LEONARDO ALVES DOS SANTOS

**SUSCETIBILIDADE E RESILIÊNCIA AOS EFEITOS DA
SUBJUGAÇÃO SOCIAL PROLONGADA EM CAMUNDONGOS
MACHOS ADOLESCENTES: ESTUDO DO BDNF CEREBRAL**

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

São Paulo
2014

Leonardo Alves dos Santos

**Suscetibilidade e resiliência aos efeitos da subjugação social
prolongada em camundongos machos adolescentes: estudo do
BDNF cerebral**

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

Área de concentração: Farmacologia

Orientadora: Profa. Dra. Silvana Chiavegatto

Versão original

São Paulo
2014

DADOS DE CATALOGAÇÃO NA PUBLICAÇÃO (CIP)
Serviço de Biblioteca e Informação Biomédica do
Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo

reprodução não autorizada pelo autor

Santos, Leonardo Alves dos.

Suscetibilidade e resiliência aos efeitos da subjugação social prolongada em camundongos machos adolescentes: estudo do BDNF cerebral / Leonardo Alves dos Santos. -- São Paulo, 2014.

Orientador: Profa. Dra. Silvana Chiavegatto.

Dissertação (Mestrado) – Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas. Departamento de Farmacologia. Área de concentração: Farmacologia. Linha de pesquisa: Neurociência comportamento e molecular.

Versão do título para o inglês: Susceptibility and resilience to the effects of prolonged social defeat in adolescent male mice: a study of brain BDNF.

1. Subjugação social 2. Depressão 3. BDNF 4. Estresse crônico 5. Adolescência 6. Bullying I. Chiavegatto, Profa. Dra. Silvana II. Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas. Programa de Pós-Graduação em Farmacologia III. Título.

ICB/SBIB0190/2014

Candidato(a): Leonardo Alves dos Santos.

Título da Dissertação: Suscetibilidade e resiliência aos efeitos da subjugação social prolongada em camundongos machos adolescentes: estudo do BDNF cerebral.

Orientador(a): Profa. Dra. Silvana Chiavegatto.

A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa da **Dissertação de Mestrado**, em sessão pública realizada a/...../....., considerou

☐ **Aprovado(a)**

☐ **Reprovado(a)**

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Presidente: Assinatura:
Nome:
Instituição:

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

Cidade Universitária "Armando de Salles Oliveira"
Av. Prof. Lineu Prestes, 2415 – CEP. 05508-000 São Paulo, SP Brasil
Telefone : (55) (011) 3091.7733 – e-mail: cep@icb.usp.br

CERTIFICADO

Certificamos que o protocolo registrado sob nº **174** nas fls. **138** do livro **02** para uso de animais em experimentação, sob a responsabilidade do Prof(a) Dr(a)) **Silvana Chiavegatto**, Coordenador (a) da Linha de pesquisa *"Estudo de alterações na expressão do gene BDNF e de genes ligados a alterações epigenéticas em um modelo de estresse psicossocial em camundongos adolescentes"* do qual participam o(s) aluno(s), **Leonardo Alves dos Santos, Camila Narbom Reigado**, está de acordo com os Princípios Éticos de Experimentação Animal adotado pela Sociedade Brasileira de Ciência de Animais de Laboratório (SBCAL) e foi aprovado pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA) em **30.04.13, com validade de 4 anos**.

São Paulo, 02 de maio de 2013.

Prof. Dr. WOTHAN TAVARES DE LIMA
Coordenador-CEUA - ICB/USP

Prof. Dra. ANA PAULA LEPIQUE
Secretária- CEUA - ICB/USP

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE MEDICINA TROPICAL DE SÃO PAULO
COMISSÃO DE PESQUISA E ÉTICA
COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS EM PESQUISA
Av. Dr. Enéas de Carvalho Aguiar, 470
CEP 05403-000 - São Paulo - Brasil
Telefone: (55-11) 3061-8650/7193 e 3064-5132 FAX: (55-11) 3064-5132 e
3062-2174
e-mail: cpq-imt@usp.br

São Paulo, 04 de julho de 2013.

Ilmo. (a)

Dra. Silvana Chiavegatto

(aos cuidados de Leonardo Alves dos Santos)

Em reunião na presente data, a Comissão de Pesquisa e Ética e Comissão de Ética no Uso de Animais em Pesquisa, do Instituto de Medicina Tropical da Universidade de São Paulo, analisou e **aprovou**, no que diz respeito aos aspectos de natureza da ética em experimentação animal, o projeto de pesquisa classificado sob número **CPE-IMT/172** "Estudo de alterações na expressão do gene BDNF e de genes ligados a alterações epigenéticas em um modelo de estresse psicossocial em camundongos adolescentes", sob a sua responsabilidade.

Cabe ao pesquisador elaborar e apresentar à CEUA-IMT, o relatório final sobre a pesquisa, (Lei Procedimentos para o Uso Científico de Animais – Lei n 11.794, 8 de outubro de 2008).

Atenciosamente,

Dr. Expedito José de Albuquerque Luna

Presidente

Comissão de Pesquisa e Ética do IMT-USP

Dra. Luciana Regina Meireles Jaguaribe Ekman

Coordenadora da Comissão de Ética no Uso de Animais em Pesquisa do IMT-USP

AGRADECIMENTOS

À minha orientadora, Prof^a Silvana Chiavegatto, por me receber em seu laboratório, pelo tempo dedicado, atenção, apoio e orientação. Obrigado pelas oportunidades de aprendizado oferecidas, por compartilhar sua experiência, sabedoria e ensinamentos que serão úteis pela vida toda. A você, minha grande admiração.

Aos meus colegas de laboratório, e de alma, Letícia e Victor, pelo imenso carinho e amizade que construímos ao longo do meu período na pós-graduação. Nosso contato foi sempre enriquecedor e me fortaleceu sempre que precisei. Sem vocês, eu não teria chegado até aqui. Vocês tem minha profunda gratidão.

Aos meus colegas do Laboratório de Neurociências Comportamentais e Moleculares, Camila Ematne, Rafael, Camila Reigado, Anna, Melissa, José, Pedro, Juliana, Fernando e Fabi, pelos bons momentos no laboratório e aprendizado mútuo.

Aos meus colegas da pós-graduação pela troca de conhecimentos e discussões enriquecedoras, sempre criando pequenos momentos agradáveis na pós-graduação e que foram sempre importantes.

Às bioteristas Sandra, Talita e Andréa pela paciência e dedicação, sempre nos ensinando quando necessário.

Às secretárias do Departamento de Farmacologia do Instituto de Ciências Biomédicas (ICB): Mônica, Camila e Miriam.

À Rosana, pelo suporte estatístico.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) e ao Instituto Nacional da Psiquiatria do Desenvolvimento (INPD-CNPq), pelo apoio financeiro dado a este projeto.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pela bolsa de mestrado.

Aos meus amigos de longa data, que estiveram sempre presentes em todos os momentos e pelo companheirismo.

Aos meus pais Nilton e Cleide, e minha irmã Michelle, agradeço imensamente pelo carinho, suporte, amor e compreensão pela minha ausência ao longo deste percurso. Vocês foram meu pilar, sempre me incentivando e me dando forças. A vocês, meu eterno amor.

Por fim, agradeço a Deus e aos meus amigos invisíveis pela luz e proteção, a vocês, meu imenso carinho.

“You have to keep open and aware directly to the
urges that motivate you. Keep the channel open...
[There is] no satisfaction whatever at any time. There
is only a queer, divine satisfaction, a blessed unrest
that keeps us marching and makes us more alive than
the other.”

Martha Graham em Blessed Unrest

“I think anyone who gets the Nobel Prize has to be a
little bit embarrassed to be picked out when there
have been so many people who have contributed.”

Christopher A. Sims

RESUMO

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

Os transtornos depressivos, ou depressão, são a terceira maior causa de incapacidade e perda de anos de vida no mundo. Entretanto, o seu tratamento ainda é deficiente e não atende às necessidades clínicas atuais, evidenciando a urgência de novos estudos relacionados ao tema. O estresse se destaca como um dos principais fatores desencadeantes da depressão. Neste sentido, a adolescência se caracteriza como um período de grande estresse na vida humana, onde ocorrem muitas mudanças hormonais e no ambiente social do indivíduo. O estresse mais presente na adolescência é de natureza social, em especial o *bullying*, e é tido como um dos principais estressores que podem desencadear distúrbios psiquiátricos. Muitos modelos animais de depressão usam o estresse social prolongado como ferramenta para induzir comportamentos similares a aqueles encontrados em pacientes com depressão. Estudos recentes, envolvendo humanos e modelos animais de depressão, observaram que alterações relacionadas à neuroplasticidade participam da neurobiologia da depressão, sendo o fator neurotrófico derivado do cérebro (BDNF) um dos principais alvos moleculares envolvidos. Entretanto, pouco se sabe sobre o efeito do estresse social prolongado na adolescência. Dentro deste contexto, utilizamos o modelo animal de subjugação social prolongada, em camundongos C57BL/6 machos adolescentes, para avaliar os efeitos do estresse psicossocial prolongado sobre comportamentos emocionais, e sobre a expressão gênica e proteica de BDNF, e de suas diferentes isoformas, no córtex pré-frontal, hipocampo, e estriado dorsal. Nosso modelo foi capaz de induzir anedonia no teste de preferência por sacarose e esquiva social no teste de interação social em animais submetidos ao estresse psicossocial prolongado. A análise dos dados comportamentais nos permitiu identificar um subgrupo suscetível aos efeitos do estresse, o qual apresentou anedonia, e um subgrupo resistente a este efeito. A resiliência e a suscetibilidade, entretanto, ocorreram apenas para os efeitos anedônicos do estresse, pois ambos os grupos apresentaram comportamentos de esquiva social. Os animais subjugados apresentaram características de maior ansiedade apenas em uma das séries realizadas, avaliada no teste de labirinto em cruz elevado, comportamento que não se repetiu nas demais séries experimentais conduzidas. O mesmo ocorreu com o ganho de peso, apenas em uma série experimental os subjugados ganharam menos peso durante o período de estresse. Os níveis séricos de corticosterona após o estresse prolongado não diferiram entre os grupos. Adicionalmente, nenhum desses parâmetros se correlacionou com a suscetibilidade ao estresse. Nossas análises moleculares mostraram que os animais suscetíveis apresentaram uma redução na expressão do transcrito *Bdnf4* e dos níveis proteicos de BDNF total, bem como de sua isoforma truncada, somente no estriado dorsal, área ainda pouco relacionada à depressão. Curiosamente, nenhuma alteração significativa foi detectada no córtex pré-frontal e hipocampo, áreas comumente relacionadas à depressão. Em conclusão, nossos dados mostram que o estresse psicossocial prolongado é capaz de induzir alterações emocionais relacionadas a comportamentos do tipo depressivo e de esquiva social em camundongos C57BL/6 machos adolescentes, além de alterações específicas na expressão gênica e proteica do BDNF no estriado dorsal, sugerindo um papel para essa área na suscetibilidade aos efeitos anedônicos induzidos pelo estresse psicossocial prolongado.

Palavras-chave: Subjugação social. Depressão. BDNF. Estresse crônico. Adolescência. Bullying.

ABSTRACT

Santos LA. Susceptibility and resilience to the effects of prolonged social defeat in adolescent male mice: a study of BDNF in the brain. [Masters thesis (Pharmacology)]. São Paulo: Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo; 2014.

The depressive disorders, or depression, are the third major cause of disability and years of life lost in the world. However, the treatment for depression is still deficient and it doesn't cater to the clinical necessity, stressing the urgency for new studies related to this field. The stress stands out as one of the main precipitant factor of depression. Accordingly, adolescence is a stressful period in the human life, where many changes at the hormonal and social levels of an individual occur. The stress during adolescence which is more prevalent is of social nature, specially the bullying, is thought to be a major stressor that can lead to psychiatry disorders. Many animal models of depression use the prolonged social stress as a tool to induce behavior changes similar to those observed in depressed patients. New studies involving humans and animal models of depression showed alterations related to neuroplasticity issues participating on the neurobiology of depression, being the brain derived neurotrophic factor (BDNF) one of most important molecule involved. However, little is known about the effects of prolonged social stress during adolescence. In this context, we use an animal model of prolonged social defeat, in adolescent male C57BL/6 mice, to evaluate the effects of prolonged social stress on emotional behaviors, and on gene and protein expression of BDNF and its different isoforms in prefrontal cortex, hippocampus and dorsal striatum. Our model was able to induce anhedonia in the sucrose preference test and social avoidance in the social interaction test in defeated animals. Our behavioral data analyses allowed us to identify a subgroup that was susceptible to the effects of stress, which showed anhedonia, and another subgroup resilient to these effects. Defeated animals exhibited anxiety-like behaviors in one set of animals, but these changes in behavior didn't repeat along the other sets. Likewise, only one set showed decrease weight gain in the experiment. Moreover, these parameters weren't correlated with resilience and susceptibility to the stress. We couldn't detect a change in serum corticosterona levels in defeat mice. Our molecular analyses showed that the susceptible animals had a reduction in the transcript *Bdnf4* expression and in the protein levels of total BDNF and its truncated isoform in dorsal striatum, an area that is low correlated to depression. Curiously, no changes were seen in prefrontal cortex and hippocampus, brain areas usually related to depression. Concluding, our data show that prolonged psychological stress is capable of inducing emotional alterations in adolescent male C57BL/6 mice related to depressive behaviors and social avoidance, and related to specific changes in gene and protein expression of BDNF in dorsal striatum, suggesting an important role for this area in depression and molecular expression profiles possibly related to resilience and susceptibility to the effects of prolonged social defeat.

Keywords: Social defeat. Depression. BDNF. Chronic stress. Adolescence. Bullying.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 – Diferentes variantes de junção do <i>Bdnf</i> em roedores	24
Figura 2 – Camundongo C57BL/6 macho adolescente em pareamento com um camundongo agressor CD1 macho adulto	35
Figura 3 – Linha cronológica dos experimentos	36
Figura 4 – Foto representação do teste de labirinto em cruz elevado (visão superior)	38
Figura 5 – Foto representação do teste de interação social	39
Figura 6 – Efeitos do estresse por subjugação social durante 10 dias em camundongos machos adolescentes sobre o peso corpóreo nas três séries comportamentais	47
Figura 7 – Efeitos do estresse por subjugação social durante 10 dias em camundongos machos adolescentes sobre a concentração sérica de corticosterona no momento da eutanásia dos animais da série experimental 1	48
Figura 8 – Preferência por solução de sacarose a 1% em camundongos machos com 30 dias de idade (valor basal) em cada série experimental	49
Figura 9 – Efeitos do estresse por subjugação social durante 10 dias em camundongos machos adolescentes sobre o consumo total de fluidos e sobre a preferência por solução de sacarose a 1% em cada série experimental	50
Figura 10 – Efeitos do estresse por subjugação social durante 10 dias em camundongos machos adolescentes sobre a preferência por solução de sacarose a 1% nas três séries experimentais em conjunto	51
Figura 11 – Efeitos do estresse por subjugação social durante 10 dias em camundongos machos adolescentes sobre a preferência por solução de sacarose a 1% em cada série experimental. Os grupos experimentais apresentam-se subdivididos em resilientes e suscetíveis ao efeito anedônico (PPS)	53
Figura 12 – Efeitos do estresse por subjugação social durante 10 dias em camundongos machos adolescentes sobre comportamentos relacionados à esquiva social no teste de interação social	55
Figura 13 – Efeitos do estresse por subjugação social durante 10 dias em camundongos machos adolescentes sobre comportamentos relacionados à esquiva social nas séries experimentais 2 e 3 em conjunto. O grupo experimental se apresenta subdividido em resiliente e suscetível ao efeito anedônico (PPS)	56

Figura 14 – Efeitos do estresse por subjugação social durante 10 dias em camundongos machos adolescentes sobre comportamentos relacionados à ansiedade no teste labirinto em cruz elevado nas três séries experimentais	57
Figura 15 – Efeitos do estresse por subjugação social durante 10 dias em camundongos machos adolescentes sobre comportamentos relacionados à ansiedade no teste de labirinto em cruz elevado, após a separação do grupo experimental em resiliente e suscetível nas três séries experimentais	58
Figura 16 – Efeitos do estresse por subjugação social durante 10 dias em camundongos machos adolescentes sobre a expressão gênica relativa, por qPCR, dos diferentes transcritos de <i>Bdnf</i> no córtex pré-frontal, hipocampo e estriado dorsal dos animais da série experimental 3	62
Figura 17 – Efeitos do estresse por subjugação social durante 10 dias em camundongos machos adolescentes sobre a expressão proteica de BDNF no córtex pré-frontal, hipocampo e estriado dorsal por ensaio de <i>Western Blot</i> nos animais da série 1	64
Figura 18 – Padrão de imunomarcacão usando os anticorpos anti-BDNF (sc-546) e anti- β -actina (sc-47778) em SDS-PAGE no hipocampo	66

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Valores de PPS (%) dos camundongos do grupo controle das três séries experimentais em conjunto, referentes as 1º a 99º percentis	51
Tabela 2 – Número de camundongos adolescentes resilientes e suscetíveis após o estresse psicossocial prolongado em cada série experimental, conforme o valor estabelecido para PPS em 77,7% (5º percentil do grupo controle)	52
Tabela 3 – Sequência dos pares de iniciadores utilizados para qPCR e o tamanho do produto em pares de bases	59
Tabela 4 – Índice M dos genes normalizadores	60
Tabela 5 – Quantidade normalizada pelo grupo controle dos transcritos dos genes normalizadores	61
Tabela A1 – Dados estatísticos referentes à expressão dos diferentes transcritos normalizados pelo grupo controle	86

LISTAS DE ABREVIATURAS E SIGLAS

5-HT_{1b} – Receptor de serotonina subtipo 1b

5-HT_{2c} – Receptor de serotonina subtipo 2c

ACTH – Hormônio adrenocorticotrófico

BCA – Ácido bicinconínico

Bcl-2 – Linfoma de célula B-2

BDNF – Fator neurotrófico derivado do cérebro

Bdnf1 – Transcrito do Bdnf 1

Bdnf2A – Transcrito do Bdnf 2A

Bdnf2B – Transcrito do Bdnf 2B

Bdnf2C – Transcrito do Bdnf 2C

Bdnf3 – Transcrito do Bdnf 3

Bdnf4 – Transcrito do Bdnf 4

Bdnf5 – Transcrito do Bdnf 5

BDNFOS – Fita oposta do BDNF

CEUA – Comissão de ética no uso de animais

COBEA – Colégio Brasileiro de Experimentação Animal

Cq – Ciclo de quantificação

CRF – Hormônio liberador de corticotrofina

dATP – Desoxiadenosina trifosfato

dCTP – Desoxicitosina trifosfato

dGTP – Desoxiguanosina trifosfato

DNA – Ácido desoxirribonucleico

DNAC – DNA complementar

dTTP – Desoxitimidina trifosfato

EDTA – Ácido etilenodiamino tetra-acético

Eixo HPA – eixo hipotálamo-pituitária-adrenal

FMUSP – Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo

GAPDH – Gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase

gl – Graus de liberdade

GR – Receptor de glicocorticóide

HIV – Vírus da imunodeficiência humana

HPRT-1 – Hipoxantina fosforibosil-transferase 1

HRP – Horseradish peroxidase

IBGE – Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística

ICB – Instituto de Ciências Biomédicas

IMT – Instituto de Medicina Tropical

IS – Interação Social

KCl – Cloreto de potássio

LCE – Labirinto em cruz elevado

LTD – Depressão de longa duração

LTP – Potenciação de longa duração

mBDNF – BDNF maduro

mRNA – RNA mensageiro

NAc – Núcleo *accumbens*

NaCl – Cloreto de Sódio

NF – Nado Forçado

NGF – Fator de crescimento nervoso

NT-3 – Neurotrofina 3

NT-4 – Neurotrofina 4

proBDNF – Forma precursora do BDNF

p75^{ntf} – Receptor de neurotrofina p75

PCR – Reação em cadeia de polimerase

Ppia – Ciclofilina

PPS – Preferência por sacarose

PVN – Núcleo Paraventricular do Hipotálamo

qPCR – Reação em cadeia de polimerase em tempo real

RNA – Ácido ribonucleico

SDS – Docecil sulfato de sódio

trBDNF – BDNF truncado

TD – Transtornos Depressivos

TrKB – receptor tropomiosina quinase B

Tris – Trisaminometano

Tris-HCl – (hidroximetil) aminometano-cloridrato

TTBS – Tampão Salina Tris com Tween

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	18
1.1 Neurobiologia da Depressão	19
1.1.1 <i>Teoria Monoaminérgica</i>	19
1.1.2 <i>Estresse e Desregulação do Eixo Hipotálamo-Pituitária-Adrenal (HPA)</i>	20
1.1.3 <i>Estresse e Neuroplasticidade</i>	21
1.2 Fator neurotrófico derivado do cérebro (BDNF)	22
1.3 Estresse e BDNF	26
1.4 Estresse na adolescência	27
1.5 Modelos animais de depressão	29
1.6 Resiliência e Suscetibilidade ao Estresse	29
2 OBJETIVOS	32
3 MATERIAIS E MÉTODOS	33
3.1 Animais	33
3.2 Seleção dos Camundongos Agressores	33
3.3 Modelo Animal de Estresse Psicossocial Prolongado – Subjugação Social	34
3.4 Delineamento Experimental	35
3.5 Determinação do ganho de peso corporal	36
3.6 Avaliação de comportamento emocionais	36
3.6.1 <i>Labirinto em Cruz Elevado (LCE)</i>	37
3.6.2 <i>Teste de Interação Social (IS)</i>	38
3.6.3 <i>Teste de Preferência por Sacarose (PPS)</i>	39
3.7 Sacrifício dos animais	40
3.8 Determinação da Concentração Sérica de Corticosterona	40
3.9 Quantificação da expressão gênica	41
3.9.1 <i>Extração do RNA total</i>	41

3.9.2 Síntese do DNA complementar (DNAC)	42
3.9.3 Procedimento para a confecção de oligonucleotídeos iniciadores (primers)..	42
3.9.4 Reação em cadeia de polimerases (PCR) em Tempo Real	43
3.10 Quantificação da expressão proteica de BDNF	44
3.10.1 Anticorpos	44
3.10.2 Ensaio de Western Blot	44
3.11 Análise Estatística	46
4 RESULTADOS	47
4.1 Ganho de peso dos animais após o período de estresse psicossocial diário	47
4.2 Concentração sérica de corticosterona após o período de estresse psicossocial diário	48
4.3 Comportamento de anedonia no teste de PPS 1%	49
4.4 Comportamentos relacionados à esquia social no teste de interação social	54
4.5 Comportamentos relacionados à ansiedade no teste do labirinto em cruz elevado	57
4.6 Quantificação da expressão gênica de <i>Bdnf</i> total e suas variantes de junção por PCR em tempo real	59
4.6.1 Pares de iniciadores utilizados para a amplificação dos genes	59
4.6.2 Escolha dos genes normalizadores	60
4.6.3 Análise da quantificação da expressão relativa dos diferentes transcritos de <i>Bdnf</i> em diferentes áreas cerebrais dos camundongos machos adolescentes após a subjugação social prolongada	61
4.7 Análise da quantificação proteica das diferentes isoformas de BDNF em diferentes áreas cerebrais dos camundongos machos adolescentes após subjugação social prolongada por ensaio de Western Blot	64
5 DISCUSSÃO	67
6 CONCLUSÃO	75
REFERÊNCIAS	76
APÊNDICE – Dados estatísticos referentes à expressão dos transcritos de BDNF	88

1 INTRODUÇÃO

A Organização Mundial de Saúde em seu relatório mais recente, *Global Burden of Diseases* (Murray et al., 2012), classificou as doenças mentais e do comportamento como a terceira maior causa de incapacidade e perda de anos de vida no mundo, e a segunda maior em pessoas com idade entre 10-34 anos, sendo os transtornos depressivos (TD), ou depressão, as doenças mais prevalentes entre os transtornos psiquiátricos. Pacientes com TD também são mais suscetíveis a desenvolver outras doenças, como por exemplo, diabetes do tipo 2, doença arterial coronariana e infecção por HIV, além de que os TD podem dificultar o diagnóstico de doenças, como o transtorno bipolar e a síndrome da fadiga crônica (Clericci et al., 1997; Evans et al., 2005; Hemmingway et al., 1999; Knol et al., 2006). A depressão pode ser considerada uma síndrome, visto que pacientes com depressão podem apresentar diversos sintomas, como vegetativos, como fadiga e distúrbios do sono e alimentares, bem como distúrbios psicológicos, como anedonia, humor deprimido e ideação suicida (Moreno et al., 2011). O seu diagnóstico é exclusivamente subjetivo e depende da observação de um número mínimo de sintomas no paciente, descrita pelo próprio paciente ou por terceiros, sendo que ainda há a carência de diagnósticos baseados em marcadores biológicos ou moleculares (Krishnan, Nestler, 2008).

Estima-se que uma em cada seis pessoas venham a ter ao menos um episódio depressivo ao longo da vida (Kessler et al., 1994, 2003). Entretanto, um estudo prospectivo longitudinal de Moffitt e colaboradores (2007), acompanhando uma população da Nova Zelândia por 32 anos, observou uma incidência muito maior, onde mais de 44% dos indivíduos apresentaram pelo menos um episódio de depressão durante a vida. A farmacoterapia no tratamento da depressão é de grande importância, entretanto, o efeito dos antidepressivos não é imediato, há uma latência para o paciente ter uma resposta eficaz e, mesmo assim, nem todos os pacientes respondem ao tratamento, o que prejudica a adesão ao mesmo. Uma meta-análise realizada por Papakostas e Fava (2009) reuniu diversos estudos envolvendo a eficácia de antidepressivos e o efeito placebo ao longo dos anos. Esta análise sugeriu que a eficácia dos antidepressivos permaneceu a mesma desde a década de 80 (em torno de 50-55%), mesmo com os avanços no desenvolvimento de novos fármacos, e que o efeito placebo no tratamento da depressão manteve-se

consideravelmente alto (30-40%). Neste contexto, fármacos mais eficazes e com efeito mais rápido constituem uma necessidade real. Para tanto, o entendimento da neurobiologia da depressão é de extrema importância e muitos modelos animais de depressão têm sido utilizados para abordar estas questões.

1.1 Neurobiologia da Depressão

1.1.1 Teoria Monoaminérgica

A primeira grande teoria proposta para explicar a fisiopatologia da depressão foi a teoria monoaminérgica, formulada inicialmente por Schildkraut em 1965 e por Persson e Ross em 1967. Essa teoria se baseou na observação dos efeitos antidepressivos da iproniazida e da imipramina. Inicialmente, elas foram testadas no tratamento da tuberculose e esquizofrenia, respectivamente, porém descobriu-se uma ação antidepressiva desses medicamentos. Como ambas atuam principalmente aumentando a disponibilidade de noradrenalina e serotonina, inferiu-se que o efeito antidepressivo seria devido ao aumento da transmissão serotoninérgica e noradrenérgica no sistema nervoso central (SNC), enquanto que a depressão seria uma deficiência desses sistemas. Esta é uma visão simplista e de mecanismo único para a depressão e para o efeito de drogas antidepressivas.

Com o decorrer dos anos, outros compostos com propriedades farmacológicas semelhantes foram sintetizados, porém a eficiência dos fármacos usados no tratamento da depressão não progrediu, apesar da melhora dos efeitos adversos e tolerância aos mesmos (Willner et al., 2012). Adicionalmente, as evidências científicas da existência de um prejuízo no sistema monoaminérgico no SNC de pacientes com depressão não são claras o suficiente, e muitas vezes contraditórias (Willner et al., 2012). A comunidade científica, então, passou a investir mais esforços na busca de causas que pudessem levar à depressão, bem como no estudo do funcionamento do cérebro de um indivíduo com depressão.

1.1.2 Estresse e Desregulação do Eixo Hipotálamo-Pituitária-Adrenal (HPA)

Atualmente, considera-se que um dos principais desencadeantes da depressão seja o estresse (ambiental ou fisiológico). Acúmulo de eventos adversos, como experiências de luto, desemprego, pobreza e desarmonia familiar são potenciais fatores para o desenvolvimento de um episódio depressivo (Brown e Harris, 1978; Farmer e McGuffin, 2003; McEwen, 1988; Willner et al., 2012). Estas evidências formam a base da maioria dos modelos animais de depressão, que a partir do uso de estressores prolongados, induzem comportamentos do tipo depressivo em animais (Krishnan, Nestler, 2011).

A maior resposta fisiológica ao estresse é a regulação neuroendócrina mediada pela ativação do eixo hipotálamo-pituitária-adrenal (eixo HPA). Imediatamente após um estresse agudo, neurônios localizados no núcleo paraventricular do hipotálamo (PVN) liberam o hormônio liberador de corticotrofina (CRF) no sistema porta da glândula pituitária, estimulando a produção do hormônio adrenocorticotrófico (ACTH) pelas células da adeno-hipófise. O ACTH entra na corrente sanguínea e, no córtex das adrenais, estimula a liberação de glicorticóides para a corrente sanguínea (cortisol em humanos e corticosterona em roedores). O cortisol liberado age no próprio eixo HPA, exercendo um controle de retroalimentação negativa, limitando e controlando a resposta ao estresse (Chrousos, Gold, 1992).

Outras áreas do cérebro também participam na modulação da ativação do eixo HPA. Neurônios da amígdala basolateral, por exemplo, exercem um controle excitatório sobre o eixo HPA (Duvarci, Pare, 2007), enquanto que neurônios localizados no hipocampo e córtex pré-frontal inibem o eixo HPA, através de projeções descendentes glutamatérgicas em neurônios gabaérgicos no hipotálamo (Herman, Cullinan, 1997; Jacobson, Sapolsky, 1991). Estas áreas estão muito relacionadas à recepção e elaboração de estímulos emocionais, e a ativação das mesmas, durante uma resposta emocional, promove a modulação da resposta neuroendócrina do eixo HPA (Emmert, Herman, 1999).

O eixo HPA está disfuncional em pacientes com depressão. Muitos estudos reportam aumento da atividade do eixo, como por exemplo, níveis elevados de cortisol plasmático e salivar, distúrbios na supressão do cortisol por dexametasona,

e resposta atenuada da adrenal ao ACTH (Dinan, 1998; Krishnan et al., 1991; O'Brien et al., 1996; Rubin et al., 1996; Scott, Holsboer, 2000). Em modelos animais de estresse crônico, também são observadas várias alterações no eixo HPA, como uma diminuição da resposta à dexametasona (Mizoguchi et al., 2003), diminuição dos receptores de glicocorticóide (GR) no hipocampo e amígdala (Sapolsky et al., 1984), bem como um aumento na concentração plasmática de corticosterona (Kant et al., 1983; Pitman et al., 1990).

1.1.3 Estresse e Neuroplasticidade

O hipocampo se destaca como uma área muito sensível ao estresse. Sapolsky e colaboradores (1985) injetaram corticosterona por via subcutânea em ratos, durante 12 semanas, e observaram uma diminuição de neurônios na região CA3 no hipocampo e no número de GRs por célula. Posteriormente, Woolley e colaboradores (1990) observaram atrofia dos dendritos apicais dos neurônios piramidais da região CA3 em ratos, após a injeção contínua de corticosterona por 21 dias. Outros estudos mostraram que o mesmo ocorria em modelos animais de estresse crônico (Watanabe et al., 1992) e, posteriormente, Sheline e colaboradores (1996) observaram pela primeira vez uma diminuição do volume hipocampal de pacientes com depressão. A neurogênese hipocampal também é fortemente suprimida pelo estresse prolongado. Esses efeitos podem ser vistos tanto em primatas (Gould et al., 1998), como também em roedores (Mineur et al., 2007), e podem ser induzidos por estressores físicos (Malberg, Duman, 2003; Watanabe et al., 1992), por estresse psicossocial (Czeh et al., 2002; Gould et al., 1998), e pela administração crônica de corticosterona em roedores (Gourley et al., 2008; Murray et al., 2008). Recentemente, também foi observado uma supressão da neurogênese em tecidos *post-mortem* de pacientes idosos com depressão, usando dois marcadores indiretos de neurogênese (proteína de manutenção de microssomo 2 e histona 3 fosforilada) (Lucassen et al., 2010).

Esses estudos evidenciam o efeito neurotóxico do estresse crônico, especialmente sobre o hipocampo. Outras áreas do encéfalo, todavia, também sofrem alterações estruturais/ morfológicas induzidas pelo estresse. No córtex pré-frontal, por exemplo, já foi observado uma atrofia de neurônios piramidais (Liu,

Aghajanian, 2008) e encurtamento dos dendritos (McEwen, 2010; Shansky et al., 2009). Na amígdala, curiosamente, foi observado hipertrofia dendrítica após estresse crônico em ratos (Vyas et al., 2003) e em pacientes com depressão durante o primeiro episódio depressivo (Frodl et al., 2003). Essas alterações mostram um desbalanço na resposta ao estresse prolongado, favorecendo a ativação e desfavorecendo a inibição do eixo HPA.

Esses achados levaram à hipótese de que mecanismos de plasticidade neuronal estariam envolvidos no desenvolvimento dos transtornos psiquiátricos. Uma das proteínas que participam dos processos de plasticidade neuronal é o fator neurotrófico derivado do cérebro ou BDNF (do inglês *brain derived neurotrophic factor*). Em 1997, Siuciak e colaboradores injetaram BDNF recombinante humano, por 7, dias consecutivos no mesencéfalo de ratos e observaram efeitos do tipo antidepressivos nos testes de nado forçado e desamparo aprendido. Estudos posteriores em ratos mostraram que o estresse agudo e crônico por imobilização forçada foram capazes de reduzir a expressão de RNA mensageiro (RNAm) de *Bdnf* no hipocampo (Smith et al., 1995), e que a administração crônica de antidepressivos aumentou os níveis deste transcrito (Nibuya et al., 1995). Em 2003, Saarelainen e colaboradores demonstraram em modelo animal, pela primeira vez, que o efeito dos antidepressivos é dependente da ação do BDNF em seu receptor tropomiosina quinase (TrKB). A partir destes achados, cunhou-se o termo “Teoria Neurotrófica da Depressão”.

1.2 Fator neurotrófico derivado do cérebro (BDNF)

O BDNF é uma das quatro neurotrofinas presentes em vertebrados, juntamente com o fator de crescimento nervoso (NGF), neurofina 3 (NT-3) e neurofina 4 (NT-4), e foi purificado pela primeira vez por Barde e colaboradores em 1982 em homogenato de cérebro de porco. O gene que codifica o BDNF é altamente conservado em humanos e roedores (Hallböök et al., 1991). O controle da expressão gênica e proteica do BDNF se constitui em um sistema muito complexo. Em humanos, o gene *BDNF* contém oito éxons diferentes, dos quais somente o último éxon (situado na região 3') é codificante de proteína. Cada um dos demais sete éxons não codificantes é transcrito junto ao último éxon 3' (que também pode ser

transcrito sozinho em duas isoformas diferentes). No entanto, todos os transcritos são traduzidos em uma mesma proteína (preproBDNF) (Liu et al., 2005). Adicionalmente, na sequência complementar à região do gene *BDNF* há um gene de onze éxons, chamado de *BDNFOS*, que sofre *splicing* alternativo e codifica transcritos anti-senso complementares aos transcritos do *BDNF* e foi encontrado apenas em humanos e chimpanzés (Liu et al., 2005 e 2006).

Já a estrutura do gene *Bdnf* murino foi descrito posteriormente em duas pesquisas independentes e difere em alguns aspectos do gene *BDNF* humano (Aid et al., 2007; Liu et al., 2006). Em ratos e em camundongos existem oito éxons identificados até o momento (Liu et al., 2006). Similarmente ao gene humano, os sete primeiro éxons (I-VII) não são codificantes e somente o último éxon (éxon VIII) é codificante da proteína BDNF. Cada um dos seis éxons (I-VI) é transcrito junto com o éxon VIII (Liu et al., 2006). Além disso, o éxon II tem três variantes de junção (IIA, IIB e IIC) e o éxon VI também pode ser transcrito com os éxons VII e VIII, ou apenas com o éxon VIII, totalizando nove transcritos diferentes (**Fig. 1**). Todos eles são processados e traduzidos na proteína preproBDNF. Adicionalmente, o éxon VIII (éxon codificante) tem dois sítios de poliadenilação, podendo ser transcrito em uma forma contendo a região 3' não codificante (3'UTR) mais curta e uma mais longa (Lau et al., 2010), aumentando o número teórico para mais de 18 transcritos diferentes.

A variante mais longa estaria associada ao transporte do RNAm para os dendritos, uma vez que cadeias 3'UTR maiores protegeriam o RNAm da ação de RNAses durante o trajeto, e aumentariam os sítios disponíveis de interação, oferecendo um mecanismo que amplia a complexidade de regulação e processamento dos transcritos (Lau et al., 2010). Apesar de todas as variantes de junção serem traduzidas em uma mesma proteína, elas podem possuir níveis de expressão tecido-específico e também uma localização subcelular específica. Dentre as áreas cerebrais, foi descrito uma maior expressão dos diferentes transcritos no hipocampo, sendo que no estriado apenas os transcritos *Bdnf4* e *Bdnf5* apresentam quantidades consideráveis (Aid et al., 2007; Liu et al., 2006). Os transcritos *Bdnf1*, *Bdnf2* (A, B e C) e *Bdnf3* são estritamente cerebrais, e os transcritos *Bdnf4* e *Bdnf5* também foram encontrados periféricamente em vários tecidos, como pulmões, coração, rins, fígado e baço (Liu et al., 2006).

Quanto à localização subcelular dos diferentes transcritos, Chiaruttini e colaboradores (2009), usando cultura de células hipocampus de ratos, descreveram a presença dos transcritos *Bdnf1* e *Bdnf4*, em sua maioria, no corpo celular e na parte proximal dos dendritos. Já os transcritos *Bdnf2B*, *Bdnf2C* e *Bdnf5* foram encontrados na parte distal dos dendritos, sugerindo um tipo de código espacial usado pelos neurônios para seletivamente modular compartimentos diferentes dos dendritos. A proteína BDNF, traduzida a partir de cada um dos transcritos, apresentou este mesmo padrão de localização subcelular, apesar de apresentar uma localização mais distal (Baj et al., 2011).

A expressão de RNAm de *Bdnf* no cérebro em ratos varia de acordo com o estágio de desenvolvimento. Ela é baixa durante o período pré-natal e atinge o seu pico máximo entre os dias 10 -14 após o nascimento, havendo um declínio a partir da terceira semana e uma estabilização nos níveis de expressão na vida adulta (Timmusk et al., 1994).

É importante citar que o trabalho de Aid e colaboradores (2007) encontrou um éxon adicional (éxon V), uma variante mais longa do transcrito do éxon codificante e não conseguiu identificar a variante de junção VIB descrita por Liu e colaboradores (2006). Em nosso trabalho, adotaremos a nomenclatura das variantes de junção de acordo com o trabalho de Liu e colaboradores (2006).

Figura 1 – Diferentes variantes de junção do *Bdnf* em roedores

Representação dos transcritos de *Bdnf* de roedores de acordo com o trabalho de Liu et al., 2006. Os éxons I-VII são éxons não codificantes, que são transcritos juntos com o éxon codificante VIII. O éxon II possui três variantes de junção (A, B e C) e o VIII possui dois sítios de poliadenilação diferentes.

Posteriormente à transcrição, o *Bdnf* é traduzido inicialmente em preproBDNF no retículo endoplasmático. O preproBDNF é clivado em um peptídeo sinal, gerando o proBDNF (32 kDa). O proBDNF, ou forma precursora do BDNF, pode ser clivado em duas formas distintas: BDNF maduro (mBDNF, 13,7kDa) ou BDNF truncado (trBDNF, 28 kDa). A clivagem em mBDNF ocorre no meio intracelular pela ação da enzima furina no complexo de Golgi ou dentro de vesículas secretoras (Mowla et al., 2001) e no meio extracelular pela ação da plasmina e da metaloproteinase-7 (Lee et al., 2001). A clivagem em trBDNF se dá pela ação da protease denominada *membrane-bound transcription factor site-1 protease* (Seidah et al., 1999), sendo sua função desconhecida até o momento.

O mBDNF age principalmente no receptor TrKB (Soppet et al., 1991) e em menor escala no receptor p75^{NTR}. Sua ação no SNC é ampla e de extrema importância no neurodesenvolvimento, neuroplasticidade, aprendizado e memória (Nieto et al., 2013). O mBDNF atua no desenvolvimento da potenciação de longo prazo (LTP) (Xu et al., 2000) e de memórias de longo prazo dependentes de LTP (Alonso et al., 2002). Estudos mostraram sua ação neuroprotetora após a indução de isquemia em ratos (Larsson et al., 1999), estresse oxidativo (Mattson et al., 1995) e contra dano hipoglicêmico (Nakao et al., 1995) em cultura de células de hipocampo e estriado. Outra pesquisa, usando cultura de células de hipocampo, observou que o BDNF foi capaz de impedir a apoptose induzida por glutamato, e aumentou a expressão da proteína anti-apoptótica Bcl-2 (Almeida et al., 2005). O BDNF também está ligado à neurogênese, demonstrado através da sua infusão intracerebroventricular em ratos adultos e aumento no número de novos neurônios em áreas adjacentes aos ventrículos, como estriado, septo e tálamo (Pencea et al., 2001). Adicionalmente, o BDNF também participa na arborização dendrítica e formação de sinapses (McAllister et al., 1995, 1996; Schinder, Poo, 2000), o que o torna extremamente importante no desenvolvimento cerebral. Esses efeitos são associados à ação da isoforma mBDNF em seu receptor TrKB.

Por outro lado, a sua forma precursora pode exercer efeitos opostos. Assim como todas pro-neurotrofinas, o proBDNF tem maior afinidade pelo receptor p75^{NTR}. Ele induz apoptose em neurônios pela ativação do complexo p75^{NTR} e sortilina (Teng et al., 2005), e sua infusão no hipocampo de camundongos facilita a depressão de longa duração (LTD). A observação de efeitos antagônicos entre a forma madura e a precursora do BDNF levou à hipótese “Ying e Yang” do BDNF (Woo et al., 2005).

1.3 Estresse e BDNF

O estresse crônico e o tratamento com antidepressivos exercem efeitos opostos na expressão de fatores neurotróficos em áreas do sistema límbico envolvidas na regulação do humor e da cognição (Duman, Monteggia, 2006). Dentre as estruturas do sistema límbico, o hipocampo é uma das mais estudadas na fisiopatologia da depressão. Em modelos animais de estresse, diversos estudos mostraram a diminuição de RNAm do *Bdnf* no hipocampo de roedores adultos, como por exemplo, em estresse por imobilização agudo (Vaidya et al., 1997) e crônico (Smith et al., 1995), isolamento social (Barrientos et al., 2003), subjugação social (Pizarro et al., 2004), separação materna (Roceri et al., 2002), entre outros (Duman, Monteggia, 2006). Também foi observado uma redução proteica de BDNF em tecidos *post-mortem* (Dwivedi et al., 2003; Karege et al., 2005) e nos níveis séricos de BDNF em pacientes com depressão (Karege et al., 2002). Um estudo conduzido por Tsankova e colaboradores (2006) observou uma redução dos transcritos de *Bdnf* 3 e 4 no hipocampo em camundongos C57BL/6 adultos, após 10 dias de subjugação social, mostrando que os diferentes transcritos do *Bdnf* podem ser regulados diferentemente a um determinado estímulo.

O tratamento crônico com diversas classes de antidepressivos tem efeitos opostos aos efeitos do estresse crônico sobre o BDNF tanto em modelos animais (Dias et al., 2003, Duman, Monteggia, 2006, Tsankova et al., 2006), quanto em humanos (Shimizu et al., 2003), como por exemplo reverter a atrofia dendrítica (Duman, Monteggia, 2006) e aumentar a neurogênese no hipocampo de ratos adultos (Malberg et al., 2000). Curiosamente, pesquisas demonstraram que o exercício físico voluntário por 28 dias, em ratos e em camundongos adultos, também foi capaz de aumentar os níveis proteicos de BDNF total (Adlard et al., 2004) e da

sua isoforma madura (Sartori et al., 2011) no hipocampo, concomitantemente aos efeitos antidepressivos avaliados nos testes de nado forçado e suspensão pela cauda (Sartori et al., 2011), sendo que o exercício físico tem sabidamente um efeito antidepressivo (Trivedi et al., 2006). O córtex pré-frontal também tem a expressão proteica de BDNF reduzida após estresse crônico em ratos adultos (Li et al., 2010) e até mesmo em pacientes suicidas (Dwivedi et al., 2003).

Devemos observar também que a resposta do BDNF ao estresse pode variar de acordo com o tipo do estresse sofrido em uma mesma região (Pardon et al., 2005; Smith et al., 1995), e que o estresse crônico pode levar ao aumento do BDNF em outras áreas cerebrais, como amígdala medial e área tegmentar ventral (VTA) (Fanous et al., 2010), e núcleo *accumbens* (NAc) (Krishnan et al., 2007), ou simplesmente não ter efeito sobre a expressão do BDNF (Kuroda et al., 1998). Sendo assim novos estudos ainda são necessários para poder correlacionar corretamente a ação do estresse na expressão de BDNF e as consequências da diminuição ou aumento desta expressão nos fenótipos comportamentais.

1.4 Estresse na adolescência

A adolescência é um período de grande relevância, pois é marcada por mudanças no comportamento social, cognitivo e emocional, além das mudanças na fisiologia do indivíduo. Essas mudanças acompanham o desenvolvimento de comportamentos necessários à sobrevivência, tornando o indivíduo independente da proteção ou do resguardo da família ou parentes. A maioria dos adolescentes passa pela transição à vida adulta de maneira “bem sucedida”. Entretanto, a adolescência é também caracterizada pelo aparecimento de transtornos psiquiátricos, tais como ansiedade, psicoses, transtornos alimentares, depressão e abuso de drogas (Paus et al., 2008). De uma forma geral, os estressores mais presentes na adolescência são de natureza social, sendo o *bullying* um dos mais comuns (Buwalda et al., 2011). De acordo com os últimos dados do IBGE (2012), cerca de 34,4% dos escolares brasileiros, na maioria com idade entre 13 e 15 anos e de ambos os sexos, já sofreram bullying, sendo que 7,2% dos estudantes afirmaram que sempre, ou quase sempre, se sentiram humilhados por provocações no ambiente escolar.

A transição para a vida adulta envolve comportamentos relacionados a questões de identidade, autoconsciência e flexibilidade cognitiva (Blakemore, 2008; Sebastian et al., 2008), os quais necessitam de mudanças neuroquímicas e estruturais em áreas do sistema límbico (Blakemore, 2008). De fato, áreas como o hipocampo, córtex pré-frontal e estriado ainda estão em processo de maturação durante a adolescência (Andersen et al., 2000, 2003; Giedd, 2004; Suzuki et al., 2005). O córtex pré-frontal também é vulnerável ao estresse (Garrett et al., 2009; Radley et al., 2008;), e uma das mais notáveis áreas cerebrais em processo de maturação durante a adolescência. Estudos de imagem também observaram que meninas entre 14 e 16 anos que sofreram abuso sexual durante a adolescência tiveram redução do volume do córtex pré-frontal, e não do hipocampo (Andersen et al., 2008). Trabalhos envolvendo o estresse social demonstram que a submissão social prejudica o desenvolvimento neuronal em ratos machos adolescentes, produzindo alterações nas respostas de ansiedade quando adultos, e alteração do funcionamento do sistema monoaminérgico em regiões límbicas responsivas ao estresse (Watt et al., 2009). A própria resposta neuroendócrina ao estresse é diferente no adolescente, como exemplificado em investigações utilizando ratos machos adolescentes após um estresse agudo onde, os níveis de corticosterona demoram 45 a 60 minutos a mais para retornarem aos níveis basais, quando comparados com ratos adultos (Romeo, McEwen, 2006).

Além disso, a exposição ao estresse crônico social, durante o período da adolescência em camundongos, pode acelerar o declínio no desempenho da memória espacial e prejudicar a plasticidade do hipocampo durante o envelhecimento (Sterlemann et al., 2010). Desta forma, algumas das grandes questões de relevância clínica e saúde pública a serem ainda respondidas são:

- o cérebro do adolescente é mais vulnerável às consequências negativas do estresse?
- o estresse ocorrido durante a adolescência tem um impacto maior no comportamento e na fisiologia do indivíduo do que durante a vida adulta?
- o “cérebro adolescente” sofre alterações moleculares diferentes do “cérebro adulto” durante o estresse?

1.5 Modelos animais de depressão

Uma das maneiras de se investigar as questões acima é se utilizar de ferramentas metodológicas como os modelos animais de depressão. Consideramos um bom modelo animal quando a etiologia, a expressão fenotípica e a resposta terapêutica são homólogas entre o caso clínico e a preparação experimental pré-clínica (Chiavegatto, 2011). Muito se questiona sobre a correta modelagem de uma doença psiquiátrica em animais. De fato, o diagnóstico da maioria dos transtornos mentais ainda é feito de maneira subjetiva, principalmente devido à falta de marcadores biomoleculares. Sintomas como ideação suicida, culpa e humor deprimido são impossíveis de serem verificados em animais. Entretanto, estudos utilizando modelos animais de estresse crônico mostraram alterações comportamentais semelhantes às observadas em pacientes deprimidos.

A anedonia (perda da capacidade de sentir prazer) é um dos sintomas principais no diagnóstico do transtorno depressivo maior. Em animais, ela pode ser mensurada através da observação do déficit de comportamentos hedônicos, como menor ingestão de solução de sacarose, interação social e comportamento sexual (Nestler, Hyman, 2010). Modelos de estresse crônico são capazes de induzir anedonia em roedores e esse efeito é reversível pela administração crônica de antidepressivos (Berton et al., 2006; Willner, 2005). O modelo de depressão usado neste trabalho foi o de subjugação social prolongada (ou derrota social, do inglês *social defeat*). Nele, o camundongo teste é colocado na gaiola de um camundongo adulto selecionado como agressor e, após sofrer episódios repetidos de confronto, ele exibe posturas de submissão. Este modelo induz alterações emocionais como anedonia, ansiedade e esquiva social (Berton et al., 2006; Iñiguez et al., 2014; Krishinan et al., 2007), e modela de maneira mais etológica aspectos relacionados ao abuso físico e a subjugação social observados em uma situação de *bullying*.

1.6 Resiliência e Suscetibilidade ao Estresse

Indivíduos mostram uma grande heterogeneidade em suas respostas ao estresse e adversidades. Muitos casos de depressão são atribuídos de maneira causal ao estresse crônico, porém o estresse, por si só, representa apenas um risco

moderado ao desenvolvimento da depressão, já que uma parte da população parece ser resistente ao mesmo (Charney, 2004; Kendler et al., 1999). Esses indivíduos “resilientes” (Hoge et al., 2007) exibem características como flexibilidade cognitiva (Yehuda et al., 2006) e otimismo (Charney, 2004). Contudo, os substratos neurais e moleculares que mediam a resistência e a suscetibilidade aos efeitos deletérios do estresse permanecem desconhecidos.

Animais submetidos ao estresse crônico também exibem uma grande variabilidade nas alterações emocionais induzidas pelo estresse. Essa variabilidade pode ser utilizada como ferramenta para se estudar a resiliência e a suscetibilidade aos efeitos do estresse. Strekalova e colaboradores (2004) foram o primeiro grupo a identificar um subgrupo de camundongos C57BL/6 machos adultos submetidos ao estresse crônico físico que não apresentava anedonia no teste de preferência por sacarose, apresentando valores iguais ao do grupo controle. Estes pesquisadores também observaram que a maioria dos animais anedônicos exibiam comportamentos submissos no teste de residente-intruso, realizado anteriormente ao protocolo de estresse crônico.

Em 2007, Krishnan e colaboradores usaram o modelo de subjugação social prolongado em camundongos C57BL/6 machos adultos, e também identificaram um subgrupo resiliente e um subgrupo suscetível aos efeitos do estresse crônico. Os camundongos suscetíveis, além de apresentarem anedonia no teste de preferência por sacarose, também tiveram menor tempo de interação no teste de interação social, ao contrário do subgrupo resiliente. Neste mesmo estudo, os camundongos suscetíveis apresentaram um aumento da proteína BDNF no NAc em relação aos grupos controle e resiliente, mostrando que adaptações moleculares específicas podem estar relacionadas à suscetibilidade.

Deve-se ressaltar, entretanto, que a resiliência não significa uma ausência de “vulnerabilidade”. De fato, animais resilientes parecem apresentar adaptações moleculares únicas, diferentes das observadas em animais suscetíveis (Krishnan et al., 2007; Wilkinson et al., 2009). Adicionalmente, a maioria desses estudos observaram variações comportamentais e moleculares frente ao estresse crônico em animais isogênicos, ou seja, que carregam a mesma carga genética, sugerindo que a resiliência e a suscetibilidade podem estar relacionadas a alterações epigenéticas.

O período da adolescência é crítico para o desenvolvimento dos indivíduos, e ainda assim, é o período menos estudado quando consideramos outras idades. Identificar como adolescentes respondem ao estresse crônico, e sua resiliência ou suscetibilidade aos transtornos psiquiátricos torna-se essencial. Também em modelos animais, poucas pesquisas abordam essa questão no período da adolescência. Tendo em vista o papel do BDNF no neurodesenvolvimento e plasticidade neuronal, o estudo de sua modulação em um modelo animal de depressão torna-se de extrema importância para o entendimento da neurobiologia da depressão. Selecionamos para o presente estudo o modelo de subjugação social crônica em camundongos C57BL/6 machos adolescentes, e o estudo do BDNF nas áreas cerebrais córtex pré-frontal e hipocampo, por serem áreas muito relacionadas à depressão, e estriado dorsal, como um controle negativo, já que esta é uma área mais relacionada a comportamentos motores. Sendo assim, este trabalho contribui para testar e melhor caracterizar a hipótese neurotrófica da depressão, já que iremos verificar os efeitos do modelo de subjugação social utilizado em nosso laboratório, em camundongos adolescentes, e analisar a expressão de BDNF neste contexto.

2 OBJETIVOS

Objetivo geral:

- Estudar os efeitos do estresse psicossocial prolongado em camundongos C57BL/6 machos adolescentes sobre comportamentos emocionais, sobre a resiliência e suscetibilidade aos efeitos do estresse, e sobre a expressão gênica e proteica do BDNF e suas isoformas em algumas áreas cerebrais.

Objetivos específicos:

- Padronizar um modelo de subjugação social prolongada em nosso laboratório, utilizando camundongos C57BL/6 machos adolescentes.
- Avaliar os efeitos da subjugação social prolongada em camundongos C57BL/6 machos adolescentes sobre os comportamentos emocionais do tipo depressivo e ansioso, avaliados nos testes de preferência por sacarose, interação social e labirinto em cruz elevado.
- Identificar grupos resilientes e suscetíveis ao efeito do estresse por subjugação social prolongada sobre comportamentos hedônicos, avaliados no teste de preferência por sacarose.
- Avaliar os efeitos da subjugação social prolongada em camundongos C57BL/6 machos adolescentes sobre a expressão dos transcritos de *Bdnf* total e suas variantes de junção 1, 2b, 2c, 3, 4 e 5 no córtex pré-frontal, hipocampo, e estriado dorsal.
- Avaliar os efeitos da subjugação social prolongada em camundongos C57BL/6 machos adolescentes sobre a expressão proteica de BDNF total e suas isoformas precursora, madura e truncada no córtex pré-frontal, hipocampo, e estriado.

Pretendemos assim, estabelecer um modelo animal em camundongos adolescentes para transtornos comportamentais induzidos pelo estresse psicossocial prolongado e buscar assinaturas moleculares possivelmente relacionadas à resiliência e suscetibilidade a este estresse.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Animais

Foram utilizados camundongos C57BL/6 machos adolescentes provenientes da colônia do Biotério do Departamento de Farmacologia do Instituto de Ciências Biomédicas (ICB) da Universidade de São Paulo (USP) e mantidos em nosso biotério de experimentação no Instituto de Medicina Tropical (IMT) na Faculdade de Medicina da USP (FMUSP). Os animais foram desmamados aos 21 dias de idade e agrupados em 3 ou 4 animais por gaiola de polipropileno (28x17x12 cm) até completarem 27 dias de idade, quando então foram isolados e distribuídos aleatoriamente em controles e experimentais.

Foram utilizados camundongos machos Swiss e CD1 com mais de 3 meses de idade como agressores. Eles foram mantidos isolados em gaiolas de polipropileno tamanho padrão. Durante a execução dos experimentos, eles foram mantidos isolados em caixas de pareamento (44x34x16 cm) forradas com maravalha, divididas ao meio por uma divisória de acrílico perfurada, especialmente fabricadas, onde foram realizados os episódios de subjugação social.

Todos os animais receberam água e comida *ad libitum* em um ciclo claro-escuro de 12 horas (claro às 7:00 horas) e mantidos à temperatura ambiente de 22±2 °C, dentro de estantes ventiladas (Alesco, Monte Mor, São Paulo). A manipulação dos animais foi conduzida de acordo com os “Princípios Éticos de Experimentação Animal”, adotados pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA), e de modo a minimizar ao máximo o desconforto dos animais durante o estudo. Este estudo foi aprovado pelas COMISSÕES DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUAs) do ICB (nº 174/2013) e do IMT (nº CPE-IMT/172).

3.2 Seleção dos Camundongos Agressores

Para a realização dos experimentos de subjugação social foi necessária uma seleção de camundongos agressivos. Para tanto, 58 camundongos machos adultos Swiss ou CD1 foram isolados em suas gaiolas moradias 2-3 semanas antes do início dos testes de agressividade, uma vez que o isolamento social aumenta a

agressividade (Bibancos et al., 2007). Dez dias antes do início dos experimentos de subjugação social, um camundongo macho adolescente C57BL/6 “isca” foi introduzido à gaiola de um camundongo agressor (Swiss ou CD1) e foi observada a interação entre eles por 3,5 min. Os camundongos agressores receberam uma pontuação (-, +, ++ ou +++) de acordo com seu comportamento agressivo, avaliado conforme parâmetros descritos por Chiavegatto et al., 2001, sendo estes: latência para a primeira mordida e interações agressivas (*grooming* violento e perseguição). Os pareamentos foram realizados por três dias consecutivos e os animais com pontuações entre ++ e +++, nos três testes, foram classificados como “bons agressores” e utilizados posteriormente nos experimentos de subjugação social.

3.3 Modelo Animal de Estresse Psicossocial Prolongado – Subjugação Social

O modelo de estresse psicossocial prolongado escolhido foi o modelo de subjugação social (*social defeat*) descrito por Golden e colaboradores (2011) em camundongos adultos, com pequenas modificações. Três séries experimentais foram realizadas de maneira independente. Em nosso protocolo, os experimentos começaram quando os camundongos C57BL/6 completaram 30 dias de idade (dia 1). Os animais testes (grupo experimental) foram introduzidos cuidadosamente nas caixas de pareamento de um camundongo agressor. Neste momento, o camundongo agressor ataca e persegue o animal teste. Este por sua vez, exibe posturas defensivas e de medo, como congelamento, fuga e posturas submissas. Esta interação física tem duração de 5 min, momento no qual o animal teste é retirado cuidadosamente e recolocado no compartimento ao lado, permanecendo na mesma caixa que o agressor por 24 horas (**Fig. 2**). Durante todo este período, eles mantiveram contato visual, olfatório e auditivo através da divisória acrílica perfurada (estresse psicossocial), porém sem o contato físico. O procedimento foi repetido por 10 dias consecutivos, sempre no mesmo período (entre 14:30 -17 hrs), e diariamente o animal teste foi pareado com um agressor diferente.

Os animais do grupo controle foram colocados individualmente em caixas de pareamento similares àsquelas usadas no procedimento supracitado, um em cada compartimento, podendo manter contato visual, olfatório e auditivo entre eles, sem quaisquer interações físicas. Após 24 horas, os animais do grupo controle são

redistribuídos em outras caixas de pareamento, sendo pareados diariamente, e por 10 dias, com animais controles diferentes. Todos os experimentos com os animais controles ocorreram simultaneamente aos procedimentos com os animais experimentais.

Os pareamentos foram feitos em compartimentos aleatórios da caixa de pareamento (**Fig. 2**). Em ocasiões nas quais as agressões foram muito fortes, o animal teste foi retirado antes dos 5 min para evitar ferimentos. Em casos de ocorrência de ferimentos (3 casos, série 3), os animais foram imediatamente excluídos dos experimentos. Ao término do último pareamento, os animais foram isolados em uma gaiola até a eutanásia.

Figura 2 – Camundongo C57BL/6 macho adolescente em pareamento com um camundongo agressor CD1 macho adulto.

a) Primeiro momento do protocolo de subjugação social no qual o animal experimental é colocado no mesmo compartimento do camundongo agressor na caixa de pareamento por 5 min. **b)** O camundongo experimental é retirado e colocado no compartimento ao lado, estando separado do agressor por uma divisória de acrílico perfurada por 24 horas.

3.4 Delineamento Experimental

O procedimento de subjugação social prolongada, bem como a avaliação comportamental, foram realizados por três vezes de maneira independente, gerando três séries experimentais: série 1, série 2 e série 3. Os tecidos de cada série foram utilizados para diferentes análises biomoleculares. O delineamento experimental está demonstrado na **Figura 3**. O número de animais utilizados em cada série foi:

- **Série 1: 8 controles e 18 experimentais.**

- Os tecidos foram utilizados para a quantificação da proteína BDNF e o sangue para medir a concentração sérica de corticosterona.
- **Série 2: 10 controles e 20 experimentais.**
 - Foram feitas apenas análises comportamentais.
- **Série 3: 10 controles e 17 experimentais.**
 - Os tecidos foram utilizados para realização das análises de expressão gênica.

Figura 3 – Linha cronológica dos experimentos

A figura acima mostra a linha cronológica dos experimentos em dias. Os testes descritos acima da linha cronológica foram realizados entre 9 – 12 hrs e os testes descritos abaixo da linha cronológica foram realizados entre 14 – 17 hrs. PPS=preferência por sacarose; LCE=labirinto em cruz elevado; IS=interação social.

3.5 Determinação do ganho de peso corporal

Os animais foram individualmente pesados nos dias 1 (valor basal, antes do início do protocolo de subjugação social) e 11 (após o fim do último pareamento) no período da tarde em uma balança semi-analítica e o ganho de peso corporal foi calculado como a diferença entre os valores.

3.6 Avaliação de comportamentos emocionais

Os testes realizados para a avaliação de comportamentos emocionais dos animais foram:

- Labirinto em Cruz Elevado (LCE) – dia 10.
- Interação Social (IS) – dia 11.

- Preferência por Sacarose (PPS) – dia 1, 8, 9, 10 e 11.

O teste de IS foi realizado para as séries experimentais 2 e 3, pois este ainda não estava padronizado no momento da realização da série experimental 1.

3.6.1 Labirinto em Cruz Elevado (LCE)

O comportamento do tipo ansioso foi avaliado através do teste do LCE, construído a partir do descrito em Lister (1987), com pequenas modificações. O aparato consiste em um labirinto de madeira revestido por uma camada de Fórmica preta em formato de cruz. Ele é formado por dois braços abertos e dois braços fechados opostos entre si e separados por uma pequena área central (5x5 cm) elevados a 52 cm do chão. Os braços fechados medem 30 cm de comprimento por 10 cm de largura, com paredes de 42 cm de altura. Os braços abertos medem 30 cm de comprimento por 10 cm de largura, e possuem uma margem de 0,5 cm de altura e 0,1 cm de espessura para evitar que o animal caia do aparato ao explorar um dos braços abertos (**Fig. 3**).

O teste de LCE é um teste amplamente utilizado para se medir comportamento do tipo ansioso em camundongos, uma vez que é responsivo à administração de fármacos ansiolíticos (Lister, 1987). O animal é colocado no centro do aparato de frente para um dos braços abertos e seu comportamento é analisado por 5 min. Quando inserido no aparato, o animal apresenta um conflito entre permanecer em uma área menos aversiva (braços fechados) ou explorar áreas de maior risco (braços abertos). Dessa forma, foi quantificado o número de entradas, a permanência (s) e a distância (cm) percorrida nos braços abertos, bem como o número de entradas e a distância percorrida nos braços fechados (cm). A porcentagem do número de entradas nos braços abertos em relação ao número de entradas totais (número de entradas no braço aberto e braço fechado), a permanência (s) e a distância percorrida (cm) nos braços abertos foram usados como medida de comportamento do tipo ansioso. O teste do LCE foi realizado no 10º dia, no período da manhã, antes do 10º e último pareamento do procedimento de subjugação social. Os testes foram filmados por uma câmera (Bosch, São Paulo) posicionada no teto perpendicularmente ao centro do aparato, e as análises foram

feitas manualmente a partir dos vídeos, por dois pesquisadores que desconheciam os grupos experimentais.

Figura 3 – Foto representação do teste de labirinto em cruz elevado (visão superior).

3.6.2 Teste de Interação Social (IS)

O teste de interação social foi usado para se medir a esquiva social, refletida como um menor tempo de interação do camundongo em estudo com um camundongo “alvo”, e uma maior latência para se iniciar a primeira interação. O aparato utilizado foi uma caixa com dimensões de 40,5 x 60,0 x 22,0 cm de acrílico, com paredes transparentes e fundo branco (Noldus, Wageningen, Holanda). A caixa é dividida igualmente em três câmaras interconectadas por pequenas portas, porém apenas duas câmaras foram utilizadas (40,5 x 20,0 cm cada). Este teste foi realizado em dois momentos sequenciais. No primeiro momento, o camundongo foi colocado cuidadosamente na câmara central com uma porta aberta para a câmara da direita, ambas limpas e vazias, e deixado por 3 min para explorar livremente os ambientes. A seguir, ele foi retirado e recolocado em sua gaiola moradia por 30 s, enquanto um camundongo da mesma linhagem e idade (não relacionado aos procedimentos, “alvo”) foi colocado na câmara da direita, dentro de um cilindro perfurado de acrílico. O camundongo teste foi reinserido na câmara vazia e o seu comportamento foi avaliado por 3 min. O tempo de permanência do animal teste na área de interação (área pré-determinada como sendo a metade da câmara da direita em que se encontra o cilindro, **Fig. 4**) e a latência de início para a primeira interação (caracterizada quando o animal teste encosta o focinho no cilindro de acrílico) foram quantificados. Os testes foram filmados por uma câmera (Bosch) posicionada acima

do aparato e as análises foram feitas através do software ViewPoint® (Videotrack 3.0.; View Point, Lyon, France). Este teste foi realizado no 11º dia, no período da manhã (entre 10 -12 hrs).

Figura 4 – Foto representação do teste de interação social.

Visão superior do aparato de interação social. A figura da esquerda mostra o primeiro momento do teste em que o animal é colocado no aparato vazio para explorar o ambiente por 3 min. A figura da direita mostra o segundo momento em que se é colocado um cilindro com um animal alvo e o animal teste é recolocado no aparato para interagir por 3 min.

3.6.3 Teste de Preferência por Sacarose (PPS)

O teste de preferência por sacarose é usado em roedores para medir comportamentos do tipo depressivos como a anedonia (Strekalova e Steinbusch, 2010). O teste consiste em oferecer ao animal um bebedouro com água e outro com uma solução de sacarose. A solução com sacarose desperta um comportamento hedônico (prazeroso) em roedores, induzindo a um maior consumo desta solução em relação à água, em condições normais.

Os testes foram realizados como descrito por Strekalova e colaboradores (2004) com algumas modificações. Primeiramente foi feita uma etapa de adaptação, fornecendo aos animais dois bebedouros (utilizamos tubos do tipo Falcon*, com tampas de borracha e bicos de metal), evitando efeitos de neofobia. Nesta etapa, os

* Utilizamos tubos do tipo Falcon, pois seu volume é menor que o de um bebedouro padrão, reduzindo o peso do volume de água e, assim, reduzindo o gotejamento indesejado de líquido.
volume de água e, assim, reduzindo o gotejamento indesejável de líquido.

animais foram isolados em gaiolas, e depois, 40 mL de água e um mesmo volume de solução de sacarose a 1% (Sigma-Aldrich, St. Louis, EUA) foram oferecidos por dois dias consecutivos, trocando as soluções e a posição dos bebedouros diariamente. A concentração de 1% de sacarose em água foi determinada previamente por nosso grupo em ensaios-piloto como capaz de induzir uma preferência alta em animais controle, entre 80-90%. Depois da etapa de adaptação, o consumo de água e de solução de sacarose foram determinados por 15 horas (início: 18 h, medição: 9 h) e a porcentagem de consumo de sacarose sobre o consumo total de líquidos calculada nos dias 1 (medição basal), 8, 9, 10 e 11. Adotamos a média do consumo diário por 15 horas ocorrido entre os dias 8-11 como medida de preferência por sacarose após um período de subjugação social.

3.7 Sacrifício dos animais

Os animais foram cuidadosamente levados da sala de experimentação e moradia dos animais à uma sala lateral especialmente utilizada para o sacrifício no dia 12, período da tarde (14:30 -17:30 hrs, ou seja, aproximadamente 24 h após o último pareamento). Neste local eles foram decapitados imediatamente de maneira alternada entre os grupos controle e experimental. As estruturas encefálicas córtex pré-frontal, hipocampo e estriado dorsal (núcleos caudado e putâmen) foram dissecadas por uma pesquisadora experiente e foram rapidamente congeladas em gelo seco (séries 1 e 2) ou nitrogênio líquido (série 3), sendo posteriormente mantidas à -70 °C. O córtex pré-frontal e hipocampo foram escolhidos por serem áreas cerebrais muito relacionadas com a depressão. O estriado dorsal foi escolhido como uma área relacionada à parte motora e, portanto, um possível controle negativo para nossos experimentos. O sangue troncular de cada animal foi coletado em microtubos e mantidos em gelo até a separação do soro e sua posterior armazenagem à -70 °C.

3.8 Determinação da Concentração Sérica de Corticosterona

A dosagem de corticosterona sérica foi feita para as amostras da série 1 por imunoensaio enzimático de acordo com as instruções do kit (Arbor Assays-

DetectX® Corticosterone Enzyme Immunoassay Kit # K014-H5, Ann Arbor, Michigan, EUA). A curva padrão de corticosterona, assim como a dosagem das amostras, foram feitas em triplicata, em placa de 96 poços e segundo as especificações do fornecedor. Calculou-se a absorbância média das triplicatas, e a partir da curva padrão obteve-se a concentração das amostras. A absorbância foi lida em 595 nm no espectrofotômetro Techne TC-5000 (Bibby Scientific, Staffordshire, Reino Unido). O limite inferior de detecção do kit é de 16,9 pg/mL e o coeficiente de variação do intraensaio foi de 8%.

3.9 Quantificação da expressão gênica

3.9.1 Extração de RNA total

O RNA total foi isolado através do kit de extração *mirVana*TM *PARIS*TM Kit (Ambion®, Foster City, EUA), seguindo o protocolo sugerido pelo fabricante. Este kit nos permite separar moléculas de RNA de baixo peso molecular (microRNA, por exemplo) do restante do RNA, o qual denominamos aqui de RNA total, e foi escolhido para a obtenção de material para realização de futuras análises moleculares. Os tecidos foram retirados do freezer -70 °C em gelo e homogeneizados em 450 µL de tampão de lise por 30 s (Ultra-Turrax T10, IKA, Staufen, Alemanha). Após a homogeneização, igual volume de solução desnaturante contendo 2-mercaptoetanol foi adicionado ao homogenato. A solução foi misturada por inversão e incubada em gelo por 5 min. Foi adicionado igual volume de uma solução de fenol ácido:clorofórmio e homogeneizado no vórtex por 30 s. As amostras foram centrifugadas por 5 min em temperatura ambiente a 15000 g. Após a centrifugação, o sobrenadante foi cuidadosamente transferido para um novo tubo e acrescentado um terço de volume de álcool 100%. Nesta etapa as moléculas de RNA acima de 200 pares de base (pb) precipitam e a fase aquosa permanece com as moléculas de RNA de menores pesos moleculares (< 200 pb). A solução, contendo as duas fases, foi transferida para um tubo contendo um filtro de sílica capaz de filtrar os fragmentos de RNA precipitados e centrifugada a 5000 g por 15 s. Dessa forma, as moléculas de RNA com maiores pesos moleculares ficam retidas no filtro e as moléculas de RNA com menores pesos moleculares continuam dissolvidas

na solução. O filtro foi transferido para um tubo vazio e foi adicionado 700 µL de uma solução de lavagem, centrifugado, e seguido de mais duas lavagens com 500 µL de uma segunda solução de lavagem. O filtro foi centrifugado por 1 min a 5000 g para retirar qualquer resquício de solução, e transferido para um novo tubo. Por fim, 100 µL de água livre de nucleases pré-aquecida a 95 °C foram adicionados no filtro para dissolução do RNA total e centrifugado por 30 s a 5000 g. O filtro foi descartado e a solução contendo o RNA total foi guardada em freezer -70 °C até o seu uso. A concentração e a pureza das amostras foram verificadas em espectrofotômetro (NanoDrop, Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, Mass, EUA) e através de um gel de agarose 1%.

3.9.2 Síntese do DNA complementar (DNAC)

A síntese do DNAC foi feita simultaneamente para as amostras dos grupos controle e experimental, para cada área cerebral, utilizando-se 2 µg do RNA total, 4 µL de tampão 5X (250 mM de Tris-HCl pH 8,3; 375 mM KCl e 15 mM de MgCl₂), 1 µL de DTT 0,1 M, 0,025 M de iniciadores oligo(dT), 0,5 mM de cada desoxirribonucleotídeos fosfatados (dATP, dGTP, dCTP e dTTP), 40 U da enzima Rnase OUT, e 200 U da enzima SuperScript III Reverse Transcriptase (todos da Invitrogen, Carlsbad, CA, EUA), em um volume total de 20 µl de água, isenta de RNases e DNases. Inicialmente, o RNA foi aquecido a 65 °C juntamente com os iniciadores oligo(dT) e os desoxirribonucleotídeos fosfatados, por 5 min, e colocado no gelo até a adição dos demais reagentes. A reação foi incubada a 50 °C por 50 min, e interrompida pelo aquecimento a 85 °C, por 5 min. Por fim, foi realizado um tratamento com RNase H para eliminação das moléculas de RNA por 20 min a 37 °C. As soluções de DNAC foram armazenadas em freezer a -20 °C, até seu uso.

3.9.3 Procedimento para a confecção de oligonucleotídeos iniciadores (primers)

Os oligonucleotídeos iniciadores, específicos para as variantes de junção do Bdnf de camundongos (*Mus musculus*) e para os genes candidatos a controle interno (genes com expressão similar entre os tratamentos, definido como genes de referência), foram desenhados utilizando-se o software Primer 3

(http://www.genome.wi.mit.edu/cgi-bin/primer/primer3_www.cgi), sua especificidade foi verificada através do BLAST (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>) e a qualidade confirmada no programa Beacon Designer (<http://www.premierbiosoft.com/qOligo/Oligo.jsp?PID=1>).

Os oligonucleotídeos foram sintetizados pela IDT (Integrated DNA Technologies Inc., Coralville, IA, EUA). Os parâmetros teóricos utilizados na confecção consideraram: a) temperatura de anelamento em torno de 60 °C; b) tamanho do produto entre 70 e 230 pb; c) porcentagem de GC em torno de 50%; d) preferência por regiões situadas em diferentes éxons; e) tamanho do iniciador entre 19-21 pb.

3.9.4 Reação em cadeia de polimerases (PCR) em Tempo Real

As reações de PCR quantitativo em tempo real (qPCR) foram feitas no equipamento Rotor Gene 3000 (Corbett Research, Concord, Australia). A quantificação relativa dos transcritos para cada amostra foi feita de acordo com por qPCR através do Cq (ciclo de quantificação) (Vandesompele et al., 2002), que é o número de ciclos necessários para que a fluorescência emitida pela amostra alcance uma linha de detecção arbitrária (*threshold*) escolhida na fase exponencial da reação, na qual a linearidade é mantida. É nesta fase que a eficiência e o resultado da reação são obtidos, e a fluorescência adquirida é proporcional ao número inicial de cópias da amostra. Para a escolha da concentração ideal de DNAC a ser amplificado, confeccionou-se uma curva padrão de amplificação, contendo 5 pontos de uma diluição seriada (40 ng, 20 ng, 10 ng, 5 ng, 2,5 ng), para cada par de primer. Após a análise desta curva, o intervalo de diluição que apresentou eficiência entre 90% e 100% e acompanhada de um coeficiente de correlação superior a 0,98 foi escolhido para a concentração de trabalho. Sendo assim, as reações contiveram 10 ng de DNAC, 200nM de iniciadores senso e anti-senso, sais, deoxinucleotídeos, a enzima AmpliTaq Gold DNA polimerase (Applied Biosystems, Warrington, Reino Unido) e o composto fluorescente Sybr Green I, otimizados para um volume final de 20 µl. As reações foram incubadas inicialmente a 95 °C, por 10 min, para a ativação da enzima DNA polimerase, seguidas por 40 ciclos de: a) 15 s a 95 °C, para desnaturação, b) 60 s a 60 °C, para anelamento, extensão e coleta do sinal de

fluorescência. Para cada corrida foram feitos os controles negativos: NTC (ausência de DNAC) e uma amostra de RNA total (controle negativo para verificar a possível presença de DNA genômico). As amostras referentes aos grupos controle e experimental foram processadas para cada gene sempre na mesma corrida junto a uma curva padrão com três pontos de diluição. As amostras foram feitas em triplicata e algumas em duplicatas, devido a limitações quanto ao número de amostras que podem ser corridas ao mesmo tempo no equipamento (72 amostras). Após o término de cada corrida, a especificidade do produto de PCR formado foi determinada através de uma corrida de dissociação (95 °C por 15 s, estabilização a 60 °C, seguida de um aumento gradual de temperatura de 0,5 °C por min). Dessa forma, somente foram utilizados os iniciadores cujos produtos amplificados mostraram pico único, claro e bem definido na temperatura correta nesta corrida de dissociação.

3.10 Quantificação da expressão proteica de BDNF

3.10.1 Anticorpos

Anticorpos primários para a marcação de BDNF (sc-546, lote # G2512, anticorpo policlonal produzido em coelho) e de β -actina (sc-47778, lote # D0213, anticorpo monoclonal produzido em camundongo) foram utilizados. O anticorpo sc-546 foi escolhido por ser capaz de reconhecer as três isoformas do BDNF conforme publicado em alguns trabalhos (Carlino et al., 2010; Sartori et al., 2011).

Os anticorpos secundários foram: anti-coelho conjugado com HRP (sc-2004, lote # E1012, anticorpo monoclonal produzido em cabra) e anti-camundongo conjugado com HRP (sc-2005, lote # B0513, anticorpo monoclonal produzido em cabra). Todos os anticorpos foram adquiridos da empresa Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, EUA.

3.10.2 Ensaio de Western Blot

Os tecidos (córtex pré-frontal, hipocampo e estriado dorsal) foram descongelados e homogeneizados (Ultra-Turrax T10) em 150 μ L de tampão de lise (1% de SDS, 1 mM de EDTA, 10 mM Tris) contendo coquetel de inibidores de

proteases e fosfatases (1:1000, Sigma-Aldrich, St. Louis, MI, USA). Após a homogeneização, as amostras foram centrifugadas a 13.000 g por 15 min a 4 °C e os sobrenadantes foram retirados e armazenados a -70 °C, até utilização posterior. As concentrações de proteína foram determinadas usando o método do ácido bicinconínico (BCA) (Pierce, Rockford, IL, EUA).

Vinte microgramas de proteína de cada amostra foram ajustadas para um volume total de 20 µL com água deionizada e tampão Laemmli (65,8 mM Tris-HCl, pH 6,8, 2,1% SDS, 26,3% glicerol, 0,01% azul de bromofenol) contendo ditioneitol (350 mM) (Bio-Rad, Berkley, CA, EUA). As amostras foram aquecidas por 7 min a 95 °C e aplicadas em géis pré-moldados de SDS-poliacrilamida 10% (Bio-Rad). Os géis foram submetidos à eletroforese em tampão de corrida (25 mM Tris-base, 192 mM glicina e 20% SDS) por 45 min a 250 Volts. As proteínas separadas e contidas nos géis foram então transferidas por eletroforese durante 3 min para membranas de fluoreto de polivinilideno utilizando o sistema Trans-Blot Turbo (Bio-Rad). Após a transferência, as membranas foram bloqueadas em tampão TTBS (20 mM Tris-base, 137 mM NaCl, 1% Tween® 20, pH 7,4) contendo 5% de albumina (BSA) durante 4 h à temperatura ambiente, sob agitação constante. Após o bloqueio, as membranas foram incubadas durante a noite a 4 °C em 5 mL de tampão TTBS contendo 5% albumina e anticorpo contra BDNF (1:1000). As membranas foram lavadas 3 vezes por 10 min em TTBS, sendo então encubadas por 1 h e 30 min com o anticorpo secundário anti-coelho (1: 4000) em 5 ml de tampão TTBS contendo 5% albumina. Após mais 3 lavagens, foi adicionado o substrato de quimioluminescência Clarity Western ECL Substrate (Bio-Rad). Em seguida, a visualização e fotografia das bandas foram realizadas em um transiluminador ImageQuant 300 (GE Healthcare, Milwaukee, WI, USA) em filtro para luz visível. Posteriormente, as mesmas membranas foram incubadas com anticorpo primário β -actina (1:1000) para normalização da quantidade de proteína de cada amostra, seguindo o mesmo protocolo acima. A quantificação da densidade óptica das bandas foi realizada utilizando o *software ImageQuant* (GE Healthcare), normalizando-se os valores de densidade óptica das proteínas de interesse pelos valores de densidade óptica da β -actina.

3.11 Análise Estatística

Os resultados mostrados nos gráficos estão expressos em média $\pm$ erro padrão da média (EPM). As análises e os gráficos foram feitos utilizando-se o programa estatístico GraphPad Prism (versão 5.0, GraphPad Software, San Diego, CA, EUA). A distribuição dos dados foi verificada através dos testes de Shapiro-Wilk e Kolmogorov-Smirnov. Para os dados que apresentaram distribuição normal, foram utilizados os testes t de Student (comparações entre controle x experimental), ANOVA de 1 via (comparações entre os grupos controle, suscetível e resiliente) seguido do teste de Tukey para comparações entre dois grupos e ANOVA de 2 vias (para verificar a influência do estresse por subjugação social x diferentes séries experimentais). Para os dados que não apresentaram distribuição normal, foram utilizados os testes de Mann-Whitney (comparações entre controle x experimental) e Kruskal-Wallis (comparações entre os grupos controle, suscetível e resiliente) seguido do teste de Dunn para comparação entre dois grupos.

O método de z-score foi usado para transformar cada parâmetro da interação social (o tempo de interação social e a latência para iniciar a primeira interação) e somá-los em uma pontuação geral representativa para a interação social. O nível de significância de 5% foi adotado para revelar diferença estatisticamente significativa entre os grupos comparados.

4 RESULTADOS

4.1 Ganho de peso dos animais após o período de estresse psicossocial diário

Os animais foram pesados nos dias 1 (antes do início dos pareamentos) e 11 (24 h após o último pareamento). Não foi observada diferença no peso inicial entre os grupos controle e experimental em nenhuma série experimental ($p > 0,05$; **Fig. 6a**). O peso final também não diferiu estatisticamente entre os grupos em cada série experimental realizada ($p > 0,05$; **Fig. 6b**). Uma diminuição de aproximadamente 40% no ganho de peso do grupo experimental em relação ao grupo controle foi observada na série 2 ($t = 2,42$, $p < 0,01$), porém não foram observadas diferenças estatisticamente significantes nas séries experimentais 1 e 3 ($p > 0,05$) (**Fig. 6c**).

Figura 6 – Efeitos do estresse por subjugação social durante 10 dias em camundongos machos adolescentes sobre o peso corpóreo nas três séries comportamentais.

O peso inicial e final foram medidos no dia 1 antes do primeiro pareamento e 24 h após o último pareamento, respectivamente. O ganho de peso representa a diferença entre as medições inicial e final. Dados representam a média $\pm$ EPM. Teste t de Student, ** $p < 0,01$.

4.2 Concentração sérica de corticosterona após o período de estresse psicossocial diário

A **Figura 7** mostra a concentração sérica de corticosterona determinada durante o ciclo claro (entre 15 e 17 h) 24 horas após o último pareamento nos animais da série 1. Não foi observada diferença estatisticamente significativa entre o grupo controle e experimental ($p>0,05$).

Figura 7 – Efeitos do estresse por subjugação social durante 10 dias em camundongos machos adolescentes sobre a concentração sérica de corticosterona no momento da eutanásia dos animais da série experimental 1.

Dados representam a média $\pm$ EPM.

4.3 Comportamento de anedonia no teste de PPS 1%

Os consumos de água e de solução de sacarose a 1% por 14 horas foram determinados pela manhã nos dias 1 (basal), 8, 9, 10 e 11. O valor do dia 1 e a média dos valores entre os dias 8-11 do consumo da solução adocicada, em relação ao consumo diário total de líquidos, foram usados como medida de PPS. Não foi observada diferença entre os valores basais (dia 1) na PPS dos camundongos dos diferentes grupos em nenhuma das séries experimentais ($p > 0,05$, **Fig. 8**). O consumo total de fluídos após o estresse psicossocial diário não diferiu entre os grupos em todas as séries experimentais ($p > 0,05$, **Fig. 9a**). Entretanto, a PPS dos camundongos adolescentes apresentou-se reduzida devido ao estresse psicossocial diário, ao se analisar conjuntamente as três séries experimentais ($F_{(1,81)}=12,81$, $p < 0,001$, **Fig. 9b**), sem sofrer influência da série experimental ($F_{(2,80)}=1,16$, $p > 0,05$, **Fig. 9b**).

Figura 8 – Preferência por solução de sacarose a 1% em camundongos machos com 30 dias de idade (valor basal) em cada série experimental

Dados representam a média $\pm$ EPM.

Figura 9 – Efeitos do estresse por subjugação social durante 10 dias em camundongos machos adolescentes sobre o consumo total de fluidos e sobre a preferência por solução de sacarose a 1% em cada série experimental

Média de consumo entre os dias 8-11. Dados representam a média $\pm$ EPM. Teste ANOVA de duas vias, *** $p < 0,001$.

A variabilidade dos dados de PPS no grupo subjugado apresentou-se diferente da variabilidade no grupo controle nas três séries experimentais analisadas em conjunto (F teste, $F=3,18$, $p < 0,01$). Uma cuidadosa análise dos dados sugeriu que o grupo experimental era composto por dois subgrupos de animais: um subgrupo que apresentava o valor de PPS semelhante ao do grupo controle e um subgrupo que apresentava uma redução na PPS (anedonia). A partir desta observação, utilizamos os valores de PPS do grupo controle das três séries

experimentais em conjunto para estabelecer um valor adequado para possibilitar a separação dos subgrupos entre os animais subjugados. Estabelecemos o 5º percentil dos valores do grupo controle como valor de corte (PPS=77,7%; **Tabela 1** e **Fig. 10**), ou seja, escolhemos o limite inferior dos 95% dos indivíduos que compõe o grupo controle. A escolha deste método foi baseada na observação de que o grupo controle das três séries experimentais não seguia uma distribuição normal e, portanto, um método paramétrico como o desvio padrão não seria adequado.

Tabela 1 – Valores de PPS (%) dos camundongos do grupo controle das três séries experimentais em conjunto, referentes aos 1º a 99º percentis

Percentis	1º	5º	10º	25º	50º	75º	90º	95º	99º
PPS (%)	76,6	77,7	78,0	82,9	87,2	88,8	91,3	92,6	93,6

Figura 10 – Efeitos do estresse por subjugação social durante 10 dias em camundongos machos adolescentes sobre a preferência por solução de sacarose a 1% nas três séries experimentais em conjunto.

A linha tracejada representa o valor correspondente ao 5º percentil do grupo controle utilizado para a separação do grupo experimental nos subgrupos resiliente e suscetível. Dados representam a média $\pm$ EPM. Teste Mann-Whitney, * $p < 0,05$.

Desta forma, os animais do grupo experimental de cada série experimental foram divididos em resilientes, ou seja, aqueles sujeitos que obtiveram valores superiores a 77,7% na PPS, ou suscetíveis, que obtiveram valores abaixo de 77,7%. Em todas as séries experimentais, o grupo suscetível mostrou uma acentuada redução na PPS quando comparado aos grupos controle e resiliente (série 1: $F_{(2,23)}=39,78$, $p<0,0001$; série 2: $F_{(2,27)}=30,06$, $p<0,0001$; série 3: $F_{(2,24)}=29,95$, $p<0,0001$; **Fig. 11**). O número de animais resilientes e suscetíveis obtidos em cada série foi:

Tabela 2 – Número de camundongos adolescentes resilientes e suscetíveis após o estresse psicossocial prolongado em cada série experimental, conforme o valor estabelecido para PPS em 77,7% (5º percentil do grupo controle)

Série Experimental	Resilientes	Suscetíveis	% Suscetíveis
Série 1	10	8	44%
Série 2	11	9	45%
Série 3	10	7	41%

Figura 11 – Efeitos do estresse por subjugação social durante 10 dias em camundongos machos adolescentes sobre a preferência por solução de sacarose a 1% em cada série experimental. Os grupos experimentais apresentam-se subdivididos em resilientes e suscetíveis ao efeito anedônico (PPS)

A linha tracejada representa o valor correspondente ao 5º percentil do grupo controle (77,7%) utilizado para a separação do grupo experimental em resiliente e suscetível. Dados representam a média $\pm$ EPM. *** $p < 0,001$ com relação aos grupos controle e resiliente (ANOVA seguido por Tukey).

4.4 Comportamentos relacionados à esquiva social no teste de interação social

O teste de interação social foi feito com os animais das séries 2 e 3 para avaliar comportamentos relacionados à esquiva social. Dois parâmetros diferentes foram observados: o tempo gasto em interação social e a latência para a primeira interação. Na série 2 o grupo experimental mostrou diminuição no tempo em interação ($t=2,80$, $p=0,01$), mas não mostrou alteração na latência ($p>0,05$; **Fig. 12a**). Na série 3 o grupo experimental não diferiu no tempo em interação ($p>0,05$), porém mostrou aumento na latência ($t=2,11$, $p<0,05$; **Fig. 12b**). Adicionalmente, ambos os parâmetros de interação social observados foram transformados por z-escore e somados com a finalidade de gerar uma pontuação para interação social considerando, os dois parâmetros anteriores em conjunto. Os animais subjugados apresentaram tendência a uma menor pontuação para interação social em ambas as séries (série 2: $t=1,95$, $p=0,06$, **Fig. 12a**; série 3: $t=1,89$, $p=0,07$; **Fig. 12b**).

Figura 12 – Efeitos do estresse por subjugação social durante 10 dias em camundongos machos adolescentes sobre comportamentos relacionados à esquia social no teste de interação social

a)

Série 2

b)

Série 3

Tempo total de interação e latência (s) para a primeira interação, e pontuação para interação social por z-escore da a) série 2 e b) série 3. Dados representam a média $\pm$ EPM. Teste t de Student, * $p < 0,05$.

Investigou-se se os subgrupos suscetível e resiliente aos efeitos anedônicos (PPS) apresentariam diferenças em relação aos parâmetros de esquia social. Uma redução na pontuação para interação social foi observada nos grupos resiliente e suscetível em relação ao grupo controle analisando as séries experimentais 2 e 3 em conjunto ($H=9,73$, $gl=2$, $p<0,01$; **Fig. 13**).

Figura 13 – Efeitos do estresse por subjugação social durante 10 dias em camundongos machos adolescentes sobre comportamentos relacionados à esquia social nas séries experimentais 2 e 3 em conjunto. O grupo experimental se apresenta subdividido em resiliente e suscetível ao efeito anedônico (PPS)

Pontuação para interação social após a transformação em z-escore dos dados referentes aos parâmetros tempo e latência para interação, e posterior somatória em um único parâmetro, nas séries experimentais 2 e 3 em conjunto. Dados representam a média $\pm$ EPM. ** $p<0,01$ com relação ao grupo controle (Kruskal-Wallis seguido por Dunn).

4.5 Comportamentos relacionados à ansiedade no teste do labirinto em cruz elevado

Comportamentos relacionados à ansiedade foram avaliados por 5 min no LCE. O grupo experimental da série 1 mostrou diminuição na porcentagem do número de entradas no braço aberto ($t=2,63$, $p<0,05$; **Fig. 14a**), porém não houve diferença na distância percorrida e no tempo de permanência nos braços abertos ($p>0,05$; **Fig. 14c**), enquanto que os animais do grupo experimental das séries 2 e 3 não apresentaram diferença estatisticamente significativa em todos os parâmetros observados ($p>0,05$; **Fig. 14**).

Figura 14 – Efeitos do estresse por subjugação social durante 10 dias em camundongos machos adolescentes sobre comportamentos relacionados à ansiedade no teste labirinto em cruz elevado nas três séries experimentais

a) % de entrada nos braços abertos; b) distância percorrida nos braços abertos; c) tempo nos braços abertos. Dados representam a média $\pm$ EPM. Teste t de Student, * $p<0,05$.

Investigou-se os subgrupos resilientes e suscetíveis aos efeitos anedônicos (PPS), com relação aos comportamentos avaliados no LCE. Uma tendência à redução na porcentagem do número de entradas no braço aberto foi observada nos animais dos grupos resiliente e suscetível da série 1 ($F_{(2,23)}=3,27$, $p=0,056$; **Fig. 15a**), enquanto que nenhuma diferença foi observada nos outros parâmetros desta série ($p<0,05$; **Fig. 15a,b,c**), bem como em todos os parâmetros das séries 2 e 3 ($p>0,05$; **Fig. 15a,b,c**).

Figura 15 – Efeitos do estresse por subjugação social durante 10 dias em camundongos machos adolescentes sobre comportamentos relacionados à ansiedade no teste de labirinto em cruz elevado, após a separação do grupo experimental em resiliente e suscetível nas três séries experimentais

a) % entrada nos braços abertos; b) distância percorrida nos braços abertos; c) tempo nos braços abertos. Dados representam a média $\pm$ EPM.

4.6 Quantificação da expressão gênica de Bdnf total e suas variantes de junção por PCR em tempo real

A expressão dos transcritos Bdnf total e suas variantes de junção dos grupos controle, resiliente e suscetível foi quantificada por qPCR nos animais da série experimental 3 no córtex pré-frontal, hipocampo e estriado dorsal.

4.6.1 Pares de iniciadores utilizados para a amplificação dos genes

A **Tabela 3** apresenta a sequência e o tamanho do produto amplificado pelos iniciadores desenhados para a amplificação dos transcritos referentes aos diferentes transcritos de Bdnf e aos genes de referência.

Tabela 3 – Sequência dos pares de iniciadores utilizados para qPCR e o tamanho do produto em pares de bases

Genes	Sequências Senso / Antisenso (5' -> 3')	Tamanho do produto (pb)
Bdnf total (AY057907 [†])	ACCCAGGTGTGCGGACCCAT/ TGGGCCGAACCTTCTGGTCCT	143
Bdnf1 (AY057908.1)	TCACACCAAGTGGTGGGCGA/ GCCGCCTTCATGCAACCGAA	217
Bdnf2B (AY057910.1)	CTCCTGCGCCGGGTGTGTGAT/ CGCTCTCCAAACGCTCCGCTC	222
Bdnf2C (AY057911.1)	TTGGAGCGGAGCGTTTGGAGA/ ATACCAACCCGGAGCTTGCCA	115
Bdnf3 (AY057912.1)	GCTGAGACTGCGCTCCACTCC/ GGGTCCGCACACCTGGGTAG	189
Bdnf4 (AY057913.1)	CCACCAAAGACTCGCCCCCT/ GCCGCCTTCATGCAACCGAA	212
Bdnf5 (AY057914.1)	ACCCGGTTCCTTCAACTGCCA/ GCCGCCTTCATGCAACCGAA	216
Ppia (NM_008907)	AATGCTGGACCAAACACAAAA/ CCTTCTTTACCTTCCCAA	101
Hprt1 (NM_013556)	TGTTGTTGGATATGCCCTTG/ GCGCTCATCTTAGGCTTTGT	106
Gapdh (NM_001001303)	AGGAGCGAGACCCCACTAAC/ GTGGTTCACACCCATCACAA	179

[†] Apenas a sequência do éxon codificante (éxon VIII) do gene Bdnf foi utilizada para o desenho do respectivo primer.

4.6.2 Escolha dos genes normalizadores

A escolha dos melhores genes normalizadores foi feita de acordo com Vandesompele e colaboradores (2002), calculando-se o índice M (*Internal control gene-stability measure M*), que representa o quanto os valores de expressão de um gene controle estão variando entre as amostras (**Tabela 4**). Os transcritos com menor índice M (menor variação) foram selecionados como normalizadores. São eles:

- Córtex pré-frontal: Gapdh e Ppia.
- Hipocampo: Ppia e Hprt1.
- Estriado: Gapdh, Ppia e Hprt1.

Tabela 4 – Índice M dos genes normalizadores

Tecido	Gene Controle	Índice M
Córtex Pré-Frontal	Gapdh	0,146
	Ppia	0,140
	Hprt1	0,176
Hipocampo	Gapdh	0,190
	Ppia	0,142
	Hprt1	0,157
Estriado	Gapdh	0,067
	Ppia	0,072
	Hprt1	0,073

4.6.3 Análise da quantificação da expressão relativa dos diferentes transcritos de *Bdnf* em diferentes áreas cerebrais dos camundongos machos adolescentes após a subjugação social prolongada

Os resultados a seguir mostram a expressão dos genes normalizadores *Gapdh*, *Hprt1* e *Ppia*, e dos transcritos do *Bdnf* total, *Bdnf1*, *Bdnf2B*, *Bdnf2C*, *Bdnf3*, *Bdnf4* e *Bdnf5* no córtex pré-frontal, hipocampo e estriado dorsal dos grupos controle, resiliente e suscetível da série 3. Os níveis de expressão dos genes normalizadores não diferiram entre os grupos ($p > 0,05$, **Tabela 5**). No córtex pré-frontal e no hipocampo não foram observadas diferenças significantes em nenhum dos transcritos estudados ($p > 0,05$, dados estatísticos em APÊNDICE; e **Fig. 16**). No estriado, os dados mostram uma redução de 49% nos níveis do transcrito *Bdnf4* no grupo suscetível em relação ao grupo resiliente ($H=7,01$, $gl=2$, $p < 0,05$; **Fig. 16**), porém sem diferença significativa entre cada grupo em relação o grupo controle. Os demais transcritos não apresentaram diferença significativa no estriado ($p > 0,05$, dados estatísticos em APÊNDICE; **Fig. 16**).

Tabela 5 – Quantidade normalizada pelo grupo controle dos transcritos dos genes normalizadores (valores arbitrários)

Área	Grupo (n)	Gene		
		<i>Gapdh</i>	<i>Hprt1</i>	<i>Ppia</i>
Córtex Pré-Frontal	Controle	1 ± 0,33	1 ± 0,72	1 ± 0,37
	Resiliente	1,03 ± 0,49	1,72 ± 1,07	0,94 ± 0,34
	Suscetível	0,93 ± 0,34	2,05 ± 1,68	0,82 ± 0,32
Hipocampo	Controle	1 ± 0,69	1 ± 0,34	1 ± 0,49
	Resiliente	1,2 ± 0,60	1,06 ± 0,29	1,19 ± 0,28
	Suscetível	0,88 ± 0,8	1,11 ± 0,31	0,96 ± 0,53
Estriado dorsal	Controle	1 ± 0,17	1 ± 0,25	1 ± 0,13
	Resiliente	0,86 ± 0,12	0,96 ± 0,34	1,19 ± 0,19
	Suscetível	0,92 ± 0,17	1,15 ± 0,25	1,12 ± 0,16

Os dados foram normalizados em relação ao grupo controle e representam a média ± DP.

Figura 16 - Efeitos do estresse por subjugação social durante 10 dias em camundongos machos adolescentes sobre a expressão gênica relativa, por qPCR, dos diferentes transcritos de Bdnf no córtex pré-frontal, hipocampo e estriado dorsal dos animais da série experimental 3

Expressão dos transcritos Bdnf total, Bdnf1, Bdnf2B, Bdnf2C, Bdnf3, Bdnf4 e Bdnf5 nos grupos controle, resiliente e suscetível no córtex pré-frontal, hipocampo e estriado (n=5-8/grupo). Os dados foram normalizados em relação ao grupo controle e representam a média $\pm$ EPM. * $p < 0,05$, RES vs SUS (Kruskal-Wallis seguido por Dunn).

4.7 Análise da quantificação proteica das diferentes isoformas de BDNF em diferentes áreas cerebrais dos camundongos machos adolescentes após subjugação social prolongada por ensaio de *Western Blot*

O padrão de imunomarcação utilizando os anticorpos anti-BDNF (sc-546) e anti- β -actina (sc-47778) pode ser visto na **Figura 18**. Os resultados a seguir mostram a expressão proteica de BDNF total e suas isoformas precursora, madura e truncada no córtex pré-frontal, hipocampo e estriado dorsal dos grupos controle e suscetível da série 1. No córtex pré-frontal não houve diferença na quantificação de nenhuma das isoformas estudadas entre os grupos ($p > 0,05$; **Fig. 17**). Os níveis de BDNF total, proBDNF e trBDNF no hipocampo não mostraram diferença significativa ($p > 0,05$; **Fig. 17**). A isoforma mBDNF mostrou uma tendência de aumento no grupo experimental ($t = 0,21$, $p = 0,10$; **Fig. 17**). No estriado dorsal, observou-se uma diminuição de 11,5% dos níveis de BDNF total ($t = 2,14$, $p = 0,05$; **Fig. 17**) e de 11% de trBDNF ($t = 1,524$, $p = 0,05$; **Fig. 17**) entre os grupos controle e suscetível, enquanto que nenhuma diferença foi observada para as isoformas mBDNF e proBDNF ($p > 0,05$; **Fig. 17**).

Figura 17 - Efeitos do estresse por subjugação social durante 10 dias em camundongos machos adolescentes sobre a expressão proteica de BDNF no córtex pré-frontal, hipocampo e estriado dorsal por ensaio de *Western Blot* nos animais da série 1

Dados foram normalizados em relação ao grupo controle e representam a média $\pm$ EPM. Teste t de Student, * $p < 0,05$. BDNF total= somatória das três isoformas; mBDNF= BDNF maduro; proBDNF= forma precursora do BDNF; trBDNF= BDNF truncado.

Figura 18 – Padrão de imunomarcacão usando os anticorpos anti-BDNF (sc-546) e anti- β -actina (sc-47778) em SDS-PAGE no hipocampo

As setas à direita mostram a localização de cada isoforma do BDNF e β -actina em SDS-PAGE, e à esquerda estão marcados os pesos moleculares. CTR= controle; SUS= suscetível.

5 DISCUSSÃO

Modelos animais de depressão que empregam estressores físicos (como por exemplo, luz estroboscópica, choque, imobilização forçada ou nado forçado) carecem de uma validade de construto, já que não refletem etiologicamente situações desencadeadoras da depressão em humanos e são situações que dificilmente roedores enfrentam em seu habitat (Krishnan e Nestler, 2011). Os modelos de estresse psicossocial, entretanto, representam melhor o estresse sofrido em seres humanos, especialmente durante a adolescência, período em que o estresse de natureza social é o de maior relevância. O principal componente do modelo de subjugação social é possibilitar a interação agonística entre dois animais, levando à submissão do animal “derrotado” e ao *status* dominante do “vencedor”. Esta situação modela de maneira mais satisfatória o *bullying* praticado entre jovens, onde uma criança ou adolescente são submetidos a situações crônicas de subjugação social (Nestler e Hyman, 2010; Buwalda et al., 2011). Entretanto, poucos estudos investigaram o efeito do estresse psicossocial em animais adolescentes, quando iniciamos este nosso trabalho, além de todos terem utilizado ratos (Bourke e Neigh, 2011; Buwalda et al., 2011).

Conforme sugerido pelos autores descritos acima, concordamos que o modelo empregado neste estudo possa se constituir em uma ferramenta muito útil para estudar e melhor compreender os fatores moleculares que possivelmente estejam envolvidos na depressão. Demonstramos que este modelo foi capaz de induzir um comportamento do tipo depressivo nos animais subjugados, observado na forma de anedonia no teste de PPS. A anedonia, como dito anteriormente, representa uma menor capacidade do indivíduo em sentir prazer, e é um dos parâmetros de maior validade de face e de predição em um modelo animal de depressão, pois reflete um dos principais sintomas do transtorno depressivo maior (Willner et al., 1992), além de responder ao uso crônico de antidepressivos. Dessa forma, os nossos resultados estão de acordo com relatos da literatura, nos quais vários estressores físicos (Willner, 1997; Strekalova et al., 2004) e estressores psicossociais (Berton et al., 2006; Krishnan et al., 2007; Venzala et al., 2013) de forma crônica são capazes de induzir anedonia. Aproximadamente 40-50% dos animais subjugados nas três diferentes, e independentes, séries experimentais

apresentaram déficit hedônico no teste de PPS. Dados semelhantes foram encontrados na literatura. Strekalova e colaboradores (2004), usando um modelo de estresse crônico moderado (físico e psicossocial) em camundongos adultos, observaram uma população de 60% dos animais subjugados apresentando anedonia. Krishnan e colaboradores (2007), usando o mesmo modelo de subjugação social utilizado em nosso trabalho, porém em camundongos adultos, também encontraram uma população entre 50-60% de animais com anedonia. Esta variabilidade dos resultados intra-grupo nos permite analisar componentes comportamentais e moleculares referentes à suscetibilidade e à resiliência aos efeitos do estresse crônico psicossocial.

O nosso protocolo de estresse social também foi capaz de induzir esquiva social nos animais subjugados frente a um animal co-específico em ambas as séries experimentais testadas. A esquiva social, apesar de ser revertida com o tratamento crônico com antidepressivos (Berton et al., 2006), pode estar mais relacionada à ansiedade generalizada, ou a um medo específico do animal em interagir socialmente devido aos episódios anteriores de agressão (fobia social) (Toth e Neumann, 2013), do que a um comportamento do tipo depressivo. Este comportamento, dependendo da intensidade e duração dos encontros agonistas de subjugação, pode ser específico apenas frente aos próprios agressores, ou generalizado a animais desconhecidos e até mesmo de linhagens diferentes a dos agressores (Toth e Neumann, 2013). De uma maneira geral, comportamentos similares também podem ser observados em pacientes com transtorno ansioso social (Bögels et al., 2010). Outrossim, episódios agudos de subjugação social podem ser suficientes para a indução de esquiva social, ao contrário da anedonia, que parece se manifestar somente a partir do estresse crônico (Meerlo et al., 1996; Razzoli et al., 2010). Entretanto, a esquiva social é uma das alterações comportamentais mais duradouras induzida por modelos de subjugação social, perdurando por até três semanas após o fim do estresse, ao contrário da anedonia (Krishnan et al., 2007).

Neste trabalho, nós avaliamos também comportamentos relacionados à ansiedade, usando o teste do LCE. Os animais subjugados de uma das séries experimentais apresentaram comportamentos relacionados à ansiedade, porém esses resultados não foram observados nas outras séries. Dessa forma, sugerimos

que os comportamentos de esquiva social dos animais subjugados possam estar dissociados de um componente ansioso generalizado e estar mais relacionados a um medo específico, de natureza social, associado aos episódios de agressão durante os pareamentos na subjugação social. Entretanto, vale ressaltar o estudo de Belzung e colaboradores (1994) em camundongos, o qual mostrou que diferentes medidas de ansiedade (como por exemplo, no LCE, na interação social, no conflito de Vogel, na exploração claro-escuro e em outros testes) se correlacionam muito pouco entre si, indicando que diferentes testes abordam diferentes facetas da ansiedade.

Curiosamente, a análise comportamental dos animais suscetíveis e resilientes aos efeitos anedônicos mostrou que a anedonia não está associada aos comportamentos relacionados à esquiva social e ansiedade em nosso modelo. Ambos os grupos resiliente e suscetível apresentaram redução na interação social e não necessariamente apresentaram ansiedade no teste do LCE. Por outro lado, Krishnan e colaboradores (2007), usando o mesmo modelo de subjugação social usado em nosso experimento, porém em camundongos adultos, observaram que o mesmo subgrupo de animais subjugados que apresentam anedonia também exibiam comportamentos de esquiva social, enquanto que o grupo não-anedônico não exibiu esquiva social, sugerindo uma associação entre estes comportamentos. Em nosso trabalho, entretanto, não observamos a mesma associação entre estes comportamentos, o que parece sugerir que camundongos adolescentes apresentam peculiaridades comportamentais quando comparados a camundongos adultos.

Apesar destas alterações comportamentais induzidas pelo estresse prolongado, não observamos diferença nas concentrações séricas de corticosterona nos camundongos subjugados em relação aos controles, e nem quando os separamos em suscetíveis e resilientes. Em muitos modelos animais de estresse crônico é possível observar uma habituação a um mesmo estressor (estresse homotípico), através de níveis de corticosterona inalterados, como reportado em estudos usando estresse por imobilização forçada (Hauger et al., 1990), frio (Bhatnagar et al., 1995), barulho (Armario et al., 1986), manuseio repetido (Dobrákovova et al., 1993) e subjugação social (Berton et al., 2006; Pereira-Junior e Chiavegatto, 2008; Amaral e Chiavegatto, 2012). Todavia, frente a um estresse

agudo, os animais que passaram pelo estresse crônico exibem elevação exacerbada de corticosterona, evidenciando que o estresse crônico gera uma resposta alterada ao estresse agudo (Berton et al., 2006; Iñiguez et al., 2014).

Os animais subjugados na série 2 apresentaram menor ganho de peso em relação aos animais controles. Esses dados estão de acordo com outros trabalhos envolvendo estresse por subjugação social em camundongos (Kudryavtseva et al., 1991) e ratos (Albonetti e Farabollini., 1994) adultos, apesar de alguns trabalhos mostrarem o contrário (Moles et al., 2006; Razzoli et al., 2010). Os animais subjugados (e quando separados em suscetíveis e resilientes) das demais séries experimentais não apresentaram redução do ganho de peso.

Durante a execução do nosso projeto, os primeiros trabalhos utilizando o modelo de subjugação social em camundongos machos adolescentes foram publicados por laboratórios diferentes (Huang et al., 2013; Iñiguez et al., 2014; Kovalenko et al., 2014). Nossos achados de que o estresse crônico social pode induzir a comportamentos do tipo depressivos são corroborados por esses estudos. Entretanto, algumas diferenças experimentais devem ser mencionadas.

Huang e colaboradores (2013) usaram o mesmo protocolo de subjugação social por 10 dias (porém com 10 minutos de contato físico com o agressor) em camundongos C57BL/6J com aproximadamente 6 semanas de idade (42 dias), sendo que os testes comportamentais somente foram executados 10 dias após o término dos pareamentos. Nesse trabalho, os animais também foram separados em suscetíveis e resilientes, porém esta separação ocorreu de acordo com o tempo de interação social. Os animais suscetíveis à esquia social também apresentaram maior imobilidade no teste de nado forçado (NF), enquanto que os animais resilientes à esquia se comportaram igual aos do grupo controle. O teste de PPS não foi usado para avaliar a presença de déficit hedônico neste estudo. Importante ressaltar que 21,3% dos camundongos adolescentes (44 animais no total) morreram ao longo deste experimento, provavelmente pela intensidade e duração do estresse aplicado. Isto mostra, possivelmente, que este modelo gerou um estresse muito mais forte, mais relacionado à agressão física, do que em nosso modelo, que priorizou mais o estresse psicológico, na forma de subjugação social.

Iñiguez e colaboradores (2014) utilizaram o mesmo protocolo de subjugação social que em nosso estudo, em camundongos C57BL/6 com 35 dias de idade. Os

camundongos subjugados apresentaram comportamentos do tipo depressivo, avaliados no PPS e NF, esquiva social no teste de interação social e ansiedade no teste de LCE. Entretanto, não houve a separação do grupo subjugado em resiliente ou suscetível. Adicionalmente, o teste de PPS não envolveu um treinamento apropriado de adaptação dos camundongos ao consumo de solução de sacarose, essencial para evitar artefatos na coleta dos dados (Strekalova e Steinbusch, 2010).

Kovalenko e colaboradores (2014) utilizaram um modelo de subjugação social por 14 dias em camundongos C57BL/6 com 28 dias de idade, e os animais subjugados apresentaram comportamentos do tipo depressivo no teste de NF e do tipo ansioso no teste de LCE. Neste trabalho também não houve a separação do grupo subjugado em suscetível e resiliente.

As principais diferenças presentes no nosso trabalho em relação aos trabalhos acima mencionados foram:

- a resiliência e a suscetibilidade ao estresse foram definidas a partir do teste de PPS, que possui uma boa validade farmacológica e representa de maneira mais etológica um dos sintomas principais do transtorno depressivo em humanos, a anedonia;
- dissociação entre comportamentos anedônicos e de esquiva social;
- ausência de comportamentos relacionados à ansiedade generalizada.

Nossa segunda abordagem neste projeto foi analisar o efeito da subjugação prolongada sobre a expressão gênica e proteica do BDNF e suas isoformas. Não observamos alterações no nível de nenhum dos transcritos analisados no córtex pré-frontal e no hipocampo entre os grupos controle, suscetível e resiliente. Entretanto, observamos uma redução de 49% no transcrito *Bdnf4* no estriado dorsal do grupo suscetível quando comparado ao grupo resiliente.

Como dito anteriormente, os transcritos *Bdnf1* e *Bdnf4* se localizam majoritariamente no corpo celular e na porção proximal dos dendritos. O transcrito *Bdnf1* apresentou o mesmo padrão de diferença de expressão que o transcrito *Bdnf4* no estriado, porém sem atingir significância estatística. Baj e colaboradores (2011), estudando cultura de células hipocâmpais, reportaram que a superexpressão das isoformas *Bdnf1* e *Bdnf4* aumentava a proteína BDNF no corpo celular, e na porção proximal dos dendritos, enquanto que a superexpressão das isoformas *Bdnf2C* e *Bdnf5* aumentava a proteína BDNF na parte distal dos dendritos,

sugerindo haver tradução local dos transcritos. Concomitantemente ao aumento local da proteína BDNF, foi observado também aumento local de TrkB fosforilado.

Adicionalmente, Sakata e colaboradores (2010) inseriram códons de parada no éxon IV do *Bdnf* de camundongos, consequentemente impedindo a tradução do transcrito *Bdnf4* em proteína. Estes animais apresentaram comportamentos do tipo depressivo nos testes de PPS, NF e suspensão pela cauda (Gulyás et al., 1999; Megías et al., 2001), sugerindo uma relação entre a ausência do transcrito *Bdnf4* e comportamentos do tipo depressivo. Esta hipótese corrobora nossos resultados referentes à diminuição do transcrito *Bdnf4* no estriado dorsal dos animais suscetíveis.

Terminações gabaérgicas, monoaminérgicas e glutamatérgicas formam contatos espacialmente segregados no corpo celular e regiões proximais dos dendritos, ou em regiões distais, de maneira diferenciada, porém complementares. Dessa forma, a diferença de expressão do transcrito *Bdnf4*, observada entre o grupo resiliente e suscetível em nosso modelo, poderia levar a diferenças nas alterações plásticas locais (na região proximal dos dendritos), e assim ativar e reforçar circuitos neurais específicos que poderiam estar ligados à resiliência ou à suscetibilidade a comportamentos do tipo depressivo causados pelo estresse crônico.

Outro resultado interessante de nosso trabalho foi a detecção da expressão dos transcritos *Bdnf1*, *2b*, *2c* e *3* no estriado dorsal, os quais não foram encontrados em camundongos adultos nos estudos anteriores (Liu et al., 2006; Aid et al., 2007), sugerindo que a expressão destes transcritos no estriado dorsal é maior durante a adolescência, e se reduzem, ou mesmo deixam de ser expressos na vida adulta.

A quantificação proteica não indicou diferenças significantes na expressão do BDNF e suas isoformas no córtex pré-frontal e no hipocampo dos camundongos suscetíveis em relação aos controles, apesar de uma tendência ao aumento de BDNF maduro no hipocampo. Estes dados confirmam os resultados da expressão gênica. Muitos estudos mostram essas áreas sendo sensíveis ao estresse crônico (incluindo estresse crônico psicossocial) e alterações de BDNF, tanto da proteína quanto de seus transcritos. Essas alterações parecem estar relacionadas às mudanças plásticas, como atrofia dos dendritos e diminuição da neurogênese no hipocampo. Uma possível explicação para os nossos resultados seria devido ao cérebro do camundongo adolescente ainda estar em maturação. Além disto, sabe-se

que o comportamento frente a situações aversivas pode ser diferente no animal adolescente comparado ao animal adulto, inferindo em diferenças nos mecanismos moleculares envolvidos nas estratégias de enfrentamento (*coping behavior*), reações neuroendócrinas ao estresse e adaptação ao estresse crônico. De fato, o cérebro de um animal adolescente parece reagir de maneira diferente. Um estudo comparando o estresse físico crônico em ratos adolescentes e adultos relatou redução proteica de BDNF no hipocampo dos adultos e, de maneira oposta, aumento nos adolescentes, concomitante com o aumento da neurogênese, sugerindo que alterações moleculares diferentes podem ser desencadeadas por um mesmo tipo de estressor e ainda serem idade-específicas (Toth et al., 2008). De maneira complementar, a expressão de BDNF é fortemente regulada ao longo do começo da adolescência à fase adulta (Timmusk et al., 1994), e talvez o estresse, ocorrendo neste período, não consiga alterar a expressão do BDNF no córtex pré-frontal e hipocampo nesta fase do desenvolvimento.

Nossos dados também mostraram uma redução proteica do BDNF total e trBDNF no estriado dorsal. Alguns estudos mostram a importância da sinalização do BDNF no estriado dorsal nos mecanismos de recompensa em consumo de cocaína e álcool (Jeanblanc et al., 2009; Im et al., 2010), porém estudos relacionando a sinalização de BDNF no estriado e depressão ainda são escassos. Evidências convergentes têm mostrado distúrbios nos circuitos mesolímbicos estriatais que participam do processo de recompensa em pacientes com depressão, e que talvez estes circuitos sejam os principais moduladores da anedonia (Der-Avakian et al., 2012). Um estudo por Berton e colaboradores (2006) mostrou que o aumento da proteína BDNF no NAc está associado a comportamentos do tipo depressivo, e que sua depleção na via VTA para o NAc teve efeito antidepressivo ou protetor sobre o estresse crônico psicossocial.

A função da porção dorsal do estriado na depressão, entretanto, ainda foi pouco investigada, o que torna este trabalho ainda mais relevante. Estudos recentes de neuro-imagem mostraram aumento da conectividade intrínseca funcional entre o estriado dorsal e córtex pré-frontal em adolescentes com depressão (Gabbay et al., 2013) e diminuição em adultos (Hamilton et al., 2012). Poucos trabalhos envolvendo modelos animais de depressão e o estriado dorsal foram reportados até o momento, porém, nenhum deles estudou especificamente o BDNF. Podemos citar os trabalhos

de Furay e colaboradores (2011) mostrando aumento de receptores 5-HT_{1B} em regiões dorso-laterais do estriado em camundongos submetidos a estresse psicossocial crônico, e um trabalho de Strong e colaboradores (2011) mostrando o efeito protetor de um antagonista 5-HT_{2C} injetado diretamente no estriado dorsal sobre o estresse crônico imprevisível.

De uma maneira geral, usando um modelo de subjugação social prolongada em camundongos machos adolescentes, fomos capazes de induzir alterações comportamentais observadas analogamente em pacientes com depressão, como anedonia e esquiva social, reforçando a validade deste modelo no estudo da neurobiologia da depressão. Observamos algumas diferenças comportamentais comparados aos achados da literatura em camundongos adultos, como por exemplo, a dissociação entre comportamentos anedônicos e de esquiva social. Também identificamos alterações, ainda não descritas, na expressão gênica e proteica do BDNF no estriado dorsal, uma área cerebral que está começando a ser associada aos transtornos depressivos.

6 CONCLUSÃO

O presente trabalho, usando o modelo de subjugação social prolongado em camundongos C57BL/6 adolescentes, induziu alterações emocionais associadas a comportamentos do tipo depressivo e esquiva social. Mostramos que não há uma associação entre a anedonia e esquiva social necessariamente, ao contrário de alguns estudos na literatura envolvendo camundongos adultos e, mais recentemente, estudos com animais adolescentes. Adicionalmente, a alta variabilidade comportamental observada nos testes realizados nos permitiu identificar animais suscetíveis e resilientes aos efeitos anedônicos do estresse psicossocial prolongado e assim estudar as alterações biomoleculares nos animais suscetíveis e resilientes.

Através das análises moleculares, observamos uma diminuição do transcrito 4 do gene *Bdnf* no grupo suscetível em relação ao grupo resiliente, mostrando alterações de expressão gênica diferentes entre os grupos, e que podem estar associadas à resiliência e/ou à suscetibilidade aos efeitos do estresse crônico. Também detectamos uma redução proteica de BDNF total e truncado no estriado dorsal de animais suscetíveis ao efeito do estresse psicossocial. Estas alterações na expressão gênica e proteica sugerem o envolvimento do BDNF no estriado dorsal com comportamentos do tipo depressivo.

Este trabalho contribui para o meio científico por ser um dos primeiros a mostrar o efeito da subjugação social prolongada em camundongos adolescentes e o primeiro a identificar alterações, ainda não descritas na literatura, na expressão gênica e proteica do BDNF no estriado dorsal, uma área até então pouco relacionada à depressão.

REFERÊNCIAS[‡]

- Adlard P, Perreau VM, Engesser-Cesar C, Cotman CW. The timecourse of induction of brain-derived neurotrophic factor mRNA and protein in the rat hippocampus following voluntary exercise. *Neurosci Lett*. 2004;363:43-8.
- Aid T, Kazantseva A, Piirsoo M, Palm K, Timmusk T. Mouse and rat BDNF gene structure and expression revisited. *J Neurosci Res*. 2007;85(3):525-35.
- Albonetti ME, Farabollini F. Social stress by repeated defeat: effects on social behavior and emotionality. *Behav Brain Res*. 1994;62(2):187-93.
- Alonso M, Vianna MR, Izquierdo I, Medina JH. Signaling mechanisms mediating BDNF modulation of memory formation in vivo in the hippocampus. *Cell Mol Neurobiol*. 2002;22:663-74.
- Almeida RD, Manadas BJ, Melo CV, Gomes JR, Mendes CS, Graos MM, Carvalho RF, Carvalho AP, Duarte CB. Neuroprotection by BDNF against glutamate-induced apoptotic cell death is mediated by ERK and PI3-kinase pathways. *Cell Death Differ*. 2005;12:1329-43.
- Amaral C, Chiavegatto S. Estudo do fator de transcrição Max no hipocampo de camundongos adolescentes submetidos a um modelo de submissão social prolongada. Dissertação de Mestrado, 2012. Departamento de Farmacologia. Universidade de São Paulo, Brasil.
- Andersen SL, Thompson AT, Rutstein M, Hostetter JC, Teicher MH. Dopamine receptor pruning in prefrontal cortex during the periadolescent period in rats. *Synapse*. 2000;37:167-9.
- Andersen SL. Trajectories of brain development: point of vulnerability or window of opportunity?. *Neurosci Biobehav Rev*. 2003;27(1-2):3-18.
- Andersen SL, Tomada A, Vincow ES, Valente E, Polcari A, Teicher MH. Preliminary evidence for sensitive periods in the effect of childhood sexual abuse on regional brain development. *J Neuropsychiatry Clin Neurosci*. 2008;20(3):292-301.
- Armario A, Lopez-Calderon A, Jolin T, Balasch J. Response of anterior pituitary hormones to chronic stress. The specificity of adaptation. *Neurosci Behav Rev*. 1986;10:245-50.
- Baj G, Leone E, Chao MV, Tongiorgi E. Spatial segregation of BDNF transcripts enables BDNF to differentially shape distinct dendritic compartments. *Proc Natl Acad Sci*. 2011;108:16813-8.

[‡] De acordo com:

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

Barde YA, Edgar D, Thoenen H. Purification of a new neurotrophic factor from mammalian brain. *EMBO J*. 1982;1(5):549–53.

Barrientos R, Sprunger DB, Campeau S, Higgins EA, Watkins LR, Rudy JW et al. Brain-derived neurotrophic factor mRNA downregulation induced by social isolation is blocked by intrahippocampal interleukin-1 receptor antagonist. *Neuroscience*. 2003;121(4):847–53.

Belzung C, Le Pape G. Comparison of different behavioural test situations used in psychopharmacology for measurement of anxiety. *Physiol Behav*. 1994;56:623–8.

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

Bibancos T, Jardim DL, Aneas I, Chiavegatto S. Social isolation and expression of serotonergic neurotransmission-related genes in several brain areas of male mice. *Genes Brain Behav*. 2007;6(6):29–39.

Bhatnagar S, Meaney MJ. Hypothalamic-pituitary-adrenal function in chronic intermittently cold-stressed neonatally handled and non-handled rats. *J Neuroendocrinol*. 1995;7:97–108.

Blakemore SJ. The social brain in adolescence. *Nat Rev Neurosci*. 2008;9:267–77.

Bögels SM, Alden L, Beidel DC, Clark LA, Pine DS, Stein MB, Voncken M. Social anxiety disorder: questions and answers for the DSM-V. *Depress Anxiety*. 2010;27:168–89.

Bourke CH e Neigh GN. Behavioral effects of chronic adolescent stress are sustained and sexually dimorphic. *Horm Behav*. 2011;60(1):112–20.

Brown GW, Harris T. Social origins of depression: a reply. *Psychological Medicine*. 1978;8(4):577–88.

Buwalda B, Geerdink M, Vidal J, Koolhaas JM. Social behavior and social stress in adolescence: a focus on animal models. *Neurosci Biobehav Rev*. 2011;35(8):1713–21.

Carlino D, Leone E, Colab FD, Bajb G, Marina R, Dinellia G, Tongiorgib E, Vannaa MD. Low serum truncated-BDNF isoform correlates with higher cognitive impairment in schizophrenia. *J Psychiat Res*. 2010;45(2):273–9.

Charney, D.S. Psychobiological mechanisms of resilience and vulnerability: implications for successful adaptation to extreme stress. *Am. J. Psychiatry*. 2004;161:195–216.

Chiaruttini C, Vicario A, Lib Z, Baj G, Braiuca P, Wu Y, Lee FS, Gardossi L, Baraban JM, Tongiorgi E. Dendritic trafficking of BDNF mRNA is mediated by translin and blocked by the G196A (Val66Met) mutation. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2009;106:16481.

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

Chiavegatto S. Metodologia em modelos animais. In: Miguel EC, Gentil V, Gattaz WF, organizadores. *Clínica psiquiátrica*. Barueri, SP: Manole; 2011. v. 2, p. 2080-8.

Chrousos GP, Gold PW. The concepts of stress and stress system disorders: Overview of physical and behavioral homeostasis. *JAMA*. 1992;267:1244–52.

Clerici M, Trabattoni D, Piconi S, Fusi ML, Ruzzante S, Clerici C, Villa ML. A possible role for the cortisol/anticortisol imbalance in the progression of human immunodeficiency virus. *Psychoneuroendocrinology*. 1997;22(1):S27–S31.

Czéh B, Welt T, Fischer AK, Erhardt A, Schmitt W, Müller MB, Toschi N, Fuchs E, Keck ME. Chronic psychosocial stress and concomitant repetitive transcranial magnetic stimulation: effects on stress hormone levels and adult hippocampal neurogenesis. *Biol Psychiatry*. 2002;52(11):1057-65.

Der-Avakian A, Markou A. The neurobiology of anhedonia and other reward-related deficits. *Trends Neurosci*. 2012;35:68-77.

Dias BG, Banerjee SB, Duman RS, Vaidya VA. Differential regulation of brain derived neurotrophic factor transcripts by antidepressant treatments in the adult rat brain. *Neuropharmacology*. 2003;45(4):553-63.

Dobráková M, Kvetnansky R, Oprsalova Z, Jezova D. Specificity of the effect of repeated handling on sympathetic-adrenomedullary and pituitary-adrenocortical activity in rats. *Psychoneuroendocrinology*. 1993;3:163–74.

Duman RS, Monteggia LM. A Neurotrophic Model for Stress-Related Mood Disorders. *Biol Psychiatry*. 2006;59(12):1116-27.

Duvarci S, Pare D. Glucocorticoids enhance the excitability of principal basolateral amygdala neurons. *J Neurosci*. 2007;27:4482–91.

Dwivedi Y, Rizavi HS, Conley RR, Roberts RC, Tamminga CA, Pandey GN. Altered gene expression of brain-derived neurotrophic factor and receptor tyrosine kinase B in postmortem brain of suicide subjects. *Arch Gen Psychiatry*. 2003;60(8):804-15.

Emmert MH, Herman J P. Differential forebrain c-fos mRNA induction by ether inhalation and novelty: Evidence for distinctive stress pathways. *Brain Res*. 1999;845(1):60–7.

Evans DL, Charney DS, Lewis L, et al. Mood disorders in the medically ill: scientific review and recommendations. *Biol Psychiatry*. 2005;58:175–89.

Fanous S, Hammer RPJ, Nikulina EM. Short- and long-term effects of intermittent social defeat stress on brain-derived neurotrophic factor expression in mesocorticolimbic brain regions. *Neuroscience*. 2010;167(3):598-607.

Farmer AE, McGuffin P. Humiliation, loss and other types of life events and difficulties: a comparison of depressed subjects, healthy controls and their siblings. *Psychological Medicine*. 2003;33(7):1169–75.

Frodl T, Meisenzahl EM, Zetzsche T, Born C, Jäger M, Groll C, Bottlender R, Leinsinger G, Möller HJ. Larger amygdala volumes in first depressive episode as compared to recurrent major depression and healthy control subjects. *Biol Psychiatry*. 2003;53(4):338–44.

Furay AR, McDevitt RA, Miczek KA, Neumaier JF. 5-HT_{1B} mRNA expression after chronic social stress. *Behav Brain Res*. 2011;224(2):350–7.

Gabbay V, Ely BA, Li Q, Bangaru SD, Panzer AM, Alonso CM, Castellanos FX, Milham MP. Striatum-Based Circuitry of Adolescent Depression and Anhedonia. *Journal of the American Academy of Child & Adolescent Psychiatry*. 2013;52(6):628–41.

Garrett JE, Wellman CL. Chronic stress effects on dendritic morphology in medial prefrontal cortex: sex differences and estrogen dependence. *Neuroscience*. 2009;162(1):195–207.

Giedd JN. Structural magnetic resonance imaging of the adolescent brain. *Acad. Sci*. 2004;1021:77–85.

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

Gould E, Tanapat P, McEwen BS, Flugge G, Fuchs E. Proliferation of granule cell precursors in the dentate gyrus of adult monkeys is diminished by stress. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1998;95:3168–71.

Gourley SL, Wu FJ, Kiraly DD, Ploski JE, Kedves AT, Duman RS, Taylor JR. Regionally specific regulation of ERK MAP kinase in a model of antidepressant-sensitive chronic depression. *Biol. Psychiatry*. 2008;63:353–9.

Gulyás AI, Megías M, Emri Z, Freund TF. Total number and ratio of excitatory and inhibitory synapses converging onto single interneurons of different types in the CA1 area of the rat hippocampus. *J Neurosci*. 1999;19:10082–97.

Hallböök F, Ibáñez CF, Persson H. Evolutionary studies of the nerve growth factor family reveal a novel member abundantly expressed in *Xenopus* ovary. *Neuron*. 1991;6(5):845–58.

Hamilton JP, Etkin A, Furman DJ, Lemus MG, Johnson RF, Gotlib IH. Functional neuroimaging of major depressive disorder: a meta-analysis and new integration of baseline activation and neural response data. *Am J Psychiatry*. 2012;169(7):693–703.

Hauger RL, Lorang M, Irwin M, Aguilera G. CRF receptor regulation and sensitization of ACTH responses to acute ether stress during chronic intermittent immobilization stress. *Brain Res*. 1990;532:34–40.

Herman JP, Cullinan WE. Neurocircuitry of stress: central control of the hypothalamo-pituitary-adrenocortical axis. *Trends Neurosci*. 1997;20:78–84

Holsboer F. The corticosteroid receptor hypothesis of depression. *Neuropsychopharmacology*. 2000;23(5):477-501.

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

Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE). Brasil. Ministério do Planejamento, Orçamento e Gestão. Pesquisa Nacional de Saúde do escolar. Rio de Janeiro; 2012. p. 70-1.

Im HI, Hollander JA, Bali P, Kenny PJ. MeCP2 controls BDNF expression and cocaine intake through homeostatic interactions with microRNA-212. *Nat Neurosci*. 2010;13(9):1120-7.

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

Jacobson L, Sapolsky R. The role of the hippocampus in feedback regulation of the hypothalamic-pituitary-adrenocortical axis. *Endocrine Reviews*. 1991;12:118–34.

Jeanblanc J, He DY, Carnicella S, Kharazia V, Janak PH, Ron D. Endogenous BDNF in the dorsolateral striatum gates alcohol drinking. *J Neurosci*. 2009;29:13494–502.

Kant GH, Bunnell BN, Mougey EH, Pennington LL, Meyerhoff JL. Effects of repeated stress on pituitary cyclic AMP, and plasma prolactin, corticosterone and growth hormone in male rats. *Pharmacol Biochem Behav*. 1983;18:967–71.

Karege F, Perret H, Bondolfi G, Schwald M, Bertschv G, Aubrey JM. Decreased serum brain-derived neurotrophic factor levels in major depressed patients. *Psychol Res*. 2002;109:143–8.

Karege F, Vaudan G, Schwald M, Perroud N, La Harpe R. Neurotrophin levels in postmortem brains of suicide victims and the effects of antemortem diagnosis and psychotropic drugs. *Brain Res Mol Brain Res*. 2005;136:29–37.

Kendler KS, Karkowski LM, Prescott CA. Causal relationship between stressful life events and the onset of major depression. *Am J Psychiatry*. 1999;156:837–841.

Kessler RC, McGonagle KA, Zhao S, Nelson CB, Hughes M, Eshleman S, Wittchen HU, Klender KS. Lifetime and 12-Month prevalence of DSM-III-R psychiatric disorders in the United States: results from the National Comorbidity Survey. *Arch Gen Psychiatry*. 1994;51(1):8-9.

Kessler RC, Berglund P, Demler O, Jin R, Koretz D, Merikangas KR, Rush AJ, Walters EE, Wang PS. The epidemiology of major depressive disorder: results from the National Comorbidity Survey Replication (NCS-R). *JAMA*. 2003;289(23):3095-105.

Knol MJ, Twisk JWR, Beekman ATF, Heine RJ, Snoek FJ, Pouwer F. Depression as a risk factor for the onset of type 2 diabetes mellitus. A meta-analysis. *Diabetologia*. 2006;49:837–45.

Kovalenko IL, Galyamina AG, Smagin DA, Michurina TV, Kudryavtseva NN, Enikolopov G. Extended Effect of Chronic Social Defeat Stress in Childhood on Behaviors in Adulthood. *PLoS One*. 2014;9(3):91762.

Krishnan KR, Ritchie JC, Manepalli AN, Wilson WH, Saunders WB, Venkataraman SS, Carroll BJ. Role of serotonin in hypothalamo pituitary adrenal axis escape from dexamethasone suppression. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*. 1991;15(5):637-42.

Krishnan V, Han MH, Graham DL, Berton O, Renthal W, Russo SJ, Laplant Q, Graham A, Lutter M, Lagace DC, Ghose S, Reister R, Tannous P, Green TA, Neve RL, Chakravarty S, Kumar A, Eisch AJ, Self DW, Lee FS, Tamminga CA, Cooper DC, Gershenfeld HK, Nestler EJ. Molecular adaptations underlying susceptibility and resistance to social defeat in brain reward regions. *Cell*. 2007;131(2):391-404.

Krishnan V, Nestler EJ. Animal models of depression: molecular perspectives. *Curr Top Behav Neurosci*. 2011;7:121-47.

Kudryavtseva NN, Bakshtanovskaya IV, Koryakina LA. Social model of depression in mice of C57BL/6J strain. *Pharmacol Biochem Behav*. 1991;38:315–20.

Kuroda Y e McEwen BS. Effect of chronic restraint stress and tianeptine on growth factors, growth-associated protein-43 and microtubule-associated protein 2 mRNA expression in the rat hippocampus. *Brain Res Mol Brain Res*. 1998;59:35–9.

Larsson E, Nanobashvili A, Kokaia Z, Lindvall O. Evidence for Neuroprotective Effects of Endogenous Brain-Derived Neurotrophic Factor After Global Forebrain Ischemia in Rats. *Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism*. 1999;19:1220–28.

Lau AG, Irier HA, Gub J, Tian D, Ku L, Liu G, Xia M, Fritsch B, Zheng JQ, Dingledin R, Xu B, Feng Y. Distinct 3'UTRs differentially regulate activity dependent translation of brain-derived neurotrophic factor (BDNF). *Proc Natl Acad Sci USA*. 2010;107(36):15945-50.

Lee R, Kermani P, Teng KK, Hempstead BL. Regulation of cell survival by secreted proneurotrophins. *Science*. 2001;294(5548):1945-8.

Li N, He X, Qi X, Zhang Y, He S. The mood stabilizer lamotrigine produces antidepressant behavioral effects in rats: role of brain-derived neurotrophic factor. *J Psychopharmacol*. 2010;24(12):1772-8.

Lister RG. The use of a plus-maze to measure anxiety in the mouse. *Psychopharmacology*. 1987;92:180-5.

Liu QR, Walther D, Drgon T, Polesskaya O, Lesnick TG, Strain KJ, de Andrade M, Maraganore DM, Uhl GR. Human brain derived neurotrophic factor (BDNF) genes, splicing patterns, and assessments of associations with substance abuse and Parkinson's disease. *Am J Med Genet Part B Neuropsychiatr Genet*. 2005;134:93–103.

Liu QR, Lu L, Zhua XG, Gonga JP, Shahamb Y, Uhla GR. Rodent BDNF genes, novel promoters, novel splice variants, and regulation by cocaine. *Brain Res.* 2006;1067:1–12.

Liu RJ, Aghajanian GK. Stress blunts serotonin- and hypocretin-evoked EPSCs in prefrontal cortex: Role of corticosterone-mediated apical dendritic atrophy. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2008;105:359–64.

Lucassen PJ, Stumpel MW, Wang Q, Aronica E. Decreased numbers of progenitor cells but no response to antidepressant drugs in the hippocampus of elderly depressed patients. *Neuropharmacology.* 2010;58:940–9.

Malberg J, Eisch AJ, Nestler EJ, Duman RS. Chronic antidepressant treatment increases neurogenesis in adult hippocampus. *J Neurosci.* 2000;20:9104–10.

Malberg JE, Duman RS. Cell proliferation in adult hippocampus is decreased by inescapable stress: reversal by fluoxetine treatment. *Neuropsychopharmacology.* 2003;28(9):1562–71.

Mattson MP, Lovell MA, Furukawa K, Markesbery WR. Neurotrophic factors attenuate glutamate-induced accumulation of peroxides, elevation of intracellular Ca²⁺ concentration, and neurotoxicity and increase antioxidant enzyme activities in hippocampal neurons. *J Neurochem.* 1995;65:1740–51.

Megías M, Emri Z, Freund TF, Gulyás AI. Total number and distribution of inhibitory and excitatory synapses on hippocampal CA1 pyramidal cells. *Neuroscience.* 2001;102:527–540.

McAllister AK, Lo DC, Katz LC. Neurotrophins regulate dendritic growth in developing visual cortex. *Neuron.* 1995;15:791–803.

McAllister AK, Katz LC, Lo DC. Neurotrophin regulation of cortical dendritic growth requires activity. *Neuron.* 1996;17:1057–64.

McEwen BS. Stress, adaptation, and disease: allostasis and allostatic load. *Ann N Y Acad Sci.* 1998;840:33–44.

McEwen BS. Stress, sex, and neural adaptation to a changing environment: mechanisms of neuronal remodeling. *Ann NY Acad Sci.* 2010;1204:E38–E59.

Meerlo P, Overkamp GJ, Daan S, Van Den Hoofdakker RH, Koolhaas JM. Changes in behaviour and body weight following a single or double social defeat in rats. *Stress.* 1996;1:21–32.

Mineur YS, Belzung C, Crusio WE. Functional implications of decreases in neurogenesis following chronic mild stress in mice. *Neuroscience.* 2007;150:251–9.

Mizoguchi K, Ishige A, Aburada M, Tabira T. Chronic stress attenuates glucocorticoid negative feedback: involvement of the prefrontal cortex and hippocampus. *Neuroscience.* 2003;119(3):887–97.

Moffitt TE, Harrington H, Caspi A, et al. Depression and generalized anxiety disorder: cumulative and sequential comorbidity in a birth cohort followed prospectively to age 32 years. *Arch Gen Psychiatry*. 2007;64(6):651-60.

Moles A, Bartolomucci A, Garbugino L, Conti R, Caprioli A, Coccorello R, Rizzi R, Ciani B, D'Amato FR. Psychosocial stress affects energy balance in mice: modulation by social status. *Psychoneuroendocrinology*. 2006;31(5):623–33

Moreno RA, Moreno DH, Demétrio FN. Psicofarmacologia em psiquiatria: antidepressivos. In: Miguel EC, Geltil V, Gattaz WF, organizadores. *Clínica psiquiátrica*. Barueri, SP: Manole; 2011. v. 2, p. 1158-75.

Mowla SJ, Farhadi HF, Pareek S, Atwal JK, Morris SJ, Seidah NG, Murphy RA. Biosynthesis and post-translational processing of the precursor to brain-derived neurotrophic factor. *The Journal of Biological Chemistry*. 2001;276(16):12660-66.

Murray CJL, et al. Disability-adjusted life years (DALYs) for 291 diseases and injuries in 21 regions, 1990–2010: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2010. *Lancet*. 2012;380:2197–223.

Murray F, Smith DW, Hutson PH. Chronic low dose corticosterone exposure decreased hippocampal cell proliferation, volume and induced anxiety and depression like behaviours in mice. *Eur J Pharmacol*. 2008;583:115–27.

Nakao N, Kokaia Z, Odin P, Lindvall O. Protective effects of BDNF and NT-3 but not PDGF against hypoglycemic injury to cultured striatal neurons. *Exp Neurol*. 1995;131:1–10.

Nestler EJ, Hyman SE. Animal models of neuropsychiatric disorders. *Nat Neuro*. 2010;13:1161-9.

Nibuya M, Morinobu S, Duman RS. Regulation of BDNF and TrkB mRNA in rat brain by chronic electroconvulsive seizure and antidepressant drug treatments. *J Neurosci*. 1995;15:7539–47.

Nieto R, Kukuljan M, Silva H. BDNF and schizophrenia: from neurodevelopment to neuronal plasticity, learning, and memory. *Front Psychiatry*. 2013;4:45.

O'Brien JT, Ames D, Schweitzer I, Mastwyk M, Colman P. Enhanced adrenal sensitivity to adrenocorticotrophic hormone (ACTH) is evidence of HPA axis hyperactivity in Alzheimer's disease. *Psychol Med*. 1996;26(1):7-14.

Papakostas GI, Fava M. Does the probability of receiving placebo influence clinical trial outcome? A meta-regression of double-blind, randomized clinical trials in MDD. *Eur Neuropsychopharmacol*. 2009;19(1):34-40.

Pardon MC, Roberts RE, Marsden CA, Bianchi M, Latif ML, Duxon MS, Kendall DA. Social threat and novel cage stress-induced sustained extracellular-regulated kinase1/2 (ERK1/2) phosphorylation but differential modulation of brain-derived neurotrophic factor (BDNF) expression in the hippocampus of NMRI mice. *Neuroscience*. 2005;132(3):561-74.

Paus T, Keshavan M, Giedd JN. Why do many psychiatric disorders emerge during adolescence? *Nat. Rev. Neurosci.* 2008;9:947–57.

Pencea V, Bingaman KD, Wiegand SJ, Luskin MB. Infusion of brain-derived neurotrophic factor into the lateral ventricle of the adult rat leads to new neurons in the parenchyma of the striatum, septum, thalamus, and hypothalamus. *J Neurosci.* 2001;21:6706–17.

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

Persson T, Roos BE. 5-hydroxytryptophan for depression. *The Lancet.* 1967;2:987–8.

Pitman DL, Ottenweller JE, Natelson BH. Effect of stressor intensity on habituation and sensitization of glucocorticoid responses in rats. *Behav Neurosci.* 1990;104:28–36.

Pizarro JM, Lumley LA, Medina W, Robinson CL, Chang WE, Alagappan A, Bah MJ, Dawood MY, Shah JD, Mark B, Kendali N, Smith MA, Saviolakis GA, Meyerhoff JL. Acute social defeat reduces neurotrophin expression in brain cortical and subcortical areas in mice. *Brain Res.* 2004;1025:10–20.

Radley JJ, Rocher AB, Rodriguez A, Ehlenberger DB, Dammann M, McEwen BS, Morrison JH, Wearne SL, Hof PR. Repeated stress alters dendritic spine morphology in the rat medial prefrontal cortex. *J Comp Neurol.* 2008;507:1141–50.

Razzoli M, Carboni L, Andreoli M, Ballottari A, Arban R. Different susceptibility to social defeat stress of BALB/c and C57BL6/J mice. *Behav Brain Res.* 2010;216:100–8.

Roceri M, Hendriks W, Racagni G, Elenbroek BA, Riva MA. Early maternal deprivation reduces the expression of BDNF and NMDA receptor subunits in rat hippocampus. *Mol Psychiatry.* 2002;7:609–16.

Romeo RD, McEwen BS. Stress and the adolescent brain. *Ann N Y Acad Sci.* 2006;1094:202–14.

Rubin RT, Phillips JJ, McCracken JT, Sadow TF. Adrenal gland volume in major depression: relationship to basal and stimulated pituitary-adrenal cortical axis function. *Biol Psychiatry.* 1996;40(2):89–97.

Saarelainen T, Hendolin P, Lucas G, Koponem E, Sairanen M, MacDonald E, Agerman K, Haapasalo A, Nawa H, Aloyz R, Ernfors P, Castrén E. Activation of the TrkB neurotrophin receptor is induced by antidepressant drugs and is required for antidepressant-induced behavioral effects. *J Neurosci.* 2003;23(1):349–57.

Sakata K, Jin L, Jha S. Lack of promoter IV-driven BDNF transcription results in depression-like behavior. *Genes Brain Behav.* 2010;9(7):712–21.

Sapolsky RM, Krey LC, McEwen BS. Stress down-regulates corticosterone receptors in a site-specific manner in the brain. *Endocrinology*. 1984;114(1):287-92.

Sapolsky RM, Krey LC, McEwen BS. Prolonged glucocorticoid exposure reduces hippocampal neuron number: implications for aging. *J Neurosci*. 1985;5:1222-7.

Sartori CR, Vieira AS, Ferrari EM, Langone F, Tongiorgi E, Parada CA. The antidepressive effect of the physical exercise correlates with increased levels of mature BDNF, and proBDNF proteolytic cleavage-related genes, p11 and tPA. *Neuroscience*. 2011;180:9-18.

Schildkraut JJ. The catecholamine hypothesis of affective disorders: A review of the supporting evidence. *Am. J. Psychiatry*. 1965;122:509-22.

Scott LV, Dinan TG. Urinary free cortisol excretion in chronic fatigue syndrome, major depression and in healthy volunteers. *J Affect Disord*. 1998;47(1-3):49-54.

Sebastian C, Burnett S, Blakemore SJ. Development of the self-concept during adolescence. *Trends Cogn Sci*. 2008;12:441-6.

Seidah N G, Mowla S J, Hamelin J, Mamarbachi A M, Benjannet S, Touré B B, Basak A, Munzer J S, Marcinkiewicz J, Zhong M, et al. Mammalian subtilisin/kexin isozyme SKI-1: A widely expressed proprotein convertase with a unique cleavage specificity and cellular localization. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1999;96(4):1321-26.

Shansky RM, Hamo C, Hof PR, McEwen BS, Morrison JH. Stress-induced dendritic remodeling in the prefrontal cortex is circuit specific. *Cereb Cortex*. 2009;19(10):2479-84.

Shimizu E, Hashimoto K, Odamura N, Koike K, Komatsu N, Kumakiri C, Nakazato M, Watanabe H, Shinoda N, Okada S, Iyo M. Alterations of serum levels of brain-derived neurotrophic factor (BDNF) in depressed patients with or without antidepressants. *Biol Psychiatry*. 2003;54:70-5.

Schinder AF e Poo M. The neurotrophin hypothesis for synaptic plasticity. *Trends Neurosci*. 2000;23(12):639-45.

Siuciaka JA, Lewis DR, Wiegand SJ, Lindsay RM. Antidepressant-Like Effect of Brain-derived Neurotrophic Factor (BDNF). 1997. *Pharmacol Biochem Behav*. 1997;56(1):131-7.

Sheline YI, Wang PW, Gado MH, Csernansky JG, Vannier MW. Hippocampal atrophy in recurrent major depression. *Proc Natl Acad Sci*. 1996;93:3908-13.

Smith MA, Makino S, Kvetnansky R, Post RM. Stress alters the expression of brain-derived neurotrophic factor and neurotrophin-3 mRNAs in the hippocampus. *J Neurosci*. 1995;15:1768-77.

Soppet D, Escandon E, Maragos J, Middlemas DS, Reid SW, Blair J, Burton LE, Stanton BR, Kaplan DR, Hunter T, Nikolics K, Parada LF. The neurotrophic factors brain-derived neurotrophic factor and neurotrophin-3 are ligands for the TrkB tyrosine kinase receptor. *Cell*. 1991;65(5):895-903.

Suzuki M, Hagino H, Nohara S, Zhou SY, Kawasaki Y, Takahashi T, Matsui M, Seto H, Ono T, Kurachi M. Male-specific volume expansion of the human hippocampus during adolescence. *Cerebral Cortex*. 2005;15:187–93.

Sterlemann V, Rammes G, Wolf M, Liebl C, Ganea K, Muller MB, Schmidt MV. Chronic social stress during adolescence induces cognitive. *Hippocampus*. 2010;20:540–9.

Strekalova T, Spanagel R, Bartsch D, Henn FA, Gass P. Stress-induced anhedonia in mice is associated with deficits in forced swimming and exploration. *Neuropsychopharmacology*. 2004;29:2007–2017.

Strekalova T, Steinbusch HWM. Measuring behavior in mice with chronic stress depression paradigm. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*. 2010;34(2):348–361.

Strong PV, Christianson JP, Loughridge AB, Amat J, Maier SF, Fleshner M, Greenwood BN. 5-hydroxytryptamine 2C receptors in the dorsal striatum mediate stress-induced interference with negatively reinforced instrumental escape behavior. *Neuroscience*. 2011;197:132–44.

Tsankova NM, Berton O, Renthal W, Kumar A, Neve RL, Nestler EJ. Sustained hippocampal chromatin regulation in a mouse model of depression and antidepressant action. *Nat Neurosci*. 2006;9(4):519–25.

Teng HK, Teng KK, Lee R, Wright S, Tevar S, Almeida RD, Kermani P, Torkin R, Chen ZY, Lee FS, Kraemer RT, Nykjaer A, Hempstead BL. ProBDNF induces neuronal apoptosis via activation of a receptor complex of p75NTR and sortilin. *J Neurosci*. 2005;25:5455–63.

Timmusk T, Belluardo N, Persson H, Metsis M. Developmental regulation of brain-derived neurotrophic factor messenger RNAs transcribed from different promoters in the rat brain. *Neuroscience*. 1994;60:287–329 .

Trivedi MH, Greer TL, Grannemann BD, Church TS, Galper DI, Sunderrajan P, Wisniewski SR, Chambliss HO, Jordan AN, Finley C, Carmady TJ. TREAD: Treatment with exercise augmentation for depression: study rationale and design. *Clin Trials*. 2006;3:291–305.

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

Toth I, Neumann ID. Animal models of social avoidance and social fear. *Cell Tissue Res*. 2013;354(1):107–18.

Vaidya V, Marek GJ, Aghajanian GA, Duman RS. 5-HT_{2A} receptor-mediated regulation of BDNF mRNA in the hippocampus and the neocortex. *J Neurosci*. 1997;17:2785–95.

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

Venzala E, García-García AL, Elizalde N, Tordera RM. Social vs. environmental stress models of depression from a behavioural and neurochemical approach. *Eur Neuropsychopharmacol.* 2013;23(7):697-708.

Vyas A, Mitra R, Chattarji S. Enhanced anxiety and hypertrophy in basolateral amygdala neurons following chronic stress in rats. *Ann NY Acad Sci.* 2003;985:554-55.

Xu B, Gottschalk W, Chow A, Wilson RI, Schnell E, Zang K, Wang D, Nicoll RA, Lu B, Reichardt LF. The role of brain-derived neurotrophic factor receptors in the mature hippocampus: modulation of long-term potentiation through a presynaptic mechanism involving TrkB. *J Neurosci.* 2000;20:6888-97.

Watanabe Y, Gould E, McEwen BS. Stress induces atrophy of apical dendrites of hippocampal CA3 pyramidal neurons. *Brain Res.* 1992;588:341-5.

Watt MJ, Burke AR, Renner KJ, Forster GL. Adolescent male rats exposed to social defeat exhibit altered anxiety behavior and limbic monoamines as adults. *Behav Neurosci.* 2009;123(3):564-76.

Wilkinson MB, Xiao G, Kumar A, LaPlant Q, Renthal W, Sikder D, Kodadek TJ, Nestler EJ. Imipramine treatment and resiliency exhibit similar chromatin regulation in the mouse nucleus accumbens in depression models. *J Neurosci.* 2009;29(24):7820-32.

Willner P, Muscat R, Papp M. Chronic mild stress-induced anhedonia: a realistic animal model of depression. *Neurosci Biobehav Rev.* 1992;16:525-34.

Willner P. Validity, reliability and utility of the chronic mild stress model of depression: a 10-year review and evaluation. *Psychopharmacology.* 1997;134:319-29.

Willner P. Chronic mild stress (CMS) revisited: consistency and behavioural-neurobiological concordance in the effects of CMS. *Neuropsychobiology.* 2005;52(2):90-110.

Willner P, Scheel-Krüger J, Belzung C. The neurobiology of depression and antidepressant action. *Neurosci Biobehav.* 2012;7634(12):216-23.

Woo NH, Teng HK, Siao CJ, Chiaruttini C, Pang PT, Milner TA, Hempstead BL, Lu B. Activation of p75NTR by proBDNF facilitates hippocampal long-term depression. *Nat Neurosci.* 2005;8:1069-77.

Woolley C, Gould E, McEwen BS. Exposure to excess glucocorticoids alters dendritic morphology of adult hippocampal pyramidal neurons. *Brain Res.* 1990;531:225-31.

APÊNDICE – Dados estatísticos referentes à expressão dos transcritos de BDNF

Tabela A1 – Dados estatísticos referentes à expressão dos diferentes transcritos normalizados pelo grupo controle

Área	Transcrito	ANOVA 1 via		Kruskal-Wallis	
		valor p	valor F	valor p	valor H e gl
Córtex pré-frontal	BDNF total	0,80	$F_{(2,19)} = 0,11$		
	BDNF 1	0,95	$F_{(2,20)} = 0,15$		
	BDNF 2b	0,20	$F_{(2,20)} = 0,10$		
	BDNF 2c	0,98	$F_{(2,19)} = 0,13$		
	BDNF 3			0,37	H= 1,96; gl= 2
	BDNF 4	0,58	$F_{(2,19)} = 0,22$		
	BDNF 5			0,71	H= 0,67; gl= 2
Hipocampo	BDNF total			0,71	H= 0,68; gl= 2
	BDNF 1	0,73	$F_{(2,16)} = 0,12$		
	BDNF 2b	0,68	$F_{(2,17)} = 0,04$		
	BDNF 2c	0,54	$F_{(2,17)} = 0,37$		
	BDNF 3			0,30	H= 2,37; gl= 2
	BDNF 4			0,20	H= 3,16; gl= 2
	BDNF 5	0,63	$F_{(2,17)} = 0,37$		
Estriado Dorsal	BDNF total			0,19	H= 3,32; gl= 2
	BDNF 1			0,08	H= 5,05; gl= 2
	BDNF 2b	0,88	$F_{(2,18)} = 0,09$		
	BDNF 2c	0,24	$F_{(2,18)} = 0,05$		
	BDNF 3	0,06	$F_{(2,19)} = 0,11$		
	BDNF 4			0,03	H= 7,01; gl= 2
	BDNF 5			0,24	H= 2,81; gl= 2