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

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 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 significante 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.

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 nos 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 (Czéh 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 préfrontal, 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 fator*). 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), neutrofina 3 (NT-3) e neutrofina 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* contêm 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 chipanzés (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 perifericamente 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 hipocampais 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).

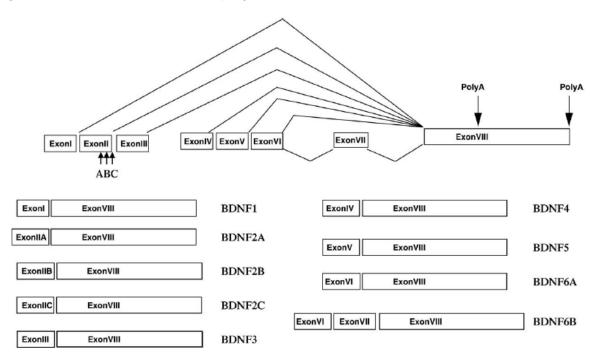


Figura 1 – Diferentes variantes de junção do Bdnf em roedores

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 incialmente 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 p75NTR. 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 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 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 préclínica (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 crônico alterações estresse mostraram 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 а maioria dos animais anedônicos exibiam que 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 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.

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 anatagonist. 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 psiguiátrica. 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/anticortisols 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.

Dobrakovova 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-HT1B 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. Pesquise 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 brainderived 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, Coccurello 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 brainderived 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 anxietyand depression like behavioursinmice. 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 susbcortical 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, Ernforz 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 glucocorticold exposure reduces hippocampal neuron number: implications for aging. J Neurosc. 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, Olamura 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, Lewisa DR, Wieganda SJ, Lindsay RM. Antidepressant-Like Effect of Brainderived 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, Kvetnanskv 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-HT2A 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. Cronic 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 glucocortiocids alters dendritic morphology of adult hippocampal pyramidal neurons. Brain Res. 1990;531:225-31.