabine." Int J Cancer 1;123(1):8-13.

Sullivan PF, Neale MC, Kendler KS (2000) "Genetic epidemiology of major depression: review and meta-analysis." The American journal of psychiatry 157:1552-1562.

Sweatt JD (2016) "Dynamic DNA methylation controls glutamate receptor trafficking and synaptic scaling." J Neurochem. 137(3):312-30.

Szyf M, Weaver I, Meaney M (2007) "Maternal care, the epigenome and phenotypic differences in behavior." Reproductive toxicology 24:9-19.

Tsankova N et al. (2007) "Epigenetic regulation in psychiatric disorders." Nature reviews Neuroscience 8:355-367.

Taliaz D et al. (2011) "Resilience to chronic stress is mediated by hippocampal brain-derived neurotrophic factor." J Neurosci. 23;31(12):4475-83.

Taliaz et al. (2013) "Altered brain-derived neurotrophic factor expression in the ventral tegmental area, but not in the hippocampus, is essential for antidepressant-like effects of electroconvulsive therapy." Biol Psychiatry. 15;74(4):305-12.

Tanti A & Belzung C (2013) "Neurogenesis along the septo-temporal axis of the hippocampus: are depression and the action of antidepressants region-specific?" Neuroscience 252: 234-252.

Thompson Ray M, Weickert CS, Wyatt E, Webster MJ (2011). "Decreased BDNF, trkB-TK+ and GAD67 mRNA expression in the hippocampus of individuals with schizophrenia and mood disorders." Journal of psychiatry & neuroscience: JPN 36:195-203.

Treadway MT et al. (2015) "Illness progression, recent stress, and morphometry of hippocampal subfields and medial prefrontal cortex in major depression." Biol Psychiatry 77(3):285-94.

- Tsankova NM et al. (2006) "Sustained hippocampal chromatin regulation in a mouse model of depression and antidepressant action." Nature neuroscience 9:519-525.
- Tsankova N, Renthal W, Kumar A, Nestler EJ (2007) "Epigenetic regulation in psychiatric disorders." Nat Rev Neurosci. 8(5):355-67.
- Uchida S et al. (2011) "Epigenetic status of Gdnf in the ventral striatum determines susceptibility and adaptation to daily stressful events." Neuron 69:359-372.
- Uchida S et al. (2018) "Epigenetic mechanisms of major depression: targeting neuronal plasticity." Psychiatry Clin Neurosci. 72(4):212-227.
- Urdinguio RG, Sanchez-Mut JV, Esteller M (2009) "Epigenetic mechanisms in neurological diseases: genes, syndromes, and therapies." Lancet neurology 8:1056-1072.
- Ventskovska O, Porkka-Heiskanen T, Karpova NN (2015) "Spontaneous sleep-wake cycle and sleep deprivation differently induce Bdnf1, Bdnf4 and Bdnf9a DNA methylation and transcripts levels in the basal forebrain and frontal cortex in rats." J Sleep Res. 24(2):124-30.
- Vialou V et al. (2013) "Epigenetic mechanisms of depression and antidepressant action." Annu Rev pharmacol Toxicol. 53:59-87.
- Vigo D, Thornicroft G, Atun R (2018). Estimating the true global burden of mental illness. The Lancet Psychiatry 3: 171–178.
- Vollmayr B & Henn FA (2001) "Learned helplessness in the rat: improvements in validity and reliability." Brain research protocols 8:1-7.
- Vollmayr B, Mahlstedt MM, Henn FA (2007) "Neurogenesis and depression: what animal models tell us about the link." European archives of psychiatry and clinical neuroscience 257:300-303.
- Weaver IC et al. (2004) "Epigenetic programming by maternal behavior." Nature neuroscience 7:847-854.
- Weber M (2007) "Distribution, silencing potential and evolutionary impact of promoter DNA methylation in the human genome." Nat Genet. 39(4):457-66.
- Whitehouse I et al. (2007) "Chromatin remodelling at promoters suppresses antisense transcription." Nature 450:1031-1035.
- Willner P (1984) "The validity of animal models of depression." Psychopharmacology (Berl) 83:1-16.

Willner P & Mitchell PJ (2002) "The validity of animal models of predisposition to depression." Behav Pharmacol 13:169-188.

Willner P (1990) "Animal models of depression: an overview." Pharmacology & therapeutics 45:425-455.

World Health Organization (WHO, 2017) Depression. website <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs369/en/>.

Xing B et al. (2014) "Effect of microinjecting of 5-aza-2-deoxycytidine into ventrolateral orbital cortex on depressive-like behavior in rats." Neurosci Lett. 27;574:11-4.

Xu P et al. (2016) "DNA methyltransferase inhibitors: na updated patente review (2012-2015)." Expert Opin Ther Pat. 26(9):1017-30.

Yan HC et al. (2010) "Behavioral animal models of depression." Neuroscience bulletin 26:327-337.

Yang Y et al. (2016) "Opposite monosynaptic scaling of BLP-vCA1 inputs governs hopefulness- and helplessness-modulated spatial learning and memory." Nat Commun. 7:11935.

Yang L et al. (2017) "RG108 induces the apoptosis of endometrial cancer Ishikawa cell lines by inhibiting the expression of DNMT3B and demethylation of HMLH1." Eur Rev Med Pharmacol Sci. 21(22):5056-5064.

Yoo CB & Jones PA (2006) "Epigenetic therapy of cancer: past, present and future." Nat Rev Drug Discov. 5(1):37-50. Erratum in: Nat Rev Drug Discov. 5(2):121. 2006.

Yoshida T et al. (2012) "Decreased serum levels of mature brain-derived neurotrophic factor (BDNF), but not its precursor proBDNF, in patients with depressive disorder." Plos One. 7(8):e42676.

Yoshii A & Constantine-Paton M (2010) "Postsynaptic BDNF-TrkB signaling in synapse maturation, plasticity, and disease." Dev Neurobiol 70(5): 304-322.

Yoshimura S et al. (2010) "Rostral anterior cingulate cortex activity mediates the relationship between the depressive symptoms and the medial prefrontal cortex activity." Journal of affective disorders 122:76-85.

Yu LY, Saarma M, Arumae U (2008) "Death receptors and caspases but not mitochondria are activated in the GDNF- or BDNF-deprived dopaminergic neurons." The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience 28:7467-7475.

Yuen EY, Wei J, Yan Z (2017) “Molecular and epigenetic mechanisms for the complex effects of stress on synaptic physiology and cognitive functions.” Int J Neuropsychopharmacol. 1;20(11):948-955.

Zafra F et al (1992) “Regulation of brain-derived neurotrophic factor and nerve growth factor mRNA in primary cultures of hippocampal neurons and astrocytes.” J Neurosci. 12(12):4793-9.

Zanos P & Gould TD (2018) “Mechanisms of ketamine action as an antidepressant.” Mol Psychiatry. 23(4):801-811.

Zarate CA et al. (2006) "A double-blind, placebo-controlled study of memantine in the treatment of major depression." Am J Psychiatry 163(1): 153-155.

Zhang JC et al. (2015) “Comparison of ketamine, 7,8-dihydroxyflavone, and ANA-12 antidepressant effects in the social defeat stress model of depression.” Psychopharmacology 232(23):4325-35.

Zimmermann N et al. (2012) “Antidepressants inhibit DNA methyltransferase 1 through reducing G9a levels.” The Biochemical journal 448:93-102.

Zuckerkandl E (1975) “The appearance of new structures and functions in proteins during evolution.” Journal of molecular evolution 7:1-57.