Pedro Eduardo Nascimento Silva Vasconcelos

Suscetibilidade e resiliência aos efeitos anedônicos da subjugação social prolongada em camundongos machos adolescentes: estudo da expressão cerebral do receptor serotoninérgico 5-HT_6

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
2017

Pedro Eduardo Nascimento Silva Vasconcelos

Suscetibilidade e resiliência aos efeitos anedônicos da subjugação social prolongada em camundongos machos adolescentes: estudo da expressão cerebral do receptor serotoninérgico 5-HT_6

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
2017

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

Ficha Catalográfica elaborada pelo(a) autor(a)

Nascimento Silva Vasconcelos, Pedro Eduardo
Suscetibilidade e resiliência aos efeitos anedônicos da subjugação social prolongada em camundongos machos adolescentes: estudo da expressão cerebral do receptor serotoninérgico 5-HT6 / Pedro Eduardo Nascimento Silva Vasconcelos; orientadora Silvana Chiavegatto. -- São Paulo, 2017.
93 p.

Dissertação (Mestrado)) -- Universidade de São Paulo, Instituto de Ciências Biomédicas.

1. Estresse social. 2. Depressão. 3. Adolescência. 4. Resiliência. 5. Receptor 5-HT6. I. Chiavegatto, Silvana, orientador. II. Título.

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

Candidato(a): Pedro Eduardo Nascimento Silva Vasconcelos

Titulo da Dissertação: **Suscetibilidade e resiliência aos efeitos anedônicos da subjugação social prolongada em camundongos machos adolescentes: estudo da expressão cerebral do receptor serotoninérgico 5-HT_6.**

Orientador: Profa. Dra. Silvana Chiavegatto

A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa da Dissertação de Mestrado, em sessão publica realizada a **...../...../.....**, considerou o(a) candidato(a):

( ) Aprovado(a) ( ) Reprovado(a)

Examinador(a): Assinatura: .....
Nome: .....
Instituição: .....

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 **041** nas fls.**31** do livro **03** para uso de animais em experimentação, sob a responsabilidade do Prof(a) Dr(a) **Silvana Chiavegatto,** Coordenador (a) da Linha de pesquisa "*Suscetibilidade e resiliência aos efeitos anedônicos da subjugação social prolongada em camundongos machos adolescentes: estudo da expressão de componentes do sistema serotoninérgico central*" do qual participam o(s) aluno(s) **Pedro Eduardo Nascimento Silva Vasconcelos, José Fernando Salvador Carrillo, Letícia de Souza Resende,** Iniciação científica **Melissa Ribeiro de Araújo, Fernanda Miki Honda,** 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 **15.04.2015, com validade de 4 anos**.

São Paulo, 17 de abril de 2015.

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

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

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE MEDICINA TROPICAL DE SÃO PAULO
Av. Dr. Enéas de Carvalho Aguiar, 470
CEP 05403-000 - São Paulo - Brasil - e-mail: cpq-imt@usp.br
Telefones: (55) 11-3061-8650, FAX (55) 11-3064-5132

São Paulo, 15 de Maio de 2015

Ilmo(a)
Dr(a). Silvana Chiavegatto
(aos cuidados de Pedro Eduardo Nascimento Silva Vasconcelos)

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/000310A 'Suscetibilidade e resiliência aos efeitos anedônicos da subjugação social prolongada em camundongos machos adolescentes: estudo da expressão de componentes do sistema serotoninérgico central'**, 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).

As seguintes espécies serão utilizadas no projeto:
Camundongo isogênico (120 animais), Camundongo heterogênico (80 animais).

Atenciosamente,

Dr. Expedito José de Albuquerque Luna
Presidente da 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

Primeiramente agradeço a Deus por me acompanhar e me guiar em todos os meus caminhos e nas minhas escolhas.

Aos meus pais, Márcia e Luiz, por todo o apoio dado durante toda a minha vida, afinal sem eles eu jamais teria chegado onde estou hoje.

A minha namorada, Natália, por todo apoio e por toda a paciência durante essa minha jornada rumo ao título de mestre.

A minha orientadora, Professora Dra. Silvana Chiavegatto, inicialmente por ter aceitado me orientar e também por todos os ensinamentos, acadêmicos ou não, que levarei por toda minha vida.

Aos meus amigos de laboratório, José, Letícia, Melissa, Fabiane, Fernanda e Juliana. Que estiveram sempre presentes durante minha trajetória e que foram muito além do que apenas colegas de laboratório. Sem eles essa jornada teria sido infinitamente mais difícil.

A especialista de laboratório Ana Maria P. Campos pelo apoio, suporte, ensinamentos e sobre tudo pelo carinho e pela amizade.

Ao professor Dr. Martin Andreas Metzger por me abrir as portas do seu laboratório e por todo o apoio prestado para a minha formação.

Às bioteristas Sandra, Talita e Andréa pela paciência e apoio, sempre me propiciando as melhores condições possíveis para a realização do meu trabalho.

Às secretárias do Departamento de Farmacologia do Instituto de Ciências Biomédicas, Mônica e Camila, por toda a paciência em auxiliar sempre que me foi necessário.

Ao departamento de Farmacologia e ao Instituto de Ciências Biomédicas pelo apoio e orientações durante meu mestrado.

AGRADECIMENTO A AGÊNCIA DE FOMENTO

Agradeço a Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela bolsa de Mestrado, vinculada ao programa “CAPES - Demanda Social”, vigente de 02/2015 até 02/2017. Pois sem ela todo o trabalho realizado não seria possível.

"Eu nunca falhei: apenas descobri 10.000 maneiras que não funcionam"
Thomas Edison

"Aprender é mudar posturas"
Platão

RESUMO

Vasconcelos PENS. Suscetibilidade e resiliência aos efeitos da subjugação social prolongada em camundongos machos adolescentes: estudo da expressão cerebral do receptor serotoninérgico 5-HT_6. [dissertação (Mestrado em Farmacologia)]. São Paulo: Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo; 2017.

O estresse é um importante fator desencadeador da depressão, em especial na adolescência, que é uma fase onde o cérebro ainda não alcançou seu pleno desenvolvimento. Nesta etapa da vida, estresses de caráter social, como o *bullying*, estão presentes na vida diária dos indivíduos, mas os motivos pelos quais apenas alguns desses indivíduos são acometidos pela depressão, ainda não são claros, e carecem de mais estudos. Sabe-se, que alterações na neurotransmissão serotoninérgica estão relacionadas a inúmeros distúrbios comportamentais e afetivos observados nos transtornos do humor. Estudos sugerem que alterações na expressão do receptor serotoninérgico 5-HT_6 poderiam estar implicadas na cognição, memória e alterações do humor, porém o papel deste receptor na fisiopatologia da depressão permanece inconclusivo. Nesse sentido, o objetivo deste trabalho foi verificar a possível participação de alterações na expressão cerebral do receptor serotoninérgico 5-HT_6, nos fenômenos de resiliência e suscetibilidade aos efeitos negativos do estresse psicossocial prolongado em camundongos machos adolescentes. Nossos dados comportamentais demonstraram a ocorrência de comportamentos anedônicos e de esquiva social em uma parcela dos animais subjugados socialmente (~50-60%), caracterizando o subgrupo dos suscetíveis, enquanto os demais formaram o subgrupo dos resilientes. A expressão gênica do receptor 5-HT_6 estava reduzida no hipotálamo dos animais suscetíveis, mas não nos resilientes. Também ocorreu redução na quantidade de transcritos no estriado em ambos os grupos subjugados. Em relação à localização cerebral do receptor 5-HT_6, neurônios imunorreativos foram observados no núcleo paraventricular do hipotálamo e no tubérculo olfatório, sendo a marcação nesta última região encontrada na cília neuronal. Em conclusão, nossos dados mostraram que o estresse psicossocial induziu comportamentos anedônicos e de esquiva social, em uma parcela dos camundongos machos adolescentes. As análises moleculares mostraram, no hipotálamo, uma possível relação entre a redução da expressão gênica do receptor 5-HT_6 e a suscetibilidade ao estresse prolongado. O estresse psicossocial também reduziu a expressão gênica do receptor 5-HT_6 no estriado, porém de forma independente da resiliência ou suscetibilidade aos seus efeitos anedônicos em camundongos adolescentes. Futuramente iremos investigar os mecanismos envolvidos nestas reduções dos transcritos do 5-HT_6 área-específicos, bem como seu papel nas respostas ao estresse.

Palavras-chaves: Estresse social. Resiliência. Receptor 5-HT_6. Adolescência. Depressão.

ABSTRACT

Vasconcelos PENS. Susceptibility and resilience to the effects of prolonged social defeat in adolescent male mice: study of the brain expression of 5-HT_6 serotoninergic receptor. [Masters thesis (Pharmacology)]. São Paulo: Instituto de Ciências Biomédicas. Universidade de São Paulo; 2017.

Stress is an important trigger factor of depression especially on adolescence, a phase of life that the brain does not reach its thorough development. On this stage of life, social stresses, like *bullying*, are present on the individuals' daily lives, but the reasons in which just a part of these individuals are affected by depression are unknown and need more studies. It is known that serotoninergic neurotransmission changes are related with several behavioral and affective disorders observed on mood disorders. Studies show that expression changes in the 5-HT_6 serotoninergic receptor could be implicated on cognition, memory and mood disorders, but the role of this receptor in the depression physiopathology remains unknown. In this way, the aim of this work was verify the participation of brain expression changes of 5-HT_6 serotoninergic receptor in the resilience and susceptibility phenomena under the negative effects of the chronic psychosocial stress in adolescent male mice. Our behavioral data showed the occurrence of anhedonic behaviors and social avoidance behaviors in one part of the subjugated animals (~50-60%), characterizing the susceptible subgroup, while the others formed the resilient subgroup. The gene expression of the 5-HT_6 receptor was decreased in the hypothalamus of the susceptible animals, but not in the resilients. A decrease on the transcripts quantity was also observed in the striatum of both subjugated groups. Regarding the brain localization of 5-HT_6 receptor, were observed immunorreactives neurons in the hypothalamus paraventricular nucleus and in the olfactory bulb, where the stains were found in the neuronal cilia. In conclusion, our data showed that the psychosocial stress induced anhedonic and social avoidance behaviors, in one part of the adolescent male mice. The molecular data showed, in the hypothalamus, a possible relation between the decrease of the gene expression of the 5-HT_6 receptor and the susceptibility to chronic stress. The psychosocial stress also reduced the gene expression of the 5-HT_6 receptor in the striatum, but independent of the resilience or susceptibility to the anhedonic effects in adolescent mice. In the future, we are going to investigate the mechanisms involved in the 5-HT_6 transcripts reductions, and your role in the strees response.

Keywords: Social stress. Resilience. 5-HT_6 receptor. Adolescence. Depression.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 – Representação da proteína HTR6.....26

Figura 2 – Principais vias de atuação do receptor 5-HT_6.....27

Figura 3 – Subjugação social prolongada em caixas de pareamento.....32

Figura 4 – Protocolo experimental (em dias).....33

Figura 5 – Teste de interação social.....35

Figura 6 – Efeitos do estresse por subjugação social durante 10 dias em camundongos machos adolescentes sobre o ganho de peso corporal nas 3 séries independentes.....42

Figura 7 – Preferência pela solução de sacarose a 1% em camundongos machos com 30 dias de vida (valor basal).....44

Figura 8 –. Consumo total de fluídos de camundongos machos adolescentes expostos ao estresse social por 10 dias.....46

Figura 9 – Preferência pela solução de sacarose 1% de camundongos machos adolescentes expostos ao estresse social por 10 dias.....48

Figura 10 – Preferência pela solução de sacarose 1% de camundongos machos adolescentes expostos ao estresse social por 10 dias.....51

Figura 11 – Latência para interação no teste de IS de camundongos machos adolescentes expostos ao estresse social por 10 dias da série A e da série B.....53

Figura 12 – Tempo total de interação no teste de IS de camundongos machos adolescentes expostos ao estresse social por 10 dias da série A e da série B.....54

Figura 13 –. Pontuação final no teste de IS (latência + tempo total de interação) obtido pelo método de z-escore de camundongos machos adolescentes expostos ao estresse social por 10 dias da série A e B.....55

Figura 14 – Pontuação final no teste de IS obtido pelo método de z-escore de camundongos machos adolescentes expostos ao estresse social por 10 dias das séries A e B.....56

Figura 15 – Análises de correlação entre os valores de preferência pela solução de sacarose 1% (%) e o pontuação social de camundongos machos adolescentes expostos ao estresse social por 10 dias.....57

Figura 16 – Análise dos animais resilientes e suscetíveis classificados para os testes de PPS e de IS.....59

Figura 17 – Efeito do estresse por derrota social durante 10 dias em camundongos machos adolescentes sobre a expressão gênica do receptor serotoninérgico 5-HT_6 no córtex pré-frontal, no hipocampo, no estriado dorsal e no hipotálamo por qPCR.....61

Figura 18 – Análises de correlação entre os valores de preferência pela solução de sacarose 1% (%) e a expressão gênica relativa do transcrito do receptor 5-HT_6 no estriado dorsal de camundongos machos adolescentes expostos ao estresse social por 10 dias.....62

Figura 19 – Análises de correlação entre os valores de preferência pela solução de sacarose 1% (%) e a expressão gênica relativa do transcrito do receptor 5-HT_6 no hipotálamo de camundongos machos adolescentes expostos ao estresse social por 10 dias.....63

Figura 20 – Efeito do estresse por derrota social durante 10 dias em camundongos machos adolescentes sobre a expressão proteica do receptor serotoninérgico 5-HT_6 no córtex pré-frontal, hipocampo e estriado dorsal por imunomarcação.....65

Figura 21 – Efeito do estresse por derrota social durante 10 dias em camundongos machos adolescentes sobre a expressão proteica do receptor serotoninérgico 5-HT_6 no córtex pré-frontal, estriado dorsal, hipocampo, tubérculo olfatório e núcleo paraventricular do hipotálamo por imunoistoquímica.....69

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Sequência de pares de iniciadores utilizados para qPCR.....37

Tabela 2 – Quantidade de transcritos do gene da ciclofilina A (*Ppia*).....60

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

5-HT - Serotonina

$5\text{-}HT_{1A}$ – Receptor da serotonina $5\text{-}HT_{1A}$

$5\text{-}HT_{1B}$ – Receptor da serotonina $5\text{-}HT_{1B}$

$5\text{-}HT_{6}$ – Receptor da serotonina $5\text{-}HT_{6}$

5-HTT – Transportadores da serotonina

ABC – Avidina-biotina-peroxidase

AMPc – Adenosina monofosfato cíclica

CEUA – Comissão de Ética no Uso de Animais de laboratório

Cq – Ciclo de quantificação

Cu – Cobre

DAB – Diaminobenzidina

DNA – Ácido desoxirribonucleico

DNAc – DNA complementar

dNTP – Desoxirribonucleotídeos trifosfatados

EDTA – Ácido etilenodiamino tetra-acético

Eixo HPA – Eixo Hipotálamo-pituitária-adrenal

EPM – Erro padrão médio

FMUSP – Faculdade de Medicina da USP

GLzM – Modelo linear generalizado

H_2O – Óxido de Hidrogênio

HCl – Cloreto de hidrogênio

Htr6 – Gente do receptor serotoninérgico 5-HT_6

HTR6 – Proteína do receptor serotoninérgico 5-HT_6

ICB – Instituto de Ciências Biomédicas

IMT – Instituto de Medicina Tropical

IS – Interação social

ISRS – Inibidores seletivos da recaptura da serotonina

NaCl – Cloreto de Sódio

NF – Nado forçado

OMS – Organização Mundial da Saúde

PB – Tampão fosfato

PCR – Reação em cadeia de polimerase

Ppia – Ciclofilina A

PPS – Preferência por sacarose

PVDF – Fluoreto de polivinilideno

qPCR- Reação em cadeia da polimerase quantitativa

RNA – Ácido ribonucleico

SDS – Docecil sulfato de sódio

SNC – Sistema nervoso central

TBS – Tampão salina Tris

TD – Transtorno depressivo

Tris – Trisaminometano

Tris-HCl – (hidroximetil) – aminometano-cloridrato

TTBS – TBS com Tween

USP – Universidade de São Paulo

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....20
1.1 Depressão e o estresse.....20
1.2 Estresse social na adolescência.....21
1.3 Modelos animais de depressão.....21
1.4 Resiliência e suscetibilidade ao estresse.....24
1.5 Comportamentos emocionais e o receptor 5-HT$_6$ da serotonina.....24
2 OBJETIVO.....29
2.1 Objetivo Geral.....29
2.2 Objetivo Específico.....29
3 MATERIAIS E MÉTODOS.....30
3.1 Animais.....30
3.2 Seleção dos camundongos agressores.....31
3.3 Subjugação social prolongada.....31
3.4 Delineamento experimental.....32
3.5 Testes Comportamentais.....33
3.5.1 Interação social.....33
3.5.2 Preferência por sacarose.....34
3.6 Determinação do ganho de massa corporal.....35
3.7 Eutanásia dos animais.....35
3.8 Quantificação da expressão gênica por qPCR.....36
3.8.1 Extração de RNA total.....36
3.8.2 Síntese do DNA complementar (DNAc).....36
3.8.3 Seleção de oligonucleotídeos iniciadores (*primers*).....37
3.8.4 PCR quantitativo em tempo real (qPCR).....38
3.9 Quantificação proteica do receptor 5-HT$_6$ por imunomarcação.....39
3.10 Quantificação proteica do receptor 5-HT$_6$ por imunoistoquímica.....40
3.11 Análise estatística.....41

4 RESULTADOS.....42
4.1 Ganho de peso dos animais após exposição ao estresse por subjugação social.....42
4.2 Comportamento anedônico no teste de PPS 1%..... 44
4.3 Comportamento de esquiva social no teste de interação social.....52
4.4 Análise de quantificação gênica do receptor serotoninérgico 5-HT$_6$ por PCR em tempo real 60
4.5 Análise de quantificação proteica do receptor serotoninérgico 5-HT$_6$ por ensaio de Imunomarcação.....64
4.6 Análises da expressão proteica do receptor serotoninérgico 5-HT$_6$ por imunoistoquímica.....69
5 DISCUSSÃO.....72
6 CONCLUSÃO.....80
REFERÊNCIAS.....82

1 INTRODUÇÃO

1.1 Depressão e o estresse

O Transtorno Depressivo (TD), ou simplesmente depressão, é nos dias de hoje, a doença de maior prevalência entre os chamados transtornos psiquiátricos. Relatórios emitidos pela Organização Mundial de Saúde (OMS) destacam a depressão como a primeira maior causa de incapacidade e diminuição de anos de vida (Shali et al., 2016), sendo ainda mais relevante ao se considerar apenas as pessoas entre 10 e 34 anos (Murray et al., 2012). O TD afeta aproximadamente 4,4% da população mundial, sendo que na população juvenil o número chega a 8% (Kapornai, Vetró, 2008), e apresenta um custo total para a população que ultrapassa 80 bilhões de dólares (Davidson, 2010; Chang et al., 2012).

Pacientes deprimidos podem apresentar uma série de sintomas físicos, como distúrbios no apetite, distúrbios no sono, cansaço, bem como psicológicos, como ideias de suicídio, humor deprimido e anedonia, que é a falta de prazer em atividades consideradas prazerosas (Moreno et al., 2011). Além disso, apresentam maior vulnerabilidade para desenvolver outros tipos de doenças, como diabetes tipo 2 e doenças cardiovasculares, por exemplo (Knol, et al., 2006; Elderon, Whooley, 2013).

O diagnóstico do TD é completamente subjetivo, uma vez que depende de respostas dadas pelo próprio paciente, acerca dos sintomas apresentados, já que ainda não existem marcadores biológicos ou moleculares confiáveis (Krishnan, Nestler, 2008).

O tratamento da depressão é de extrema importância e pode ser feito com diferentes classes de medicamentos, porém estes apresentam um grande número de efeitos colaterais que muitas vezes dificultam a adesão dos pacientes. Além da latência de aproximadamente três semanas para o início dos efeitos, apenas 60% dos pacientes respondem ao tratamento (Schosser, et al., 2012).

Hoje o estresse é considerado um dos principais fatores desencadeantes da depressão. O acúmulo de eventos adversos durante a vida de um indivíduo, como o luto, o desemprego, a pobreza, problemas familiares e sociais se constitui um importante fator etiológico para a ocorrência da doença (Brown, Harris, 1978; McEwen, 1998; Farmer, McGuffin, 2003; Willner et al., 2012).

Sabe-se que a resposta fisiológica mais importante do organismo frente a um agente estressor é a ativação do eixo hipotálamo-pituitária-adrenal (eixo HPA) que resulta na liberação de glicocorticoides, cortisol para os humanos e corticosterona para os roedores (Munk et al., 1984). Além disso, os receptores dos glicocorticoides apresentam uma importante distribuição nas regiões límbicas do cérebro, como no hipocampo e no córtex pré-frontal, que apresentam grande relação com transtornos do humor como a depressão (Swaab et al., 2005).

Porém, a maior parte dos estudos já realizados neste sentido utilizaram animais adultos, onde o SNC já se desenvolveu plenamente, sendo ainda necessários mais estudos em animais adolescentes onde o SNC ainda está em desenvolvimento.

1.2 Estresse social na adolescência

A adolescência é um período extremamente dinâmico e considerado como de alto grau de estresse na vida dos indivíduos. É um período de grandes mudanças de caráter biológico, como a maturação física e cerebral, bem como de caráter social e emocional, como o aumento das interações sociais (Spear, 2000). Experiências estressantes na adolescência podem levar à ocorrência de inúmeros transtornos comportamentais como ansiedade, depressão, abuso de drogas e hiperatividade (Kaltiala-Heino et al., 2000; Gladstone et al., 2006; Bibancos et al., 2007; Holmberg et al., 2008; Paus et al., 2008; Tharp-Taylor et. al., 2009). Especificamente nesse período da vida, os fatores estressantes de ordem social estão muito presentes, sendo a subjugação, ou derrota social, decorrente do *bullying* um dos mais frequentes (Buwalda et al., 2010).

O desenvolvimento cerebral na adolescência é constituído por uma variedade de mudanças neuroquímicas e estruturais em diferentes áreas do sistema límbico (Blakemore, 2008). Diferentes áreas do cérebro ainda estão em desenvolvimento durante a adolescência, porém o córtex pré-frontal tem se mostrado particularmente vulnerável a estímulos estressantes (Bibancos et al., 2007; Radley et al., 2008). Adolescentes que passaram por algum tipo de abuso emocional em suas vidas apresentam uma significativa diminuição na memória espacial de trabalho, demonstrando a influência dos estressores sociais sobre o desenvolvimento estrutural

do córtex pré-frontal levando a déficits cognitivos na vida adulta (Majer et al., 2010; Hanson et al., 2012).

Neste sentido, trabalhos realizados com roedores também demonstraram que experiências de derrotas sociais crônicas podem induzir mudanças neurofisiológicas, endócrinas e comportamentais (Blanchard et al., 2001; Koolhaas et al., 2001; Buwalda et al., 2005; Alves-dos-Santos, 2014). De Lima e colaboradores, por exemplo, verificaram um aumento da atividade motora e uma redução da memória associados com uma redução dos níveis de serotonina no hipocampo, no hipotálamo e no córtex pré-frontal, em camundongos adolescentes submetidos a um protocolo de estresse crônico imprevisível.

1.3 Modelos animais de depressão

Um modelo animal é considerado adequado para a realização de experimentos quando apresenta etiologia, expressão fenotípica e resposta terapêutica semelhante ao que ocorre nos humanos (Chiavegatto, 2011). Produzir um modelo animal para um transtorno psiquiátrico é muito difícil, uma vez que sintomas como humor deprimido, culpa, entre outros, são impossíveis de serem observados em animais. Porém, alguns sintomas como a anedonia vêm sendo verificados em modelos animais de estresse crônico.

Diversos modelos animais para a depressão vêm sendo utilizados ao longo dos anos como nado forçado, o estresse por restrição, o estresse crônico imprevisível, entre outros (Krishnan, Nestler, 2011; Darcet et al., 2016). Porém estes carecem de uma validade etiológica, uma vez que não simulam acontecimentos corriqueiros na vida de um humano.

O modelo utilizado no presente trabalho foi o de subjugação social prolongada que vem sendo amplamente utilizado desde o início da década de 1990 (Kudryavtseva et al., 1991) até os dias de hoje (Hollis, Kabbaj, 2014; Isingrini 2016), em roedores adultos, com o objetivo de observar as respostas de cada indivíduo frente a um agente estressor psicossocial.

Também neste sentido, nosso laboratório vem realizando inúmeros trabalhos com este modelo, utilizando diferentes protocolos em camundongos adolescentes, com o objetivo de investigar diferentes vias moleculares (Pereira-Junior, 2008; Alves-dos-Santos, 2014; Resende et al., 2016; Salvador-Carrillo, 2017).

Neste modelo, os camundongos machos adolescentes são colocados em contato com camundongos mais agressivos em caixas de pareamento, por um determinado período de tempo, com o objetivo de induzir uma submissão social devido às derrotas constantes. Esse modelo, diferentemente dos citados anteriormente, apresenta uma boa validade etiológica, uma vez que se assemelha a situações de *bullying* sofridas por humanos.

Estudos com ênfase no sistema serotoninérgico, utilizando este modelo, vêm demonstrando resultados interessantes. Berton e colaboradores (1999), utilizando um episódio de subjugação social em ratos adultos, relataram a ocorrência de comportamento do tipo depressivo como uma imobilidade maior no teste de nado forçado, acompanhado de uma diminuição na densidade dos transportadores da serotonina (5-HTT) no hipocampo. Estes efeitos foram todos revertidos com o uso crônico de fluoxetina.

Em 2010 Bartolomucci e colaboradores submeteram camundongos selvagens e heterozigotos para o gene do 5-HTT a um protocolo de subjugação social prolongada. Eles verificaram que os animais heterozigotos apresentam uma maior vulnerabilidade ao estresse com aumento da esquiva social devido à diminuição do *turnover* de serotonina (5-HT) no córtex pré-frontal.

Um estudo de Iñiguez e colaboradores (2014), utilizando episódios repetidos de subjugação social em camundongos adolescentes, observou que os animais apresentaram uma redução na preferência por sacarose e um aumento no tempo de imobilidade no nado forçado, sendo a fluoxetina capaz de reverter estes quadros comportamentais do tipo depressivo.

1.4 Resiliência e suscetibilidade ao estresse

As respostas dos indivíduos ao estresse são extremamente heterogêneas. Uma parcela da população é resistente ao estresse, indicando que, de forma isolada ele não representa uma causa para a ocorrência da doença, mas representa um fator de risco moderado ao desenvolvimento da depressão (Charney, 2004; Kendler et al., 1999). Sabe-se que a resiliência, diferente do pensamento comum, é um fenômeno ativo que depende de um conjunto de modificações moleculares, comportamentais, neurais entre outras para acontecer (Zannas et al., 2014). Indivíduos resilientes apresentam características como uma grande flexibilidade cognitiva (Yehuda et al., 2006). Contudo, estudos baseados nos substratos neurais e moleculares e sua relação com a suscetibilidade e resiliência ainda são insuficientes.

Assim como os humanos, os animais também possuem alterações comportamentais variadas quando submetidos ao estresse crônico, representando uma importante ferramenta para estudar a resiliência e a suscetibilidade aos efeitos do estresse. Strekalova e colaboradores (2004) utilizando camundongos C57BL/6 machos adultos, conseguiram identificar um subgrupo que não apresentou anedonia no teste de preferência por sacarose após ser submetido à um estresse crônico. Recentemente em nosso laboratório, utilizando camundongos machos adolescentes submetidos a um estresse psicosocial prolongado, também identificamos um subgrupo resiliente aos efeitos anedônicos no teste de preferência por sacarose (Alves-dos-Santos, 2014).

Tendo em vista que a adolescência é um período crítico no desenvolvimento dos indivíduos, estudos sobre suas respostas ao estresse crônico, bem como sua resiliência ou suscetibilidade ao estresse são imprescindíveis.

1.5 Comportamentos emocionais e o receptor 5-HT_6 da serotonina

A serotonina, um neurotransmissor muito abundante no SNC, é sintetizada em neurônios localizados nos núcleos da *raphe* e apresenta inúmeras projeções para outras regiões encefálicas. Dentre os importantes papéis da 5-HT no SNC, pode-se destacar seu envolvimento no processo de neurodesenvolvimento e plasticidade

sináptica nos próprios neurônios serotoninérgicos e na maturação de uma variedade de sistemas neuronais (Mazer et al., 1997; Whitaker-Azmitia et al., 2000).

A neurotransmissão serotoninérgica modula a liberação de diversos neurotransmissores (Barnes, Sharp, 1999) e participa de inúmeras alterações comportamentais e afetivas observadas nos transtornos psiquiátricos do humor (Graeff et al., 1996). Dentre as alterações observadas, pode-se destacar aquelas no comportamento sexual (Gonzalez et al., 1994), na cognição (Murphy et al., 2002), na atividade motora (Geyer et al., 2001) e na agressividade e dominância (Nelson e Chiavegatto, 2001), que estão relacionadas com transtornos psiquiátricos como depressão, ansiedade, transtorno obsessivo-compulsivo, esquizofrenia, entre outros (Frazer, Hensler, 1994; Sanchez et al., 2010).

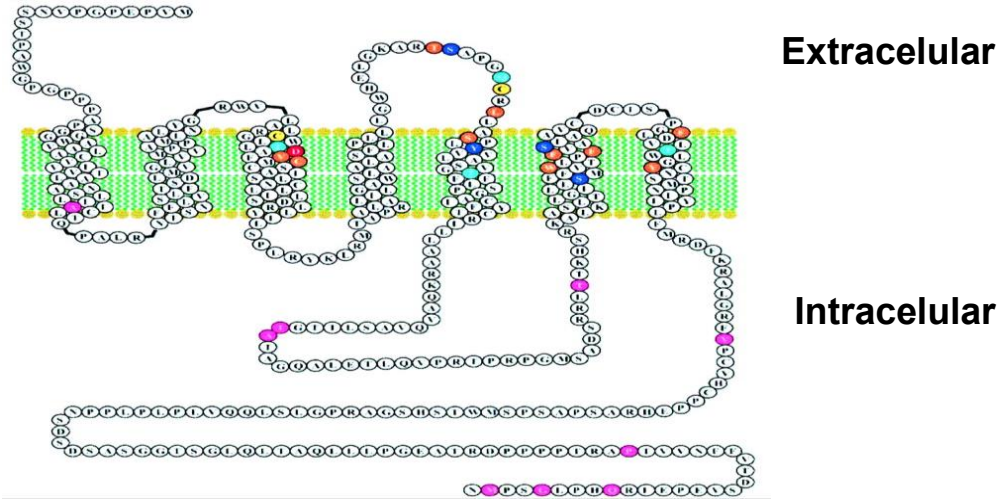
Existem até o momento sete tipos de receptores de 5-HT (5-HT_1 a 5-HT_7) que são divididos em 15 diferentes subtipos (Hoyer, 2002). O alvo deste estudo foi o receptor 5-HT_6, pois um estudo prévio do nosso laboratório observou um aumento na expressão gênica deste receptor no hipocampo de animais submetidos a um protocolo de isolamento social. Os demais tipos de receptores serotoninérgicos, neste mesmo trabalho, apresentaram diminuição da expressão (Bibancos et al., 2007).

O receptor 5-HT_6, último receptor serotoninérgico descrito, foi clonado pela primeira vez em 1993 por 3 grupos diferentes (Monsma et al., 1993; Plassat et al.,1993; Ruat et al., 1993). Apresenta 7 domínios transmembrânicos que são ligados entre si por 3 alças internas e 3 alças externas sendo codificado pelo gene *Htr6*, homólogo entre humanos, camundongos e ratos (Karila et al., 2015). Este gene apresenta 2341 pares de bases em camundongos, 1925 em ratos e 1984 em humanos sendo 3 éxons separados por 2 íntrons (Mitchell, Neumaier, 2005).

A proteína HTR6 codificada apresenta 440 aminoácidos em humanos e camundongos e 438 em ratos tendo um peso molecular de aproximadamente 46,96 kDa (Kohen et al., 1996) (Fig.1).

Em contraste com a maioria dos outros receptores serotoninérgicos, que apresentam um alto número de isoformas geradas por *splicing* alternativo, o receptor 5-HT_6 não apresenta isoformas com função importante no organismo (Yun et al., 2011).

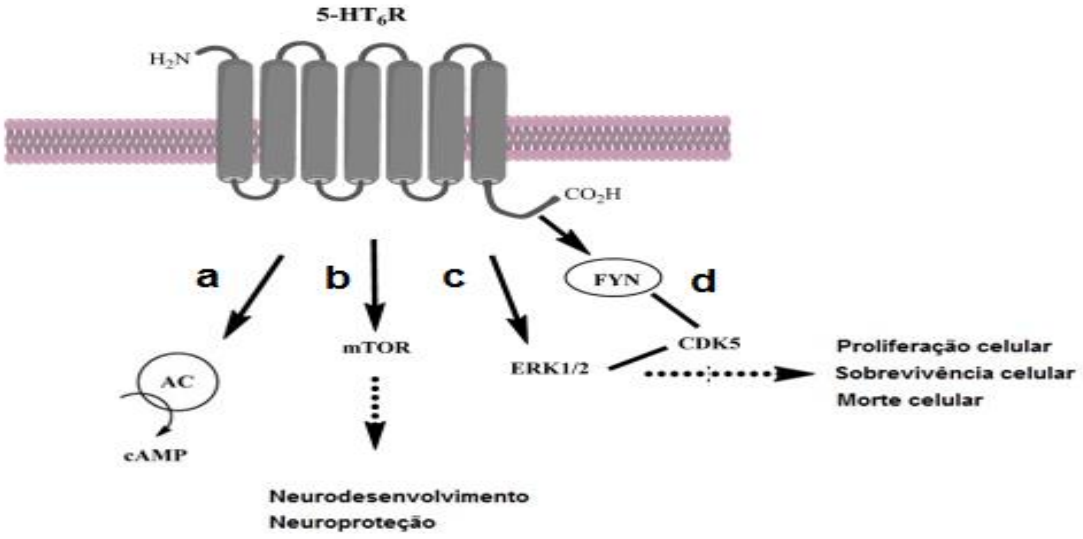
Figura 1 - Representação da proteína HTR6.



Proteína HTR6, formada por uma sequência de 440 aminoácidos. (Adaptado de Hirst et al., 2003).

Trata-se de um receptor de membrana acoplado à proteína Gs, que estimula a adenilil ciclase e leva ao aumento dos níveis de AMPc (Codony et al., 2010). Além desta via canônica, pode ter atuações em outras como a do mTOR que é importante para o neurodesenvolvimento e a neuroproteção e também as vias da FYN, CDK e ERK1/2 que têm participação na proliferação, sobrevivência e morte celular (Karila et al., 2015) (Fig.2).

Figura 2 - Principais vias de atuação do receptor 5-HT_6.



Representação esquemática das principais vias que o receptor 5-HT_6 atua. a) Via AMPc, b) Via mTOR, c) vias ERK1/2, d) Via FYN-CDK5. (Adaptado de Karila et al., 2015).

Sua distribuição é abundante no SNC sendo que, em humanos, se dá principalmente no estriado, hipocampo e córtex pré-frontal (Marazziti et al., 2012), enquanto que em ratos está predominantemente presente no tubérculo olfatório, estriado, hipocampo e núcleo *accumbens* (Ward et al., 1995; Hirst et al., 2003). Camundongos, por sua vez, apresentam uma baixa expressão do receptor 5-HT_6 nas diferentes áreas como o córtex pré-frontal, o hipocampo e o estriado (Hisrt et al., 2003).

Diversos estudos vêm demonstrando um importante envolvimento do receptor 5-HT_6 com a cognição, memória e alterações do humor (Loiseau et al., 2008; Wesolowska, 2007). Isso se comprova com trabalhos que observaram que a administração periférica de antagonistas do receptor 5-HT_6, em ratos, promove uma melhora significativa na memória e no aprendizado, observada no labirinto aquático de Morris e no teste de reconhecimento de objeto novo (Hirst et al., 2006; Woolley et al., 2003). Contraditoriamente, outros trabalhos relataram atividades antidepressivas e ansiolíticas após a administração periférica de agonistas do receptor 5-HT_6 em roedores no teste de suspensão pela cauda, nado forçado e preferência por sacarose

(Svenningsson et al., 2007; Cheng Liu et al., 2015). Esse antagonismo de ações ainda não está completamente elucidado, porém acredita-se que isso ocorra devido à interação do receptor 5-HT_6 com diferentes vias de outros neurotransmissores como da acetilcolina (Woolley et al., 2003), da dopamina (Dawson, Li, 2003), do glutamato entre outras (Dawson et al., 2000).

Contudo, apesar das evidências apresentadas nos tópicos acima demonstrarem uma relação entre o estresse social crônico, a neurotransmissão serotoninérgica e o desenvolvimento de diferentes transtornos psiquiátricos, estudos baseados no efeito direto da subjugação social sobre a expressão gênica e proteica do receptor serotoninérgico 5-HT_6, tanto na vida adulta quanto na adolescência ainda não foram relatados.

2 OBJETIVO

2.1 Objetivo Geral

Verificar a possível participação de alterações na expressão cerebral do receptor serotoninérgico 5-HT_6 nos fenômenos de resiliência e suscetibilidade aos efeitos anedônicos da subjugação social prolongada em camundongos machos adolescentes.

2.2 Objetivos Específicos

1. Verificar os efeitos da subjugação social prolongada durante a adolescência sobre o ganho de peso corporal dos animais.

2. Verificar a resiliência e a suscetibilidade aos efeitos da subjugação social prolongada através dos testes de preferência por sacarose e interação social.

3. Quantificar os transcritos do receptor 5-HT_6 no córtex pré-frontal, hipocampo, estriado e hipotálamo dos animais controle, suscetíveis e resilientes aos efeitos da subjugação social prolongada, através de qPCR.

4. Quantificar e avaliar a expressão proteica do receptor 5-HT_6 no córtex pré-frontal, hipocampo, estriado e hipotálamo dos animais controle, suscetíveis e resilientes, através de imunomarcação e de imunoistoquímica.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Animais

Foram utilizados camundongos da linhagem C57BL/6 machos e adolescentes provenientes do Biotério de Criação do Departamento de Farmacologia do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo (ICB-USP) que foram mantidos em nosso Biotério de Experimentação Animal no Instituto de Medicina Tropical (IMT) localizado na Faculdade de Medicina da USP (FMUSP). Os animais foram desmamados 21 dias após o nascimento e ficaram agrupados em 3 ou 4 animais em gaiolas de polipropileno (28 x17 x12 cm) até completarem 26 dias de idade, quando foram isolados em gaiolas e distribuídos aleatoriamente em animais dos grupos controle e experimental, de forma que a média dos pesos nos dois grupos fosse equivalente.

Camundongos CD1 machos e adultos (mais de 3 meses de idade), mantidos em nosso Biotério do IMT-FMUSP, foram utilizados como agressores. Estes permaneceram em casais, com fêmeas da mesma linhagem e estéreis (passaram pelo procedimento prévio de laqueadura) em gaiolas de polipropileno (28 x17 x12 cm). Durante os experimentos, os machos foram alocados individualmente em caixas de pareamento (especificamente confeccionadas para esta finalidade) de polipropileno (44 x34 x16 cm), divididas ao meio por uma placa de acrílico perfurada.

Todos os animais receberam água e comida *ad libitum* em um ciclo de claro/escuro de 12 horas, claro às 7:00 horas, e foram mantidos à temperatura ambiente de 22 Cº±2 no interior de estantes ventiladas (Alesco).

Os procedimentos empregados no presente estudo foram aprovados pelas Comissões de Ética no Uso de Animais de laboratório (CEUAs) do ICB-USP (Protocolo n°41, fls. 31, livro 03) e do IMT-FMUSP (Protocolo n° 000310A).

3.2 Seleção dos camundongos agressores

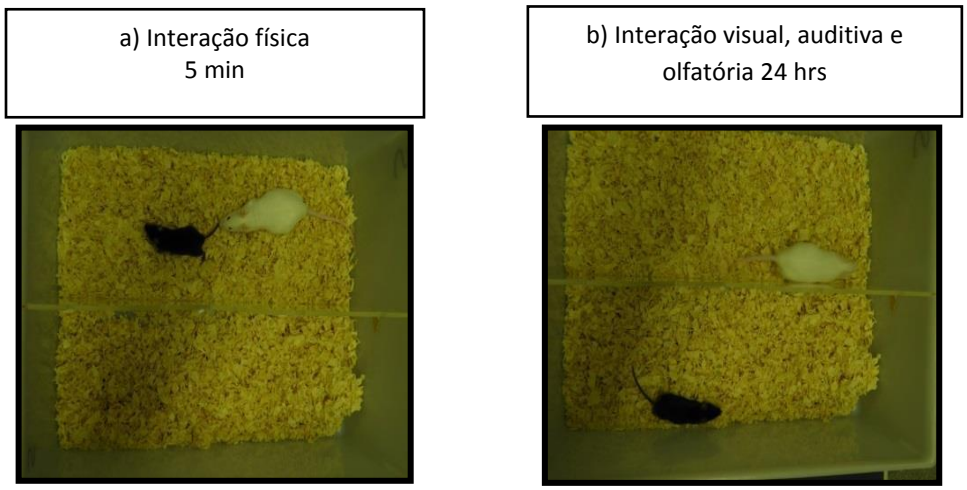
Para a realização dos testes de subjugação social, foi feita uma pré-seleção de camundongos CD1 agressivos. As fêmeas foram retiradas das gaiolas dos camundongos CD1 machos adultos dez dias antes do início dos experimentos e um camundongo macho C57BL/6 (não relacionado aos experimentos) foi introduzido para a observação da interação entre eles por 3,5 min. Os camundongos agressores receberam uma pontuação que variava entre -, +, ++ ou +++, de acordo com seu comportamento agressivo. Foram utilizados parâmetros descritos por Chiavegatto et al., 2001, que compreendem: latência para a primeira mordida, número total de ataques com mordida, duração total dos episódios de ataques e interações agressivas. Esta seleção foi realizada por três dias consecutivos e os animais que se situaram entre ++ e +++, foram considerados bons agressores e utilizados nos experimentos de subjugação social.

3.3 Subjugação social prolongada

Os experimentos se iniciaram aos 30 dias de vida dos animais. Os adolescentes do grupo experimental foram introduzidos, cuidadosamente, na caixa de pareamento contendo um camundongo agressor. Após um período de 5 min de interação física, o animal teste foi retirado e recolocado no compartimento ao lado (na mesma caixa que se encontra dividida por uma placa de acrílico perfurada), onde permaneceu por 24 horas (Fig.3). Neste período ocorreu somente contato olfatório, auditivo e visual entre eles, permanecendo livre acesso à ração e água. O experimento foi realizado por 10 dias consecutivos, sempre no mesmo período do dia e com agressores diferentes.

Os adolescentes do grupo controle foram colocados individualmente em caixas de pareamento similares às do grupo experimental, um em cada compartimento, sem qualquer interação física, também por 24 horas. Diariamente os animais foram pareados (compartimentos distintos) com controles diferentes pelo período de 10 dias. Foram excluídos do experimento os animais que porventura fossem feridos ou machucados durante os pareamentos.

Figura 3 - Subjugação social prolongada em caixas de pareamento



a) Camundongo C57BL/6 é subjugado pelo camundongo CD-1 residente por 5 min. b) Em seguida, o camundongo experimental é removido e colocado no compartimento adjacente, que é separado do agressor por uma divisória de acrílico, durante 24 h.

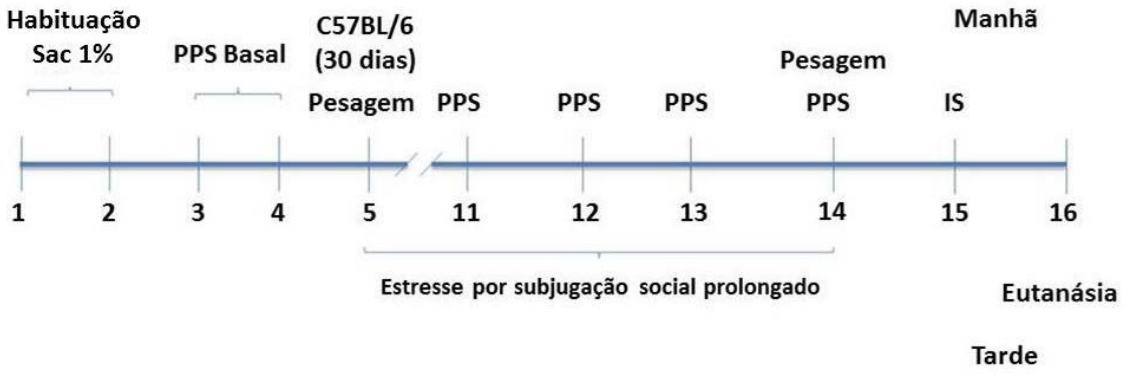
3.4 Delineamento experimental

O procedimento de subjugação social e os testes comportamentais foram realizados três vezes de maneira independente: série A, série B e série C.

- **Série A:** 26 camundongos C57BL/6 (10 controles e 16 experimentais). Os tecidos cerebrais coletados foram utilizados para a análise de expressão gênica por qPCR.
- **Série B:** 24 camundongos C57BL/6 (7 controles e 16 experimentais). Os tecidos cerebrais coletados foram utilizados para a análise de expressão proteica por imunomarcação.
- **Série C:** 21 camundongos C57BL/6 (7 controles e 14 experimentais). Os tecidos cerebrais coletados foram utilizados para a análise de expressão proteica por imunoistoquímica.

A subjugação social e os testes comportamentais de cada série seguiram a ordem cronológica detalhada na figura 4.

Figura 4 - Protocolo experimental (em dias)



A figura 2 mostra a ordem cronológica do experimento de subjugação social e dos testes comportamentais. Os testes descritos acima da linha horizontal foram realizados entre 9:00 e 12:00 h, enquanto os procedimentos descritos abaixo, foram realizados entre 14:00 e 17:00 h. Sac 1% = solução de sacarose a 1%; PPS = preferência pela solução de sacarose a 1%; e IS = interação social.

3.5 Testes comportamentais

Foram realizados os seguintes testes:

- Interação Social (IS): dia 15 (~16 h após a finalização do último pareamento com o agressor).
- Preferência por Sacarose (PPS): dias 3 e 4 (basal) e 11, 12, 13 e 14 (final).

3.5.1 Preferência por sacarose

Primeiramente foi necessária a habituação dos animais, que foram isolados em suas gaiolas moradia, onde dois bebedouros (tubos Falcon com tampas de borracha e bicos de metal) foram fornecidos nos dias 1 e 2 para evitar o efeito da neofobia. Um tubo continha 40 mL de água e o outro 40 mL de uma solução de sacarose a 1% e as soluções e posições dos tubos na gaiola foram trocadas diariamente. Este teste foi padronizado anteriormente em nosso laboratório (Alves-dos-Santos, 2014).

Após esta fase de adaptação, os animais foram transferidos para as caixas de pareamento. O consumo basal (em gramas) de água e solução de sacarose a 1% foi medido por um período de 14 horas (nos dias 3 e 4, obtendo-se um valor médio), bem como o consumo final, correspondente à media de consumo nos dias 11, 12, 13 e 14.

A PPS foi calculada em valores percentuais, pela razão entre o consumo de sacarose 1% e o consumo total de líquidos (consumo de sacarose + consumo de água) multiplicando-se por 100 (Fórmula 1).

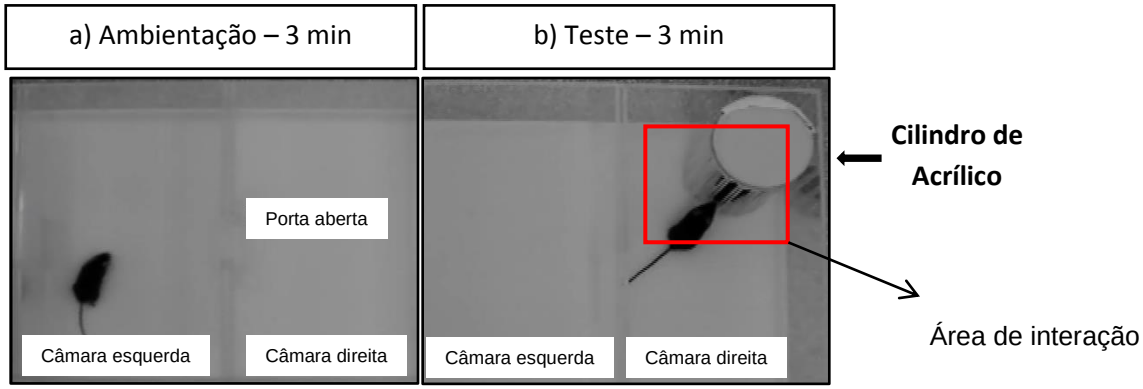
Fórmula 1: Cálculo da PPS.

$$PPS = \frac{\text{Consumo de sacarose (g)}}{\text{Consumo de sacarose (g) + consumo de água (g)}} \times 100$$

3.5.2 Interação social

Foi utilizada uma caixa retangular de interação social (40,5 x60 x22 cm) com paredes de acrílico transparentes e fundo branco (Noldus, Leesburg, VA - EUA). A caixa é dividida em três câmaras de mesmo tamanho interligadas por pequenas portas, porém para o experimento apenas duas câmaras contíguas foram utilizadas (Fig.3). Primeiramente o camundongo teste foi colocado cuidadosamente na câmara da esquerda (previamente limpa e seca), permanecendo por 3 min para a exploração do local, sendo em seguida retirado e recolocado em sua gaiola moradia. Um camundongo macho, da mesma idade e linhagem (não relacionado ao experimento), foi imediatamente introduzido na câmara da direita (dentro de um cilindro vazado de barras de acrílico). O camundongo teste foi recolocado na caixa (câmara da esquerda), novamente por um período de 3 min. Foram registrados o tempo em que o animal teste permaneceu na área de interação (região delimitada próxima ao cilindro), bem como a latência para a ocorrência da primeira interação física com o cilindro (Fig. 3). O teste foi filmado por uma câmera (Bosh, São Paulo) e as análises foram feitas usando o software ViewPoint® (Videotrack 3.0.; View Point, Lyon, France).

Figura 5 - Teste de interação social



a) Camundongo C57BL/6 é colocado no aparato vazio para a ambientação por 3 minutos. b) Em seguida, o camundongo experimental é removido, um camundongo "isca" é adicionado ao aparato dentro de um cilindro, e o camundongo experimental é recolocado no aparato por 3 minutos.

3.6 Determinação de ganho de massa corporal

Os animais foram pesados de forma individual nos dias 5 e 14 em uma balança semianalítica e o ganho de peso foi calculado pela diferença de peso entre os valores achados nesses dias.

3.7 Eutanásia dos animais

Ocorreram todas no 16º dia do protocolo experimental (~48 h após a finalização do último pareamento), no período da tarde (14:30 - 17:30 h).

Série A: Foram rapidamente decapitados. As estruturas encefálicas (córtex pré-frontal, hipocampo, estriado e hipotálamo) foram dissecadas por uma pesquisadora experiente, rapidamente congeladas em nitrogênio líquido e armazenadas à -70 °C (material futuramente utilizado para o isolamento de ácidos nucleicos).

Série B: Foram rapidamente decapitados, e as estruturas encefálicas (córtex pré-frontal, hipocampo, estriado e hipotálamo) foram dissecadas por uma pesquisadora

experiente, rapidamente congeladas em gelo seco e armazenadas à -70 °C (material futuramente utilizado para a separação de proteínas).

Série C: Foram anestesiados profundamente (via ip) com cloridrato de cetamina (5 mg/100 g, Dopalen® - Vetbrands) e cloridrato de xilazina (1 mg/100 g, Anasedan® - Vetbrands), e perfundidos por via transcardíaca com solução salina tamponada e paraformaldeído a 4% em tampão fosfato 0,1 M (PB; pH 7,4). Os encéfalos foram extraídos e mantidos em uma solução de sacarose a 30% durante a noite. A seguir, os encéfalos foram retirados desta solução e armazenados à -70 °C.

3.8 Quantificação da expressão gênica por qPCR

3.8.1 Extração de RNA total

O RNA total foi extraído com o reagente Trizol (Invitrogen, Carlsbad, CA, EUA), de acordo com o protocolo sugerido pelo fabricante. Em seguida, foram analisadas a concentração e a pureza das amostras em espectrofotômetro (NanoDrop, Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, EUA) bem como a integridade em gel de agarose 1%. As amostras foram tratadas com DNase I (Life Technologies, Carlsbad, CA, EUA) com o intuito de evitar possíveis contaminações com DNA genômico. Em uma reação com volume final de 50 µL, 10 µg de RNA foram incubados com 1 µL de DNAase I e DNAase Buffer 1 X (100 mM, Tris pH 7,5, 25 mM $MgCl_2$, 5 mM $CaCl_2$). As amostras foram incubadas a 37 °C por 30 min e, a seguir, purificadas com o Kit RNeasy (Quiagen, Valencia, CA, EUA) de acordo com as instruções do fabricante. A concentração e a pureza das amostras foram verificadas novamente por espectrofotometria (Nanodrop, Thermo Fisher Scientific Inc.). As soluções de RNA foram armazenadas em freezer a -70 ºC até o uso.

3.8.2 Síntese do DNA complementar (DNAc)

A síntese do DNAc foi feita utilizando-se 2 µg do RNA total, 4 µL de tampão 5 X (250 mM Tris-HCl pH 8,3; 375 mM KCl, 15 mM de MgCl2), 1 µL de DTT 100 mM, 25

mM de iniciadores oligo(dT), 0,5 mM de cada dNTP, 40 U da enzima Rnase OUT e 200 U da enzima Super Script III Reverse Transcriptase (Life Technologies), em um volume total de 20 µL de água isenta de RNAses e DNAses. Inicialmente, o RNA foi aquecido a 65 ºC, por 5 min, e colocado no gelo até adição dos demais componentes. A reação foi incubada a 50 ºC por 1 h e interrompida pelo aquecimento a 85 ºC, por 5 min. Depois, foi realizado um tratamento com RNAase H para eliminação das moléculas de RNA por 20 min a 37 °C. As soluções de DNAc (volume final 20 µL) foram armazenadas em freezer a -20 ºC até o uso.

3.8.3 Seleção de oligonucleotídeos iniciadores (*primers*)

Foram utilizados os nucleotídeos iniciadores específicos para o gene *Htr6* de camundongo (*Mus musculus*) desenhados e previamente utilizados em nosso laboratório por Bibancos e colaboradores (2007). A especificidade foi verificada pela ferramenta BLAST (http://www.ncbi.nih.gov/BLAST). O tamanho esperado do produto e a especificidade foi verificada em gel agarose 1% (Invitrogen). Como gene controle interno biológico foi utilizado a ciclofilina A (*Ppia*). Este gene apresentou expressão similar nas áreas cerebrais estudadas entre os animais dos diferentes grupos (controle, experimental).

Os oligonucleotídeos iniciadores para o receptor serotoninérgico 5-HT_6 (*Htr6*) e ciclofilina A (*Ppia*) utilizados no protocolo de qPCR se encontram descritos na **tabela 1**.

Tabela 1 – Sequência de pares de iniciadores utilizados para qPCR

Genes	Sequência (5’ – 3’)	Localização (pb)	Éxon	Fita	Tamanho do produto (pb)
Htr6	CATAGCTCAGGCCGTATGTG CGCATGAAGAGGGGATAGA	870–889 980-962	2 3	*senso* *antisenso*	111
Ppia	AATGCTGGACCAAACACAAAA CCTTCTTTCACCTTCCCAAA	345-364 445-426	5 5	*senso* *antisenso*	101

Legenda: pb: pares de bases dos nucleotídeos

3.8.4 PCR quantitativo em tempo real (qPCR)

As reações de qPCR foram realizadas no equipamento Rotor Gene 3000 (Corbett Research, Concord, Australia). A quantificação relativa dos transcritos para cada amostra foi feita de acordo com (Vandesompele et al., 2002) por qPCR através do Cq (ciclo de quantificação), que é o número de ciclos necessários para que a fluorescência emitida pela amostra alcance uma linha de detecção arbitrária (*threshold*). Esses Cqs foram coletados durante a fase exponencial de amplificação, que acontece quando a emissão de fluorescência é proporcional ao número inicial de cópias do produto amplificado de cada amostra. As reações continham 1 µL de amostra (DNAc), os iniciadores para o gene *Htr6* ou para o gene *Ppia*, sais, deoxinucleotidos, enzima Amplitaq Gold DNA polimerase (Applied Biosystem, Foster City, CA, EUA), e o composto fluorescente Sybr Green I para um volume final de 20 µL. 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 (100 ng/µL, 50 ng/µL, 25 ng/µL, 12,5 ng/µL, 6,25 ng/µL), para cada par de iniciadores e em cada região cerebral. 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. As reações foram incubadas inicialmente a 95 °C, por 10 min, para a ativação da enzima DNA polimerase, seguidas por 40 ciclos de desnaturação a 94 °C por 45 s, anelamento e extensão e coleta do sinal de fluorescência a 55 °C por 45 s. As amostras foram feitas em triplicata. Para cada corrida foram feitos os controles negativos: NTC (ausência de DNAc) e uma amostra de RNA total (controle negativo para verificar possível presença de DNA genômico). Após o término de cada corrida, a especificidade do produto de PCR formado foi determinada através de uma corrida de dissociação (95 ºC por 15 s, estabilização a 60 °C, seguida de um aumento gradual de temperatura de 0,5 °C por min). O software RG-6000 (Corbett Research) foi usado para gerar a curva padrão de cada produto de amplificação, as curvas de dissociação e as planilhas contendo os dados brutos de fluorescência, e assim, poder calcular os valores de Cq para cada amostra. Para cada área cerebral, a quantidade de transcrito (referente ao RNAm) foi determinada a partir

do Cq da amostra, levando em consideração sua eficiência de amplificação. Os resultados brutos foram normalizados pela expressão do gene da ciclofilina. Todas as análises foram feitas através de planilhas de acordo com Vandesompele et al., 2002, já validadas e amplamente utilizadas em nosso laboratório (Chiavegatto et al., 2009, 2012).

3.9 Quantificação proteica do receptor 5-HT_6 por imunomarcação

Os tecidos armazenados foram mantidos em gelo e homogeneizados em tampão de lise (tampão RIPA: 150 mM NaCl, 5 mM EDTA, 1% Triton, 1% deoxicolato de sódio, 0,1% SDS, 1 M Tris-HCl pH=7,6, dH_2O para 100 mL) contendo coquetel de inibidores de proteases e fosfatases (1:1.000, Sigma). Após a homogeneização, as amostras foram centrifugadas a 13.000 xg por 15 min a 4 ^oC, e os sobrenadantes retirados e armazenados a 20^oC até a utilização. As concentrações de proteína foram determinadas através de um método colorimétrico baseado na reação entre o ácido bicinconínico com o cátion cuproso (Cu^+) (kit Pierce BCA Protein Assay; Thermo Scientific, IL, USA).

Amostras de 60 µg de proteína foram aplicadas em gel de poliacrilamida-SDS a 10%. Após eletroforese, as proteínas foram transferidas para uma membrana de PVDF através do sistema Trans-Blot Turbo (Bio-Rad), na qual o soro policlonal de coelho anti-5-HT_6 desenvolvido contra 5-HT_6 recombinante de camundongos (ab103016, Abcam, Cambridge, MA, EUA) foi adicionado em concentração de 1:1.000, e mantido em leve agitação à 4 ºC, por 18 h. A seguir, adicionou-se o anticorpo secundário conjugado com HRP anti-coelho (sc2004, Santa Cruz Biotechnology, Dallas, TX, EUA), 1:4.000, mantendo-o também à 4 ºC por 105 min. A visualização das bandas foi realizada com o sistema de quimioluminescência (ECL, Santa Cruz Biotechnology, Dallas, TX, EUA*).* Posteriormente, as mesmas membranas foram lavadas e incubadas com anticorpo monoclonal primário anti-β-Actina de camundongo (sc47778, Santa Cruz Biotechnology, Dallas, TX, EUA), 1:1.000 por 18 h e a seguir com o anticorpo secundário conjugado com HRP anti-mouse (sc2005, Santa Cruz Biotechnology, Dallas, TX, EUA), 1:4.000, por 105 min para o controle das quantidades das amostras. Para o GAPDH o

procedimento foi exatamente o mesmo da β-Actina, porém utilizando o anticorpo monoclonal anti-GAPDH de coelho (sc32233, Santa Cruz Biotechnology, Dallas, TX, EUA). A quantificação da densidade óptica (DO) das bandas foi realizada através do equipamento e *software ImageQuant* (GE Healthcare, Milwaukee, WI, USA), normalizando-se os valores de DO das proteínas de interesse pelos valores de DO da β-Actina ou do GAPDH.

3.10 Quantificação proteica do receptor 5-HT_6 por imunoistoquímica

Os encéfalos armazenados foram fatiados em micrótomo Zeiss Hyrax S30 (Zeiss, Muenchen, Germany) em secções coronais de 30 µm. Os cortes foram pré-incubados com 5% de soro normal de burro (Biotin-SP-conjugated) (*AffiniPure Donkey Anti-Rabbit* IgG, Jackson Immuno Research, West Grove, PA, EUA) e 0,4% de Triton X-100 por 1 h à temperatura ambiente, depois foram tratados com o mesmo anticorpo anti-5-HT_6 utilizado no item anterior, em uma diluição de 1:1.000 em tampão fosfato salino (PBS) com 1% de soro normal de burro e 0,3% de Triton X-100 durante 48 h. Posteriormente os cortes foram incubados por 2 h com um complexo avidina-biotina (Vectastain, Elite ABC kit, Vector), 1:200, e lavados em tampão fosfato (PB). O produto da reação da peroxidase foi visualizado usando o método da glucose oxidase e 3,3´-diaminobenzidina (DAB) como cromógeno. Por fim, os cortes foram lavados novamente em PB e montados em lâminas gelatinizadas. As lâminas foram examinadas através de um microscópio Zeiss Axioimager A1 (Zeiss) equipado com uma câmera digital do tipo Zeiss AxioCam HRc (Zeiss). As quantificações foram realizadas através do software Axiovision (Zeiss). Esta metodologia foi conduzida no laboratório do professor Martin A Metzger do Departamento de Fisiologia e Biofísica deste Instituto.

3.11 Análise Estatística

As análises estatísticas foram feitas utilizando-se o programa estatístico Statistica (versão 7.0, Statsoft.Inc, Tulsa, OK, EUA).

Foram utilizados os testes t de Student (análises dos grupos controle e experimental) e GLzM seguido pelo teste de Tukey (análises dos grupos controle, suscetível e resiliente). O GLzM foi utilizado uma vez que é um teste mais abrangente que agrupa uma série de técnicas com diferentes distribuições como regressão linear, regressão logística, regressão Poisson, entre outras.

O teste de Pearson foi usado para as análises de correlação linear entre os dados dos animais dos diferentes grupos.

Para a avaliação dos parâmetros (latência e tempo de interação) no teste de interação social utilizou-se a associação de ambos pelo método do z-escore para obter um escore geral representativo. As diferenças foram consideradas significantes quando $p<0,05$.

4 RESULTADOS

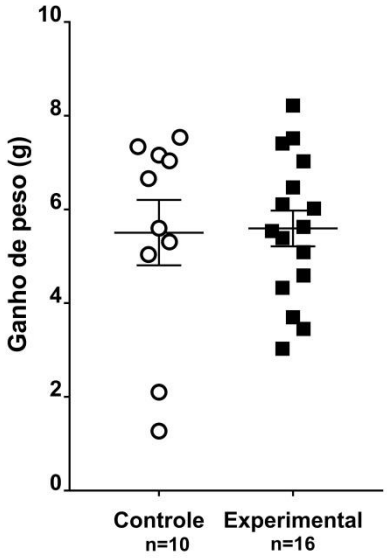
4.1 Ganho de peso dos animais após exposição ao estresse por subjugação social

Os animais foram pesados nos dias 5 (antes do início dos pareamentos) e 14 (24h após último pareamento). O ganho de peso não foi diferente entre os animais do grupo experimental e os animais do grupo controle em nenhuma série experimental (teste t, p>0,05) (Fig. 6a, 6b e 6c).

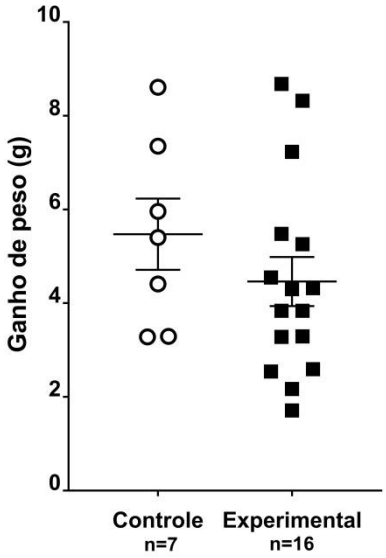
As médias do peso dos animais controle, no dia 5, nas séries 1, 2 e 3 foram: 13,61g ± 1,4; 13,78g ± 0,75; 12,86g ± 0,69, enquanto no dia 14 foram 19,08g ± 1,12; 19,18g ± 0,5; 18,37g ± 0,58, respectivamente. As médias do peso dos animais experimentais, no dia 5, nas séries 1, 2 e 3 foram: 14,42g ± 0,78; 13,86g ± 0,4; 12,89g ± 0,47, enquanto no dia 14 foram 18,89g ± 0,39; 18,34g ± 0,29; 18,49g ± 0,4, respectivamente.

Figura 6 – Efeitos do estresse por subjugação social durante 10 dias em camundongos machos adolescentes sobre o ganho de peso corporal nas 3 séries independentes.

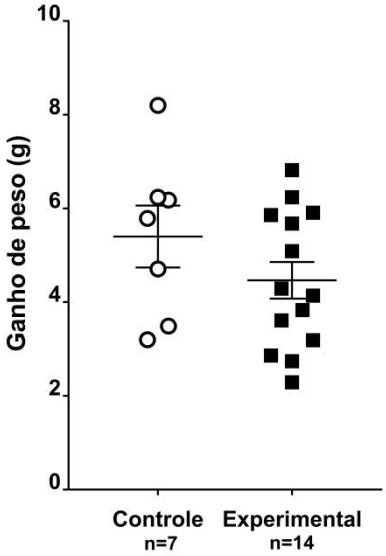
a) Série A



b) Série B



c) Série C

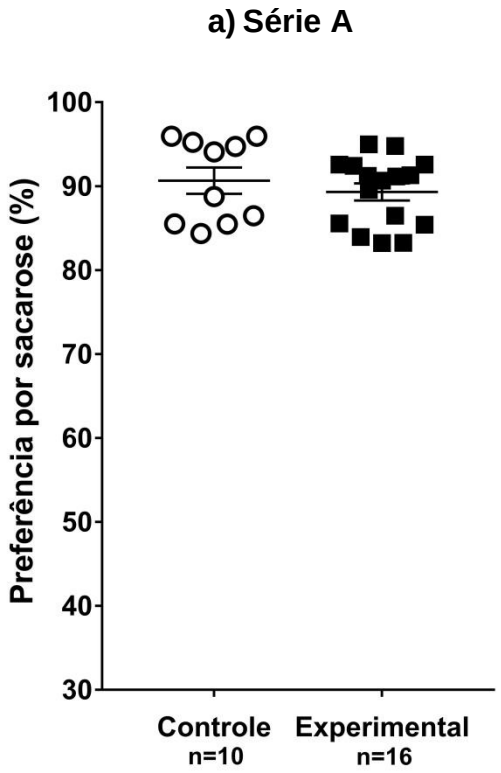


Ganho de peso (g) dos camundongos machos adolescentes expostos ao estresse social em 3 séries independentes. Dados representam a média ± EPM. Teste t, $p>0,05$.

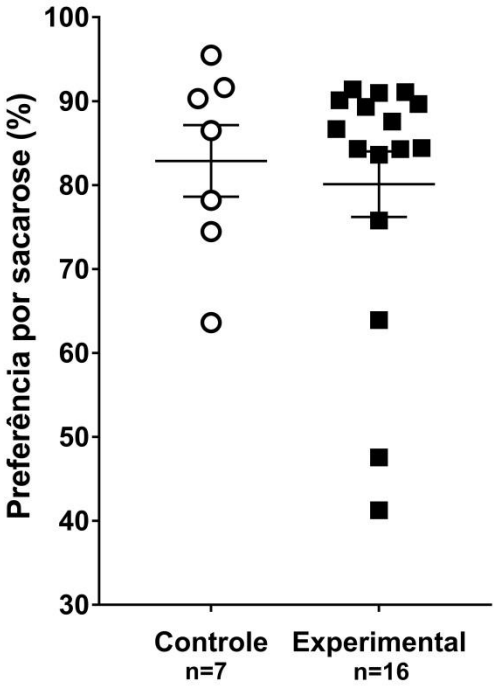
4.2 Comportamento anedônico no teste de PPS 1%

A preferência basal pela solução de sacarose a 1% (média do consumo de sacarose e água entre os dias 3 e 4) não diferiu entre os animais controles e experimentais em nenhuma das séries. (teste t, p>0,05) (Fig. 7a, 7b e 7c).

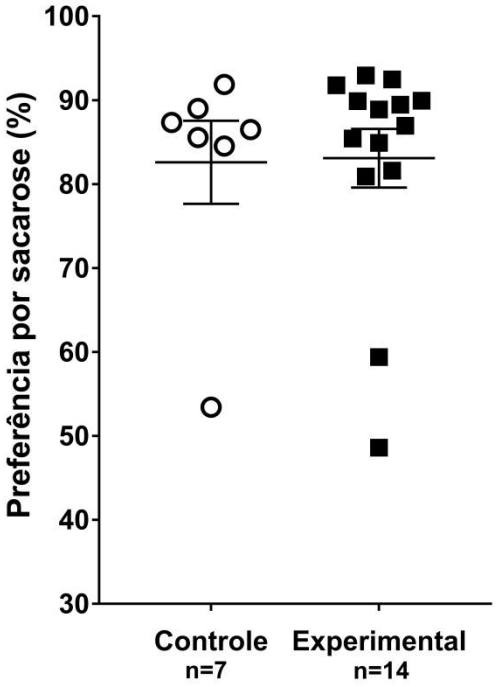
Figura 7- Preferência pela solução de sacarose a 1% em camundongos machos com 30 dias de vida (valor basal).



b) Série B



c) Série C



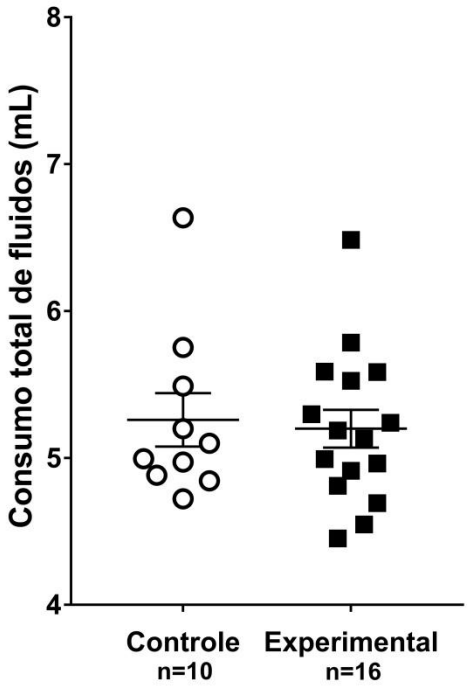
Dados representam a média da PPS basal ± EPM. Teste t, p>0,05.

Foi utilizada a média dos valores de preferência por sacarose nos dias 11, 12, 13, 14 para calcular os efeitos da subjugação social sobre o consumo total de fluidos e a preferência por sacarose em cada série experimental.

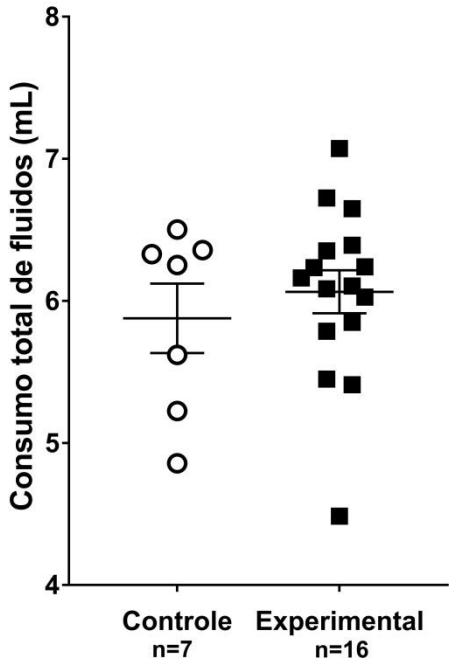
O consumo total de fluidos não apresentou diferença significante entre os grupos controle e experimental em nenhuma das séries. (teste t, p>0,05) (Fig.8a, 8b e 8c).

Figura 8- Consumo total de fluídos de camundongos machos adolescentes expostos ao estresse social por 10 dias.

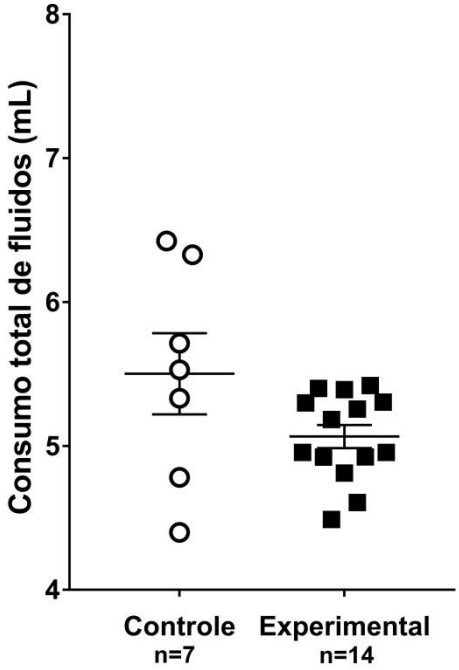
a) Série A



b) Série B



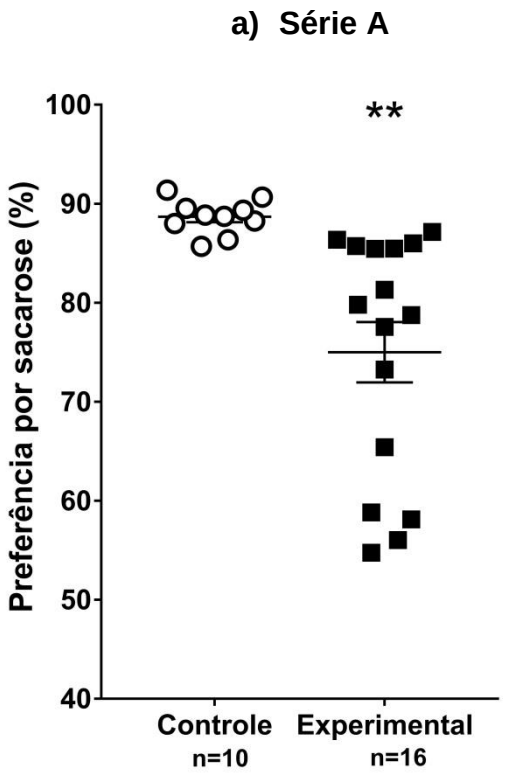
c) Série C



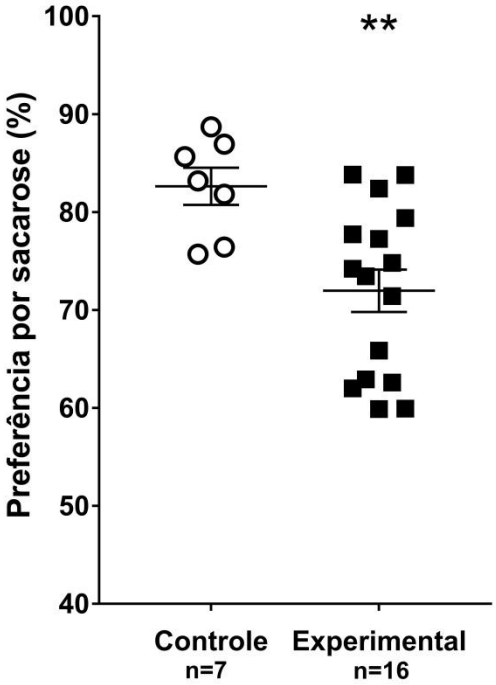
Consumo de líquidos entre os dias 11-14. Dados representam a média ± EPM. Teste t, p>0,05.

A preferência pela solução de sacarose 1% foi diferente no grupo experimental comparado com o grupo controle na série A (teste t, p<0,01) (Fig. 9a), na série B (teste t, p<0,01) (Fig. 9b) e série C (teste t, p<0,05) (Fig. 9c).

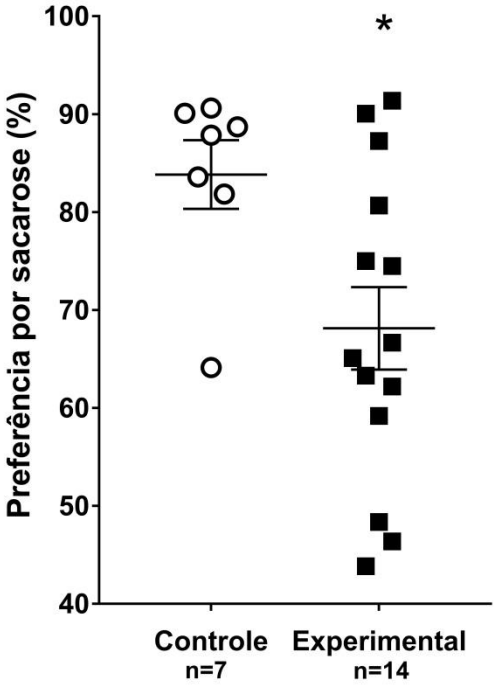
Figura 9- Preferência pela solução de sacarose 1% de camundongos machos adolescentes expostos ao estresse social por 10 dias.



b) Série B



c) Série C



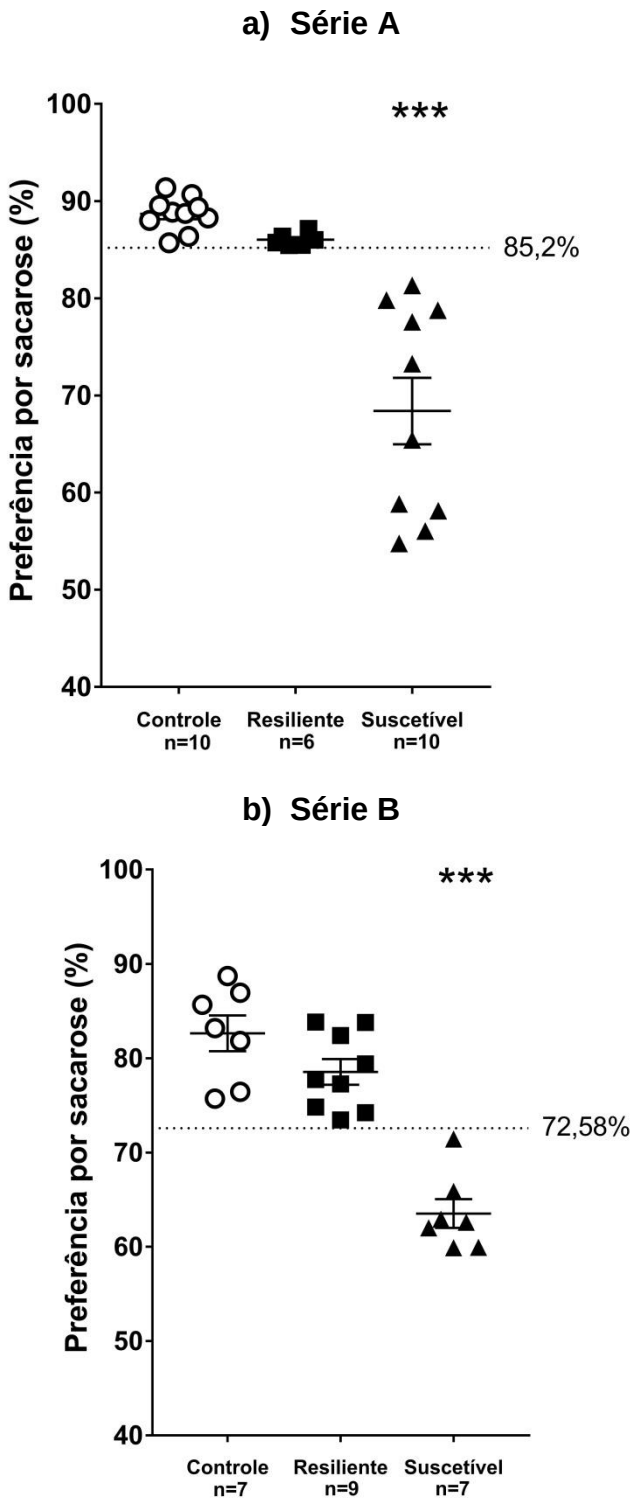
Dados representam a média ± EPM. Teste t de Student, *p<0,05, **p<0,01.

A preferência por sacarose foi analisada separadamente nas três séries experimentais (série A, série B e série C) utilizando como parâmetro para divisão dos animais experimentais em suscetíveis e resilientes o critério de média – 2DP do grupo controle, obtendo-se assim a faixa de corte para cada série. Os animais que obtiveram valores de preferência por sacarose final menores que a faixa de corte foram considerados suscetíveis enquanto os animais que obtiveram valores de preferência por sacarose final maiores que a faixa de corte foram considerados resilientes.

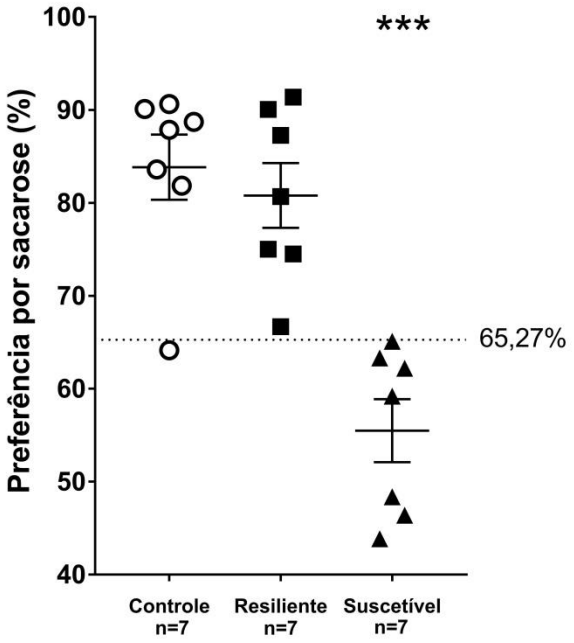
Série A: 6 animais resilientes (37,5%) e 10 animais suscetíveis (62,5%);
Série B: 9 animais resilientes (56,25%) e 7 animais suscetíveis (43,75%);
Série C: 7 animais resilientes (50%) e 7 animais suscetíveis (50%).

Nas três séries encontrou-se diferença significante entre os grupos controle, suscetível e resiliente (GLzM, $F_{(2,20)}$ =37,8, p<0,001; $F_{(2,18)}$ =20,2, p<0,001 e $F_{(2,23)}$ =24,5, p<0,001, respectivamente). A preferência por sacarose 1% dos animais do subgrupo suscetível foi menor quando comparado com os animais dos grupos controle e resiliente (série A, série B e série C: Tukey *post hoc*: p<0,001), enquanto entre os animais dos grupos controle e resiliente não foram observadas diferenças (série A, série B e série C: Tukey *post hoc*: p>0,05) (Fig.10a, 10b e 10c).

Fig. 10 – Preferência pela solução de sacarose 1% de camundongos machos adolescentes expostos ao estresse social por 10 dias.



c) Série C



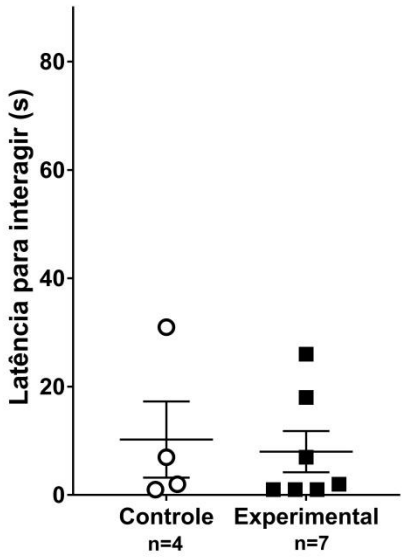
Dados representam a média ± EPM da preferência pela solução de sacarose 1% entre os dias 11-14. A Linha tracejada representa a faixa de corte (valor da média-2DP) do grupo controle e separa o grupo experimental nos subgrupos resiliente e suscetível. GLzM, *** $p<0,001$.

4.3 Comportamento de esquiva social no teste de interação social

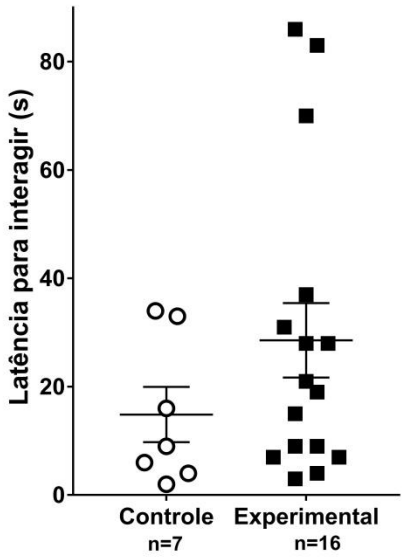
O teste de interação social foi feito no dia 15 do protocolo e foram avaliados os comportamentos relacionados à esquiva social. Os parâmetros analisados foram: a latência para a primeira interação e o tempo total de interação. Este teste foi realizado nas três séries, porém devido a problemas técnicos (erros de procedimento) apenas parte dos animais da série A (4 controles e 7 experimentais) e os animais da série B foram considerados. A latência para a interação (Fig.11a e 11b) e o tempo total de interação (Fig.12a e 12b) não diferiram entre os grupos controle e experimental na série A (teste t, $p>0,05$) e na série B (teste t, $p>0,05$).

Figura 11- Latência para interação no teste de IS de camundongos machos adolescentes expostos ao estresse social por 10 dias da série A e da série B.

a) Série A

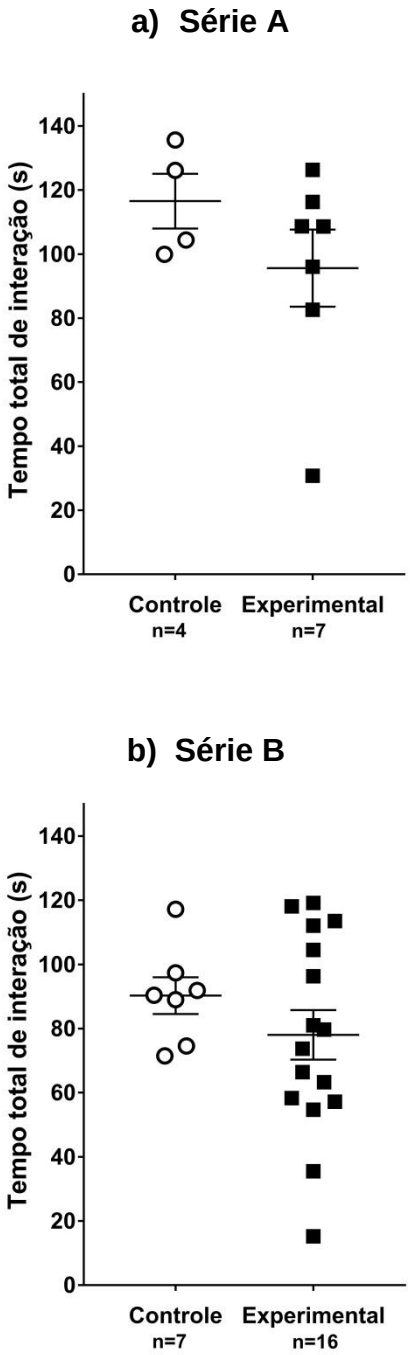


b) Série B



Latência para a primeira interação. Dados representam a média ± EPM. Teste t, p>0,05.

Figura 12- Tempo total de interação no teste de IS de camundongos machos adolescentes expostos ao estresse social por 10 dias da série A e da série B.

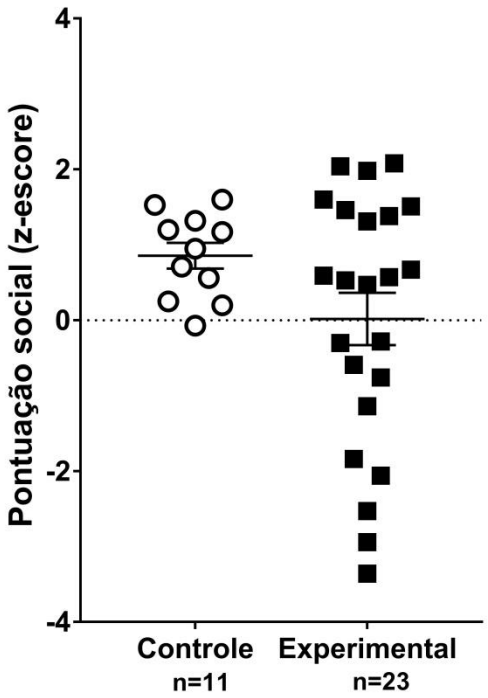


Tempo total de interação dos camundongos machos adolescentes expostos ao estresse social. Dados representam a média ± EPM. Teste t, p>0,05.

Os parâmetros de interação social observados (latência e tempo total de interação) foram agrupados e então convertidos através do método z-escore para obter uma pontuação final para cada animal.

A pontuação final não foi diferente entre os grupos controle e experimental considerando as séries A e B em conjunto (Fig.13) (teste t, p>0,05).

Figura 13- Pontuação final no teste de IS (latência + tempo total de interação) obtido pelo método de z-escore de camundongos machos adolescentes expostos ao estresse social por 10 dias da série A e B.

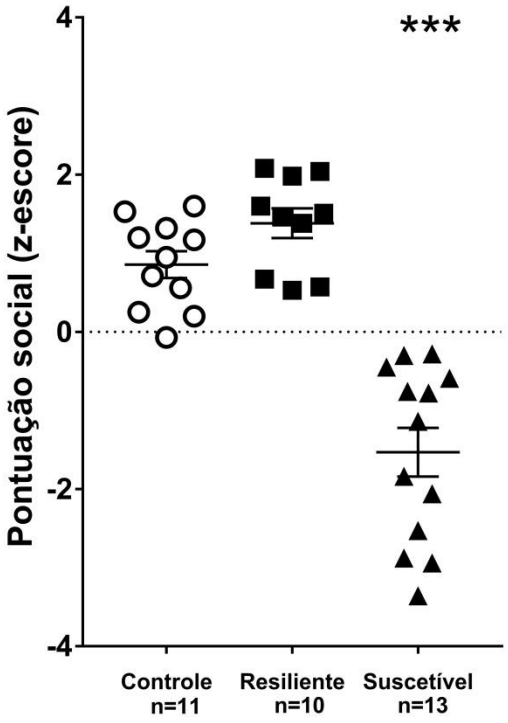


Pontuação final para IS social combinando a latência e o tempo de interação (z-escore) dos animais das séries A e B. Dados representam a média ± EPM. Teste t, p>0,05.

O sinal da pontuação final do z-escore para cada animal dos subgrupos resilientes e suscetíveis foi utilizado como critério de divisão. Os animais que obtiveram pontuação final positiva foram considerados resilientes enquanto aqueles que obtiveram pontuação final negativa, suscetíveis. 10 animais foram considerados resilientes (43,5%) enquanto 13 animais foram considerados suscetíveis (56,5%) para o comportamento de esquiva social no teste de IS.

Os subgrupos controle, suscetível e resiliente apresentaram diferença significante ($F_{(2,31)}$ =29,6, p<0,0001). Os animais do subgrupo suscetível apresentaram uma redução significante na pontuação final obtido pelo método z-score comparado com os animais do grupo controle e resiliente (teste Tukey *post-hoc*: p<0,001) (Fig. 14).

Figura 14- Pontuação final no teste de IS obtido pelo método de z-escore de camundongos machos adolescentes expostos ao estresse social por 10 dias das séries A e B.

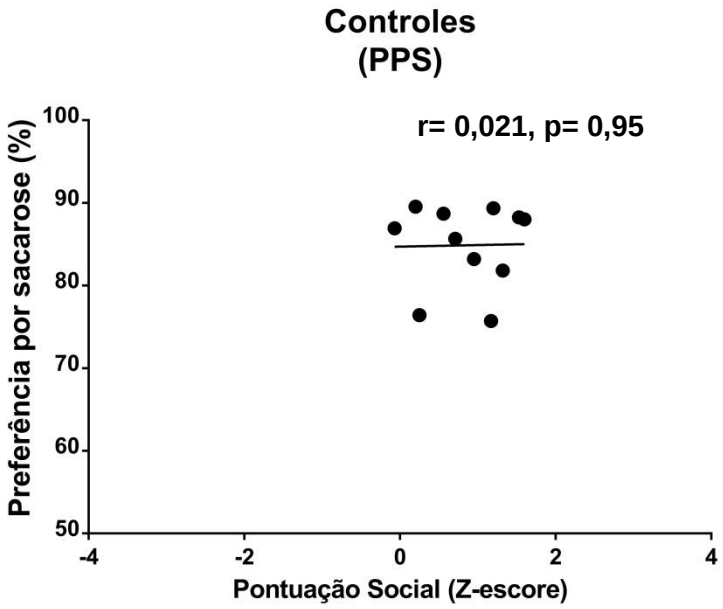


Pontuação final para IS combinando a latência e o tempo de interação (z-escore) dos animais das séries A e B. Dados representam a média ± EPM. GLzM, ****p<0,0001.

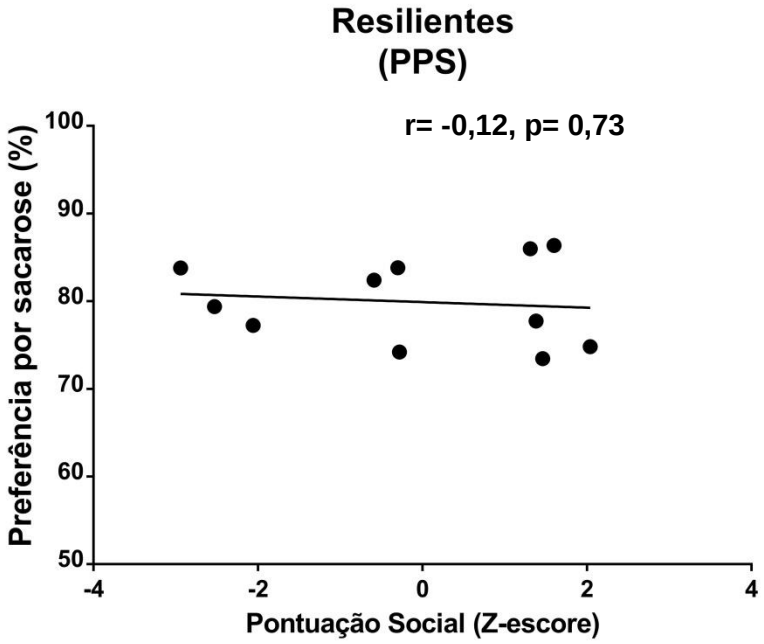
Análises de correlação linear entre os valores de preferência pela solução de sacarose 1% e a pontuação social obtida no teste de IS foram realizadas. Para esta análise, os animais experimentais foram separados em suscetíveis e resilientes de acordo com o teste de PPS. Não existe correlação entre nenhum dos diferentes subgrupos (Pearson, r= 0,019, p= 0,95) para o subgrupo controle (Fig. 15a), (Pearson, r= -0,12 p= 0,73) para o subgrupo resiliente (Fig. 15b) e (Pearson, r= -0,09, p= 076) para o subgrupo suscetível (Fig. 15c).

Figura 15 – Análises de correlação entre os valores de preferência pela solução de sacarose 1% (%) e o pontuação social de camundongos machos adolescentes expostos ao estresse social por 10 dias.

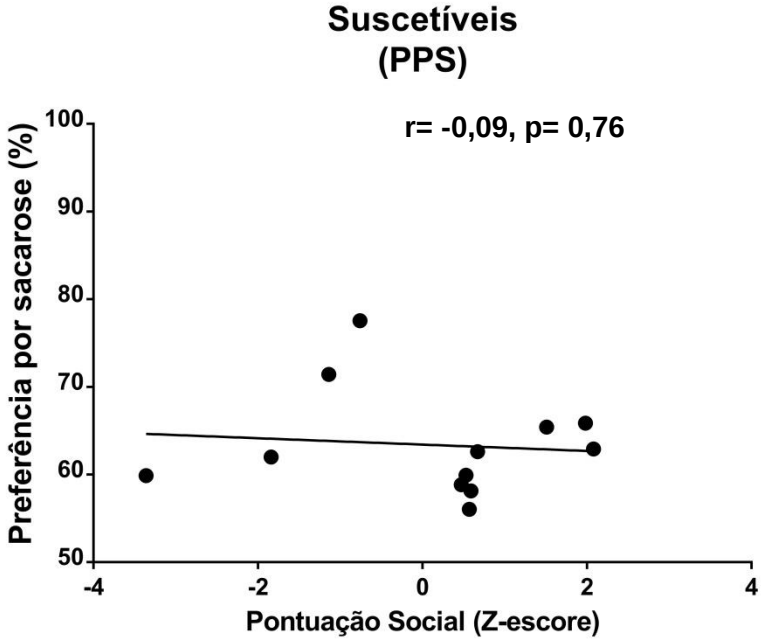
a)



b)



c)

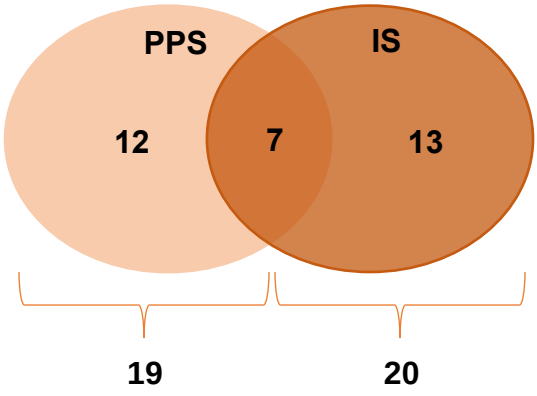


A linha representa a regressão dos dados apresentados. Pearson.

A relação entre os resultados obtidos no teste de PPS e no teste de IS, ou seja, se os animais de um determinado subgrupo (resiliente ou suscetível) em um teste eram os mesmos no outro teste também foi verificada. Os animais suscetíveis aos dois testes (n=7) representam 37% dos animais suscetíveis à anedonia (n=19) e 35% dos animais suscetíveis à esquiva social (n=20) (Fig. 16). Já os animais que eram resilientes aos dois testes (n=5) representavam 31% dos animais resilientes à anedonia (n=16) e 33% dos animais suscetíveis à esquiva social (n=15) (Fig. 16).

Figura 16- Análise dos animais resilientes e suscetíveis classificados para os testes de PPS e de IS.

a) Suscetíveis



b) Resilientes

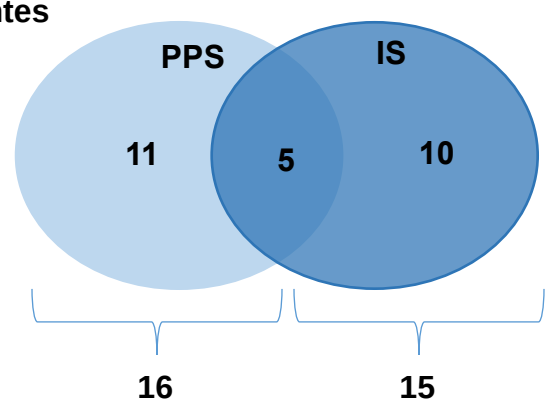


Diagrama de Venn-Euler mostrando os animais (a) suscetíveis e (b) resilientes identificados em ambos os testes (PPS, IS).

4.4 Análises de quantificação gênica do receptor serotoninérgico 5-HT_6 por PCR em tempo real

As análises de expressão gênica foram realizadas no córtex pré-frontal, hipocampo, estriado dorsal e hipotálamo dos animais da série A. Levamos em consideração o comportamento do tipo anedônico dos animais (teste de PPS) para a divisão entre os subgrupos “resiliente” e “suscetível” uma vez que a anedonia é um sintoma bem característico da depressão.

A expressão do ciclofilina A (*Ppia*) não apresentou diferença significante entre os subgrupos em nenhuma das áreas analisadas (GLzM, p>0,05) (Tabela 2), logo este foi considerado um bom gene normalizador para nosso estudo.

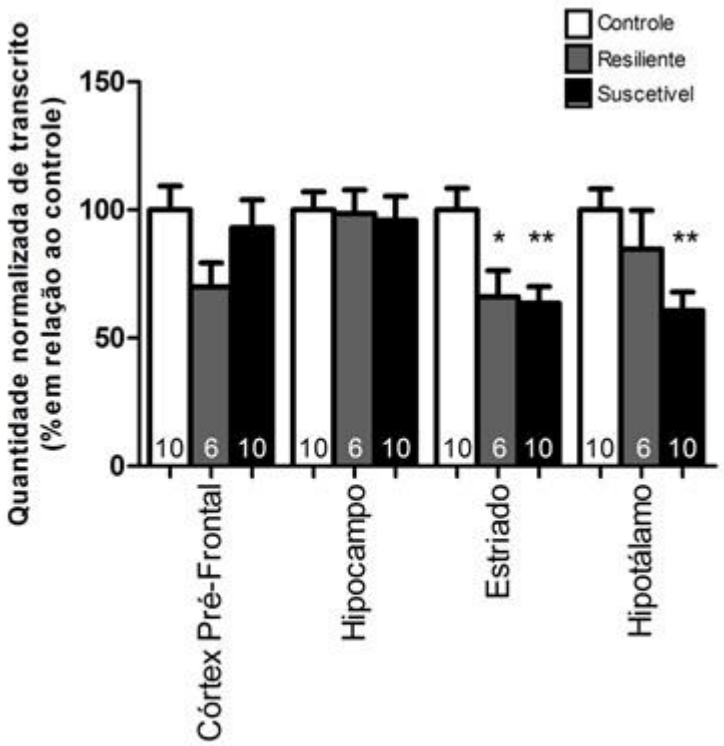
Tabela 2 – Quantidade de transcritos do gene da ciclofilina A (*Ppia*)

Área	Grupo	Gene *Ppia*
Córtex pré-frontal	Controle Resiliente Suscetível	1,00 ± 0,07 1,16 ± 0,05 1,09 ± 0,06
Hipocampo	Controle Resiliente Suscetível	1,00 ± 0,07 1,12 ± 0,05 1,10 ± 0,06
Estriado dorsal	Controle Resiliente Suscetível	1,00 ± 0,06 1,01 ± 0,09 0,90 ± 0,10
Hipotálamo	Controle Resiliente Suscetível	1,00 ± 0,30 0,76 ± 0,15 0,82 ± 0,15

Os dados foram normalizados em relação ao grupo controle e representam a média ± EPM. GLzM, p>0,05.

A expressão gênica do receptor 5-HT_6 não diferiu nos subgrupos controle, resiliente e suscetível (GLzM, p>0,05) no córtex pré-frontal e no hipocampo. No estriado dorsal (GLzM, $F_{(2,23)}$ =6,75, p<0,01) ocorreu uma redução na expressão gênica nos subgrupos resiliente e suscetível (Tukey *post hoc*: p<0,05 e p<0,01, respectivamente) e no hipotálamo (GLzM, $F_{(2,23)}$ =5,1, p<0,05) a expressão gênica também reduziu, porém apenas no subgrupo suscetível (Tukey *post hoc*: p<0,01) (Fig. 17).

Figura 17- Efeito do estresse por derrota social durante 10 dias em camundongos machos adolescentes sobre a expressão gênica do receptor serotoninérgico 5-HT_6 no córtex pré-frontal, no hipocampo, no estriado dorsal e no hipotálamo por qPCR.

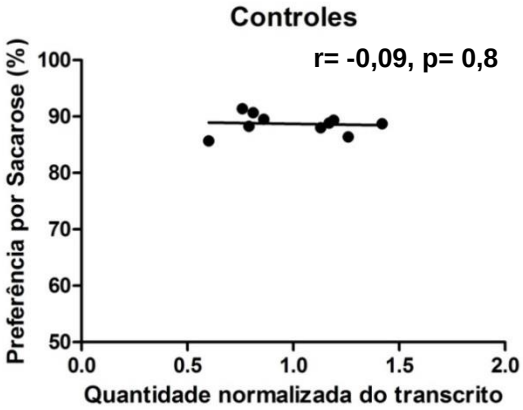


Dados representam a média ± EPM. GLzM, *p<0,05 e **p<0,01.

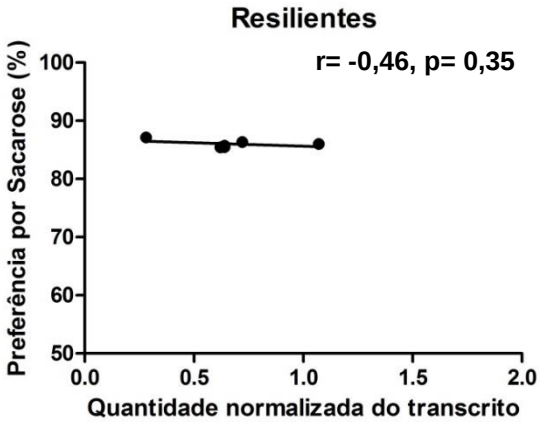
Análises de correlação linear entre os valores de preferência por sacarose 1% e a expressão relativa do transcrito do receptor 5-HT_6 foram realizadas. A preferência por sacarose dos animais suscetíveis se correlaciona com a expressão relativa do transcrito do receptor 5-HT_6 no estriado dorsal (Pearson, r= 0,68, p= 0,02). No hipotálamo não existe correlação em nenhum dos subgrupos (Pearson, p>0,05).

Figura 18 - Análises de correlação entre os valores de preferência pela solução de sacarose 1% (%) e a expressão gênica relativa do transcrito do receptor 5-HT_6 no estriado dorsal de camundongos machos adolescentes expostos ao estresse social por 10 dias.

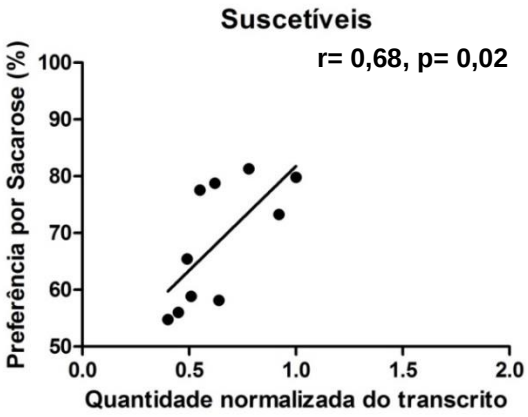
a)



b)



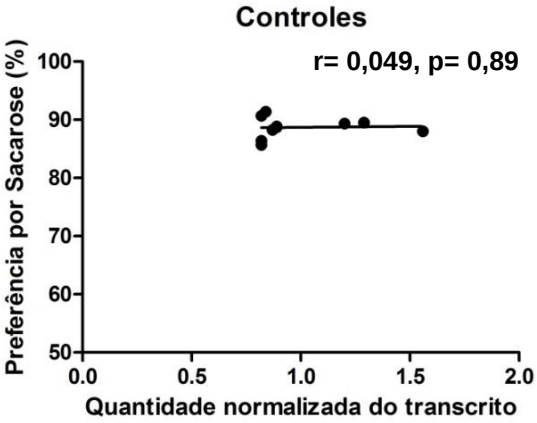
c)



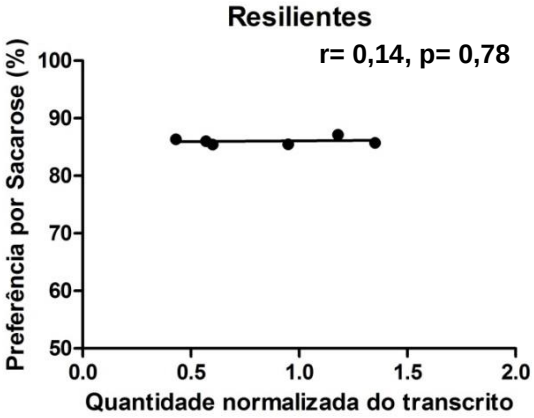
A linha representa a regressão dos dados apresentados. Pearson.

Figura 19 - Análises de correlação entre os valores de preferência pela solução de sacarose 1% (%) e a expressão gênica relativa do transcrito do receptor 5-HT_6 no hipotálamo de camundongos machos adolescentes expostos ao estresse social por 10 dias.

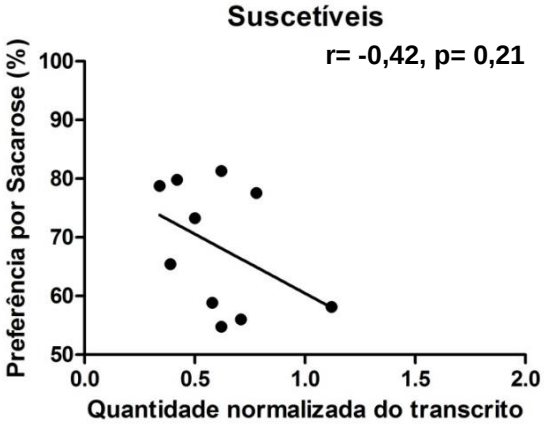
a)



b)



c)



A linha representa a regressão dos dados apresentados. Pearson.

4.5 Análise de quantificação proteica do receptor serotoninérgico 5-HT_6 por ensaio de Imunomarcação

As análises da expressão proteica do receptor 5-HT_6 foram realizadas no córtex pré-frontal, hipocampo e estriado dorsal dos animais da série B. Levamos em consideração o comportamento do tipo anedônico dos animais (teste de PPS) para a divisão entre os subgrupos “resiliente” e “suscetível”.

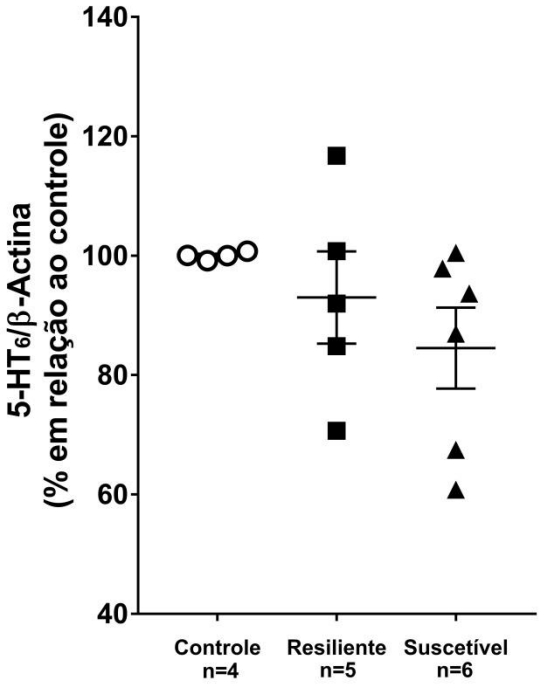
Para cada área foram realizados dois géis contendo 3 animais de cada um dos subgrupos (controle, resiliente e suscetível) totalizando assim 6 animais de cada subgrupo por área.

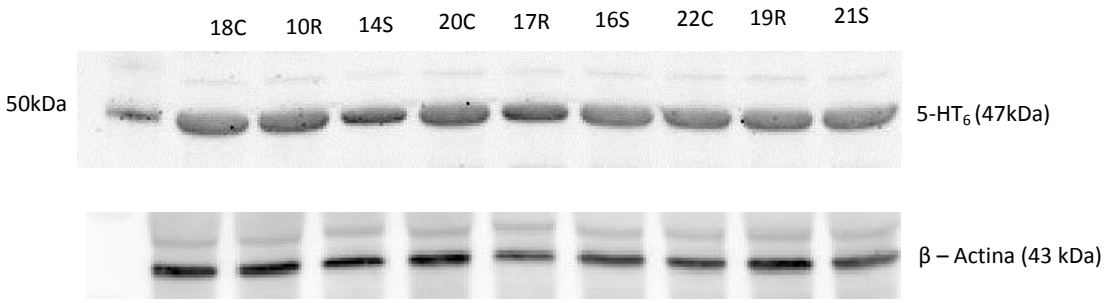
A β-actina e o GAPDH não apresentaram expressões diferentes entre os subgrupos em nenhuma das áreas analisadas, sendo assim bons normalizadores.

A expressão proteica do receptor 5-HT_6 não foi diferente entre os grupos controle, suscetível e resiliente em nenhuma das áreas analisadas (GLzM, $p>0,05$) (Fig. 20a, 20b e 20c).

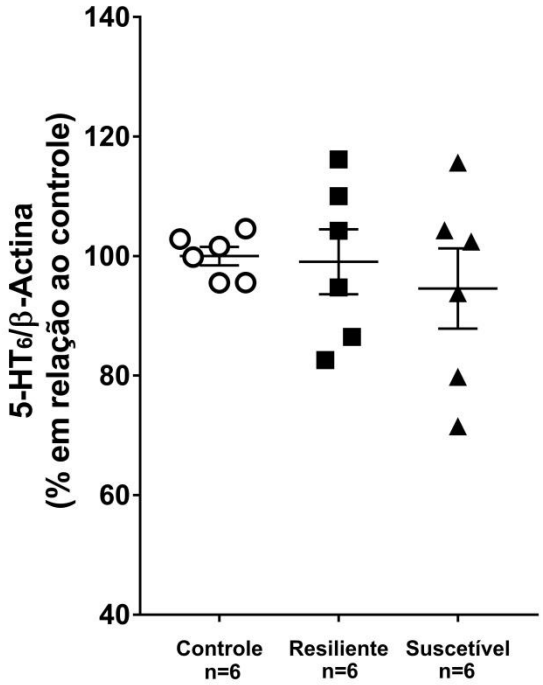
Figura 20- Efeito do estresse por derrota social durante 10 dias em camundongos machos adolescentes sobre a expressão proteica do receptor serotoninérgico 5-HT_6 no córtex pré-frontal, hipocampo e estriado dorsal por imunomarcação. Géis representativos.

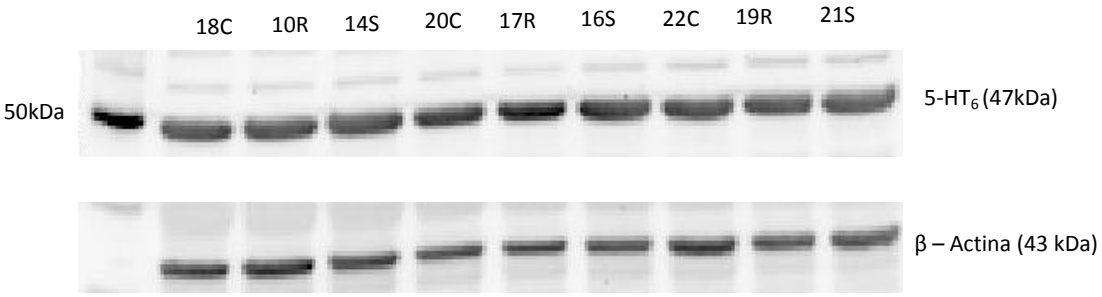
a) Córtex pré-frontal



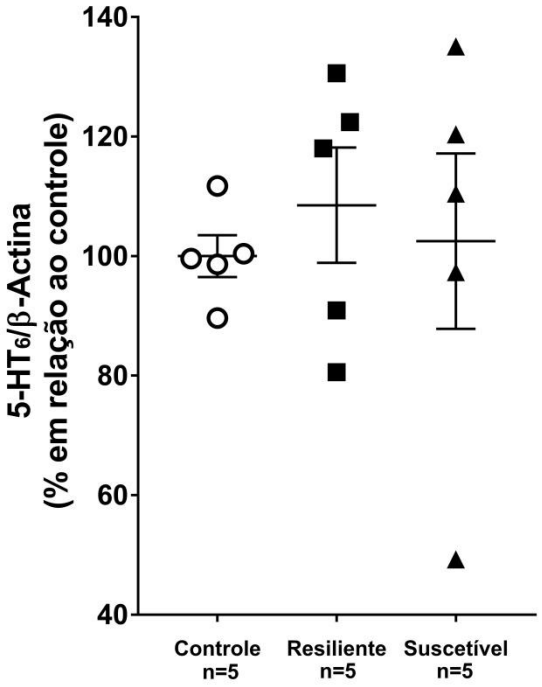

18C
10R
14S
20C
17R
16S
22C
19R
21S
50kDa
5-HT6 (47kDa)
β – Actina (43 kDa)

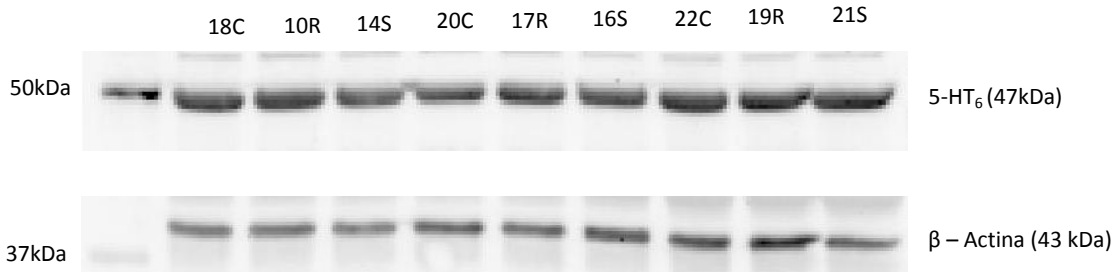
b) Hipocampo


5-HT6/β-Actina
(% em relação ao controle)
140
120
100
80
60
40
Controle
n=6
Resiliente
n=6
Suscetível
n=6

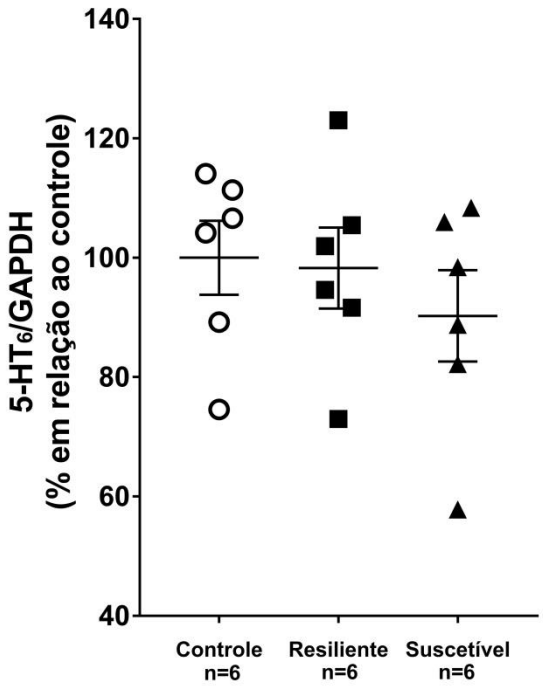

18C
10R
14S
20C
17R
16S
22C
19R
21S
50kDa
5-HT6 (47kDa)
β – Actina (43 kDa)

c) Estriado dorsal

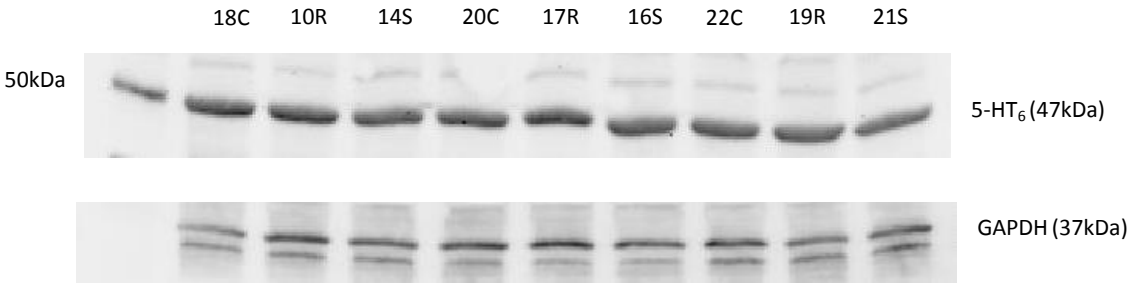




d) Hipotálamo



Dados representam a média ± EPM. (a), (b) e (c): GLzM, p>0,05.



C: animal controle, R: animal resiliente, S: animal suscetível. Os números representam os animais de onde as amostras são provenientes.

4.6 Análises da expressão proteica do receptor serotoninérgico 5-HT_6 por imunoistoquímica

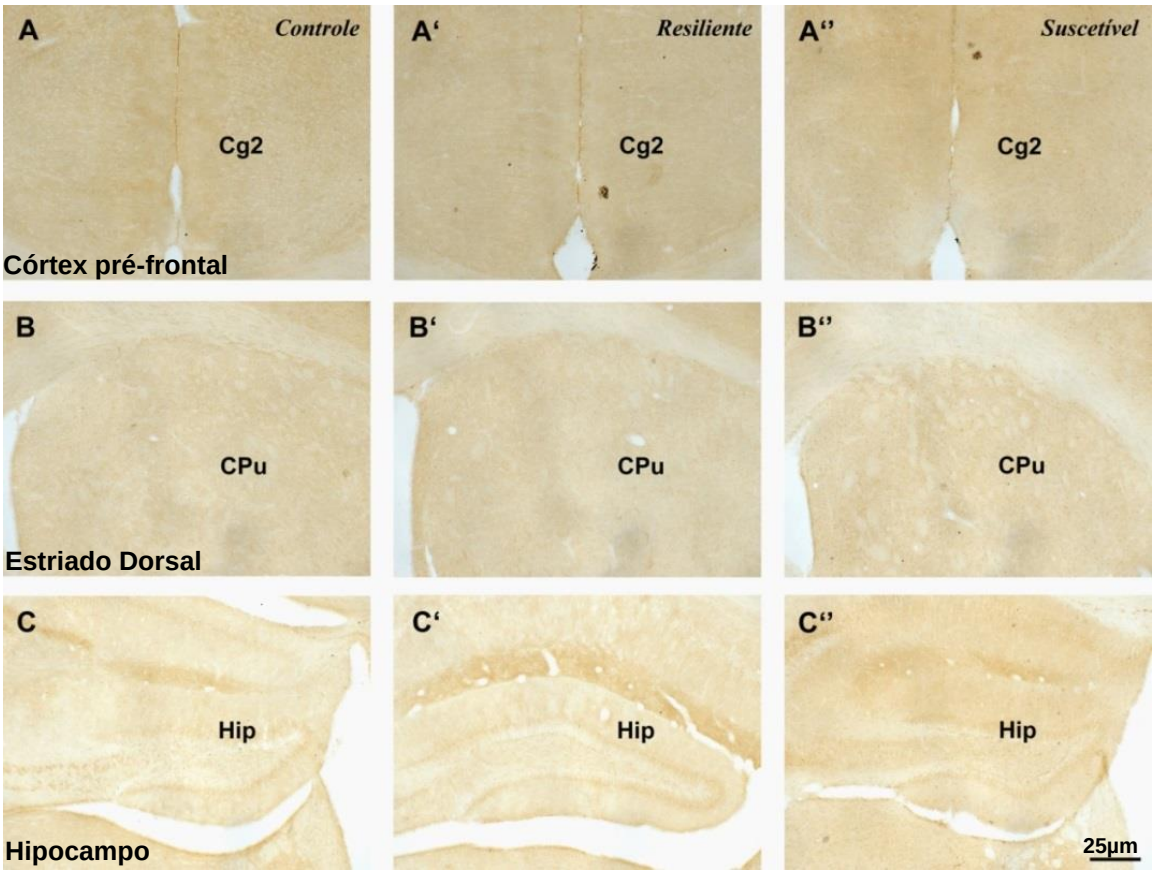
As análises de expressão proteica foram realizadas no córtex pré-frontal, estriado dorsal, hipocampo, tubérculo olfatório e núcleo paraventricular do hipotálamo dos animais da série C. Levamos em consideração o comportamento do tipo anedônico dos animais (teste de PPS) para a divisão entre os subgrupos “resiliente” e “suscetível”.

Para cada área analisada foram observados 6 lâminas de cada subgrupo (controle, resiliente e suscetível) sempre nas secções do mesmo nível.

No córtex pré-frontal, estriado dorsal e hipocampo não foram encontrados neurônios imunorreativos (Fig. 21a). O tubérculo olfatório apresentou marcação na cília neuronal (processos axonais), porém esta não foi quantificável pois os cílios são muito pequenos e apresentavam uma ligeira alteração no número dependendo do foco utilizado (Fig. 21b). Já o núcleo paraventricular do hipotálamo apresentou marcação nuclear, porém não diferiu entre os subgrupos (GLzM, $p>0,05$) (Fig. 21c e 21d).

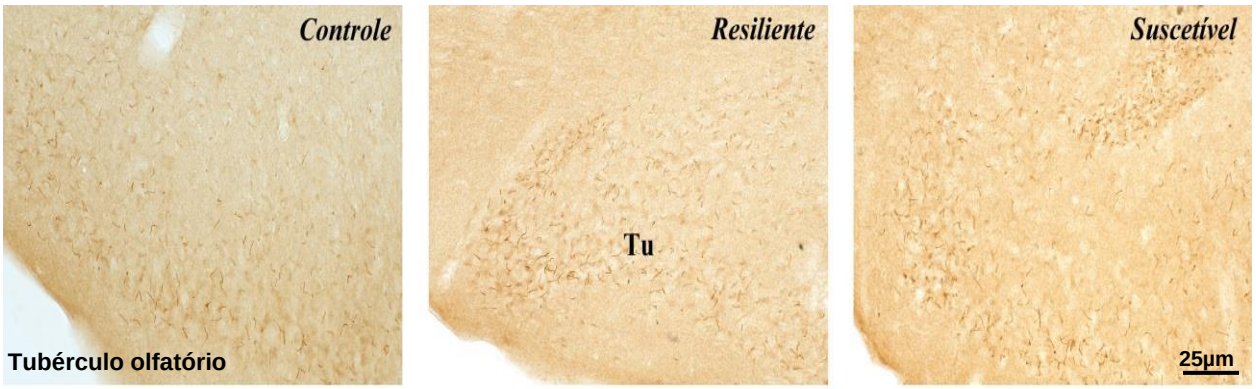
Figura 21- Efeito do estresse por derrota social durante 10 dias em camundongos machos adolescentes sobre a expressão proteica do receptor serotoninérgico 5-HT_6 no (a) córtex pré-frontal, estriado dorsal e hipocampo, (b) tubérculo olfatório e (c) núcleo paraventricular do hipotálamo por imunoistoquímica.

a) Córtex pré-frontal, estriado dorsal e hipocampo



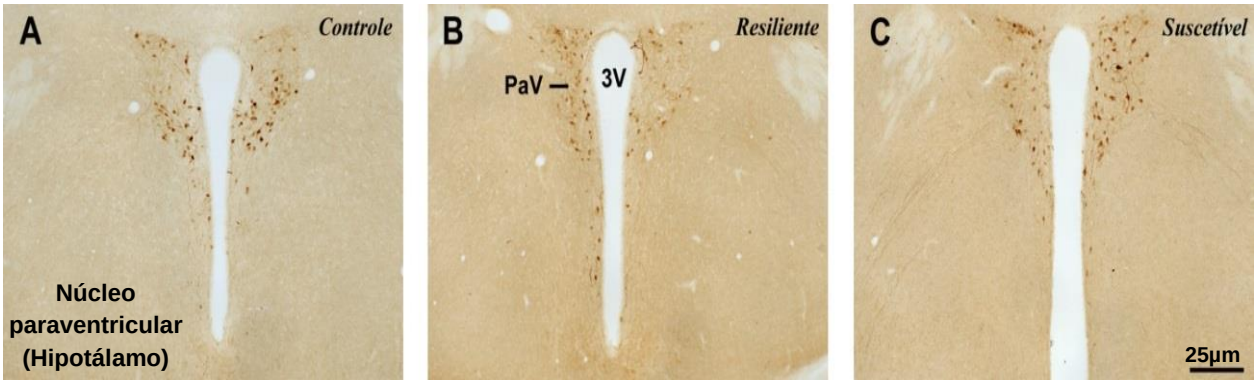
Cg2: córtex cingulado, CPu: caudado putâmen, Hip: hipocampo.

b) Tubérculo Olfatório



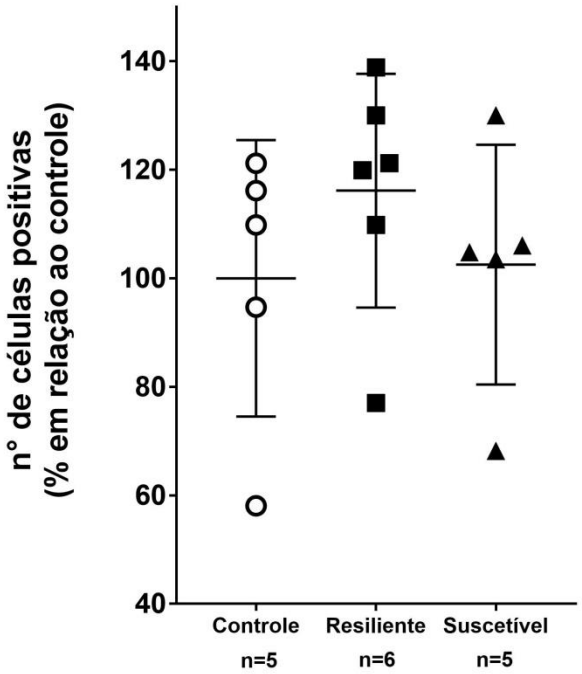
Tu: tubérculo olfatório.

c) Núcleo paraventricular do hipotálamo



PaV: núcleo paraventricular, 3V: terceiro ventrículo.

d) Quantificação dos neurônios marcados no núcleo paraventricular do hipotálamo



Dados representam a média ± EPM. GLzM, p>0,05.

5 DISCUSSÃO

Sabe-se que o objetivo de um modelo animal é representar, da maneira mais completa possível, os aspectos de uma determinada doença de forma semelhante ao que ocorre nos humanos. Para isso os modelos devem apresentar três importantes características: primeiramente os sinais apresentados pelos animais devem ser os mesmos que os observados nos humanos, em segundo lugar a etiolologia da doença deve ser a mesma e finalmente o mesmo tratamento deve responder em ambos (Chiavegatto, 2011).

Existem hoje vários modelos animais para depressão, como o nado forçado, o estresse por restrição, o estresse crônico imprevisível, entre outros (Vitale et al. 2009; Krishnan, Nestler, 2011; Darcet et al., 2016). Porém, estes apresentam deficiências principalmente no que diz respeito à etiologia, uma vez que não simulam as causas da depressão nos humanos, bem como não são situações rotineiras para os roedores.

O modelo de subjugação social (utilizado em nosso estudo), devido ao citado acima, representa de forma mais adequada a etiologia da depressão, principalmente ao se estudar o período da adolescência. Neste modelo, o animal de estudo é colocado no mesmo ambiente que um animal maior e mais agressivo, e então passa, em dias sucessivos, por situações de submissão. Essa situação de dominância/submissão modela de maneira eficiente o *bullying* que ocorre nos humanos (principalmente na infância e na adolescência), o que é de grande valia levando em conta que estresses de cunho social, onde o *bullying* se enquadra, são uma das maiores causas de transtornos psiquiátricos como a depressão (Buwalda et al., 2010).

Em nosso trabalho, o modelo de subjugação social foi capaz de induzir alterações comportamentais do tipo depressivo (teste de preferência por sacarose) e de esquiva social (teste de interação social). Isto apresenta concordância com a literatura tanto em camundongos adultos (Strekalova et al., 2004; Krishnan et al., 2007; Golden et al., 2011), quanto em camundongos adolescentes (Alves-dos-Santos, 2014; Iñiguez et al., 2014; Resende et al., 2016). Esses resultados apresentam grande relevância uma vez que os testes utilizados, preferência por sacarose e interação social, avaliam a anedonia (falta de motivação pela busca do prazer) e a fobia social, respectivamente, e

já é bem descrito que estes sintomas (em especial a anedonia) apresentam relação com a depressão.

Sabe-se que as respostas de diferentes organismos ao estresse pode ser distinta. Nesse sentido, alguns trabalhos (Strekalova et al., 2004; Krishnan et al., 2007) evidenciaram a existência de dois subgrupos, os resilientes e os suscetíveis ao estresse. Resultados semelhantes a estes foram observados nos estudos conduzidos em nosso laboratório (Alves-dos-Santos, 2014; Resende et al., 2016; Salvador-Carrillo, 2017). Todos observaram que aproximadamente 60% dos animais respondiam negativamente ao estresse, enquanto que os demais não apresentavam alterações no comportamento, se comportando da mesma forma que os animais não subjugados. Vale a pena ressaltar, que essa separação em diferentes subgrupos ocorre tanto em relação à anedonia, quanto à esquiva social.

No teste de PPS observou-se que aproximadamente 52% dos animais foram suscetíveis à subjugação prolongada enquanto que os demais foram considerados resilientes, resultados estes que corroboram os dados já demonstrados, tanto para camundongos adultos (Strekalova et al., 2004), quanto para camundongos adolescentes (Alves-dos-Santos, 2014; Resende et al., 2016; Salvador-Carrillo, 2017).

No teste de IS verificou-se que aproximadamente 57% dos animais foram suscetíveis à subjugação prolongada, e da mesma forma que para o teste de PPS, os resultados obtidos vão de encontro à literatura (Krishnan et al., 2007). Aqui vale a ressalva de que o trabalho de Krishnan e colaboradores utilizou camundongos CD-1 como “isca” (animais que ficam dentro do cilindro na área de interação), o que pode acarretar um viés, uma vez que esta é a linhagem dos animais utilizados como agressores. Nosso trabalho utilizou como isca animais da mesma linhagem e idade que os animais experimentais, o que, teoricamente, permite que os comportamentos exibidos estejam relacionados à esquiva a uma interação social de forma generalizada, e não pela associação mais direta com o agressor. Ao usar um CD-1 como “isca”, os animais poderiam não estar interagindo, pois possuem a lembrança dos episódios de subjugação, o que não ocorre ao usar animais com as mesmas características dos experimentais.

Interessantemente, não existe uma correlação entre os dois tipos de comportamento (anedonia e esquiva social), ou seja, os animais subjugados de um determinado subgrupo no teste de PPS, não necessariamente pertencem ao mesmo subgrupo no teste de IS. Observou-se que os animais que eram suscetíveis aos dois testes (totalmente suscetíveis) representavam 37% dos animais suscetíveis à anedonia e 35% dos animais suscetíveis à esquiva social. Os animais que eram resilientes aos dois testes (totalmente resilientes) representavam 31% dos animais resilientes à anedonia e 33% dos animais suscetíveis à esquiva social. Isso demonstra que os comportamentos de anedonia e de esquiva social podem estar dissociados. O primeiro estaria mais relacionado à depressão, por se tratar de um sintoma mais característico deste transtorno (Strekalova et al., 2004; Alves-dos-Santos, 2014; Heshmati, Russo, 2015), enquanto o segundo, apesar de poder fazer parte da sintomatologia da depressão, estaria mais relacionado à transtornos de ansiedade (Toth e Neumann, 2013; Whitaker et al., 2015).

Os animais experimentais e os controles não diferiram em relação ao ganho de peso neste protocolo de 10 dias de estresse, o que se assemelha à literatura existente (Krishnan et al., 2007), e também aos resultados já encontrados em nosso laboratório (Alves-dos-Santos, 2014; Salvador-Carrillo, 2017). Porém, alguns trabalhos utilizando animais adultos demonstraram uma redução no ganho de peso após outros protocolos de subjugação social (Razzoli et al., 2011; Yu et al., 2011).

Nosso grupo de pesquisa vem estudando o modelo de subjugação prolongada em adolescentes há mais de 8 anos (Pereira-Junior, 2008; Alves-dos-Santos, 2014; Resende et al., 2016; Salvador-Carrillo, 2017), mas existem outros grupos também interessados nessa mesma abordagem utilizando diferentes protocolos. Huang e colaboradores (2013) realizaram a separação dos subgrupos “resilientes” e “suscetíveis” baseados no teste de IS, que foi conduzido 10 dias após o término do protocolo de subjugação social prolongada. Além desta diferença, a fase de pareamento físico foi de 10 minutos, o que poderia explicar a taxa de 21,3% de morte dos animais. Iñiguez e colaboradores (2014) realizaram um protocolo semelhante ao do nosso trabalho, porém sem a separação dos subgrupos, e observaram comportamentos do tipo depressivo nos testes de nado forçado e PPS, além de uma redução na IS.

Recentemente, nosso próprio grupo de pesquisa publicou um estudo utilizando um protocolo de 21 dias de subjugação social prolongada (Resende et al., 2016). Neste protocolo, os animais apresentaram comportamentos do tipo depressivo (PPS), mas não comportamentos ansiosos (labirinto em cruz elevada). Acredita-se que a ausência de ansiedade generalizada se deva ao suporte social, uma vez que os animais voltavam para a gaiola moradia após cada episódio de subjugação, durante todo o protocolo.

Assim, podemos destacar os principais pontos da abordagem comportamental desse trabalho:

- O modelo de subjugação social utilizado é uma ferramenta adequada, uma vez que, modela de maneira mais fidedigna o estresse social sofrido pelos adolescentes, ou seja, apresenta uma boa validade etiológica;
- A separação nos subgrupos “resilientes” e “suscetíveis” à subjugação social foi feita através do teste de PPS, uma vez que a anedonia é um dos principais sintomas da depressão;
- A anedonia desenvolvida em camundongos adolescentes expostos ao estresse social prolongado não apresenta, necessariamente, uma associação com o comportamento de esquiva social.

A segunda abordagem nesse trabalho foi verificar as alterações na expressão gênica e proteica do receptor serotoninérgico 5-HT_6 no córtex pré-frontal, no hipocampo, no estriado dorsal e no hipotálamo dos animais adolescentes que passaram pelo protocolo de subjugação social prolongada de 10 dias.

Diversos trabalhos reportaram uma redução nos níveis de 5-HT, em diferentes áreas cerebrais, em animais que passaram por algum modelo animal de depressão, como o estresse crônico imprevisível e a separação materna (Wong et al., 2015; Sun et al., 2016; de Lima et al., 2017). Estes resultados vão de encontro com a principal teoria para a neurobiologia da depressão, a teoria monoaminérgica, que postula que a depressão é causada por uma redução nos níveis de monoaminas, em especial 5-HT e noradrenalina, nas sinapses monoaminérgicas. Esta teoria é bastante antiga, foi formulada inicialmente por Schildkraut em 1965 e por Persson e Ross em 1967, e apresenta uma visão extremamente simplista para a neurobiologia da depressão,

porém até os dias de hoje os inibidores seletivos da recaptura da serotonina (ISRS), tratamento cujo mecanismo de ação se baseia na teoria monoaminérgica, são os fármacos mais utilizados para o tratamento da depressão (Poluzzi et al., 2013).

Diferentes laboratórios vêm explorando o sistema serotoninérgico ao estudar a depressão. As principais abordagens são em relação aos receptores 5-HT_{1A} e 5-HT_{1B} (Bibancos et al., 2007; Kieran et al., 2010; Furay et al., 2011). Kieran e colaboradores (2010) verificaram uma redução na expressão do receptor 5-HT_{1A} no córtex pré-frontal de ratos adultos subjugados cronicamente. O grupo de pesquisa de Furay, em 2011, demonstrou que ratos adultos que passaram por um protocolo crônico de subjugação social tiveram um aumento da expressão do receptor 5-HT_{1B} no núcleo *acumbens*. Em nosso laboratório, Bibancos e colaboradores verificaram que camundongos isolados socialmente, logo após o desmame, apresentaram uma redução da expressão gênica do receptor 5-HT_{1A} no córtex pré-frontal, bem como uma redução da expressão gênica do receptor 5-HT_{1B} no córtex pré-frontal e no hipotálamo.

Além disso, estudos envolvendo o transportador 5-HTT também vêm sendo realizados. Bartolomucci e colaboradores (2010) observaram que camundongos heterozigotos para o gene do 5-HTT apresentavam uma maior vulnerabilidade ao estresse quando subjugados cronicamente, em relação aos camundongos selvagens submetidos a este mesmo protocolo. Este resultado sugere um papel protetor para o transportador 5-HTT nos efeitos do estresse.

Em relação ao receptor serotoninérgico 5-HT_6, nossos dados de expressão gênica via qPCR, realizados para a primeira série experimental, demonstraram reduções significantes no estriado (em ambos os subgrupos) e no hipotálamo (apenas nos suscetíveis) dos animais subjugados socialmente. No córtex pré-frontal destes mesmos animais, verificamos uma tendência de redução no subgrupo dos resilientes.

O córtex pré-frontal é uma área cerebral de extrema importância para o estudo da depressão por desempenhar um papel de destaque na resposta frente ao estresse (Price e Drevets, 2009). Tendo isto em vista, nosso resultado é discordante aos dados prévios do nosso laboratório obtidos por Bibancos e colaboradores em outro modelo de estresse social. Neste estudo, camundongos foram privados de contato físico social logo após o desmame. Após um período de 6 semanas de isolamento social, foram

observados comportamentos do tipo depressivo associados a uma redução da expressão gênica do receptor 5-HT_6 no córtex pré-frontal. Aparentemente, esses dados mostram que diferentes tipos de estresse social (subjugação social prolongada e isolamento social) podem modular a expressão gênica do receptor 5-HT_6 de maneira distinta.

O estriado dorsal é uma área primariamente conhecida por sua participação na aquisição e no aprendizado de movimentos (Baik, 2013; Beeler et al., 2014), enquanto que o estriado ventral tem sua importância em comportamentos compulsivos e também de recompensa e motivação (Yin, Knowlton, 2006). Inicialmente usamos o estriado dorsal como uma área cerebral que representasse um controle negativo em nosso estudo, devido a sua participação majoritária no controle motor do organismo. Porém, observamos reduções da expressão do receptor 5-HT_6 em ambos os subgrupos estudados (resilientes e suscetíveis), demonstrando que esta área também foi sensível aos efeitos do estresse. Isto vem se repetindo em nosso laboratório, onde estudos anteriores também verificaram diversas alterações moleculares no estriado dorsal de camundongos adolescentes submetidos ao protocolo de subjugação social prolongada (Resende et al., 2016; Salvador-Carrillo, 2017), o que reforça uma possível relação desta área com o estresse psicossocial. Em complemento, estudos em humanos deprimidos (adolescentes e adultos) vêm demonstrando alterações na conectividade do estriado dorsal (Gabbay et al., 2013; Kerestes et al., 2014). Apesar da participação do estriado dorsal na depressão ainda ser pouco estudada, nossos resultados parecem ser promissores, indicando uma possível relação entre esta área cerebral e os efeitos do estresse.

Em relação ao hipotálamo, que é uma região com uma importante participação no controle do balanço energético do organismo (Morrison, Nakamura, 2011; Cornejo et al., 2016; López et al., 2016), nossos resultados são interessantes. Já é bem descrito na literatura que a redução da expressão, ou até mesmo o bloqueio do receptor 5-HT_6, seja este farmacológico ou genético, leva à perda de peso, hipofagia, saciedade entre outros comportamentos alimentares (Garfield et al., 2014; Dudek et al., 2015; Higgs et al., 2015). Apesar de nossos resultados para o ganho de peso não apresentarem diferença significante (apenas uma tendência de redução), já foram relatados estudos

encontrando uma redução do peso (Razzoli et al., 2011; Yu et al., 2011). Isto poderia ser explicado por diferenças no protocolo de subjugação social, principalmente com relação à duração do mesmo. Nesse sentido, Kudryavtseva e colaboradores (1991) observaram que camundongos adultos C57BL/6 apresentaram diminuição do peso corporal somente com um protocolo de 20 dias subjugação social. Desta forma, possivelmente o período mais curto de 10 dias na adolescência não foi suficiente para revelar uma redução de peso estatisticamente significante, porém foi suficiente para refletir a alteração na expressão dos transcritos do receptor 5-HT_6. O mecanismo proposto para este processo sugere que o bloqueio do receptor 5-HT_6 provoque uma redução da sinalização gabaérgica seguida da liberação aumentada do hormônio liberador de alfa-melanócitos (α-MSH), que tem uma importante função de suprimir o apetite (Wooley et al., 2004; Holenz et al., 2006). Neste sentido, seria interessante também quantificar o α-MSH em nossos animais.

De forma intrigante, nossos dados da quantificação de proteínas por immunoblot, referentes à segunda série experimental, não demonstraram nenhuma diferença significante na expressão do receptor serotoninérgico 5-HT_6 no córtex pré-frontal, no hipocampo, no estriado e no hipotálamo. Esses resultados apontam na mesma direção que os nossos dados para a imunoistoquímica. A distribuição de neurônios imunorreativos para o receptor 5-HT_6 (referentes à terceira série experimental), pode ser visualizada no núcleo paraventricular do hipotálamo e no tubérculo olfatório, porém não foram identificadas no córtex pré-frontal, no hipocampo e no estriado. Esses resultados reforçam a diferença já descrita na literatura acerca da quantidade desta proteína no camundongo, em comparação a ratos e humanos. Hirst e colaboradores (2003), através de estudos comparando a ligação de compostos (*binding*) ao receptor 5-HT_6, em diferentes áreas cerebrais, entre estas 3 espécies animais, e verificaram que eram bem menores em camundongos. De fato, a maioria dos trabalhos com o objetivo de determinar a localização/quantificação proteica do receptor 5-HT_6, são baseados em ensaios não imunorreativos, tais como hibridização *in situ* (Yoshioka et al., 1998) e autorradiografia (Roberts et al., 2002). Isto, provavelmente, reflete a indisponibilidade de anticorpos para o receptor 5-HT_6 bem estabelecidos. Em nossos experimentos, utilizamos 2 anticorpos policlonais, de fabricantes diferentes (Abcam e Santa Cruz).

Apesar de ambos apresentaram resultados semelhantes para a imunomarcação (blot), apenas aquele da Abcam se mostrou mais seletivo na imunoistoquímica, enquanto o outro gerou muitas marcações inespecíficas. Desta forma, a baixa expressão da proteína HTR6 em camundongos, associada à dificuldade de obtenção de anticorpos mais sensíveis, seriam fatores que poderiam explicar os resultados não concordantes entre expressão gênica e proteica. Neste caso, seria interessante usarmos ensaios não dependentes de anticorpos para a quantificação proteica.

Por outro lado, a imunomarcação, no tubérculo olfatório, foi encontrada nas cílias neuronais. Estas são organelas microtubulares que se estendem do corpo celular para o espaço extra sináptico e participam no controle das sinalizações provenientes do meio extracelular (Arellano et al., 2012). Brodsky e colaboradores em 2017, também verificaram uma imunomarcação no interior das cílias neuronais, porém isto foi descrito no estriado, área de interesse neste estudo. Além disso, observaram que o receptor 5-HT_6 é capaz de modular as propriedades morfológicas da cília neuronal, o que poderia explicar a participação deste receptor na sinalização de outros neurotransmissores.

Em resumo, os principais pontos da abordagem molecular desse trabalho são:

- A expressão gênica do receptor serotoninérgico 5-HT_6 no hipotálamo parece estar relacionada com os fenômenos de resiliência e suscetibilidade aos efeitos negativos do estresse psicossocial prolongado em adolescentesuma vez que sua redução somente foi observada na suscetibilidade;
- A redução da expressão gênica do receptor 5-HT_6 no estriado dorsal frente ao estresse psicossocial ocorre independentemente da resiliência ou suscetibilidade aos seus efeitos deletérios;
- A localização imunoistoquímica do receptor serotoninérgico 5-HT_6 ocorreu somente no núcleo paraventricular do hipotálamo e no tubérculo olfatório, sendo que neste último a marcação se encontra na cília neuronal;
- A expressão proteica do receptor serotoninérgico 5-HT_6, com os imunoensaios utilizados, não apresenta diferença em nenhuma das áreas cerebrais analisadas.

6 CONCLUSÃO

O presente estudo demonstrou que o modelo de subjugação social em camundongos machos adolescentes foi capaz de induzir alterações comportamentais do tipo depressivo, e de esquiva social, em uma população de animais suscetíveis. Interessantemente, demonstramos que não existe uma relação entre a anedonia e a esquiva social, ou seja, possivelmente as vias neurais que têm participação na anedonia são diferentes das relacionadas à esquiva social.

Através das análises moleculares, observamos uma possível relação entre a expressão gênica do receptor serotoninérgico 5-HT_6 no hipotálamo e a suscetibilidade ao estresse psicossocial em camundongos adolescentes, uma vez que sua expressão estava reduzida somente no subgrupo dos suscetíveis. Estes resultados sugerem que a redução do efeito da serotonina, via receptores 5-HT_6 no hipotálamo, poderia participar dos efeitos do estresse mediados por esta área cerebral. A hipótese de uma relação causal deverá ser investigada.

A redução da expressão gênica do receptor 5-HT_6 no estirado dorsal, em ambos os subgrupos, indica uma vulnerabilidade desta área frente ao estresse psicossocial, porém, de forma independente à resiliência e suscetibilidade aos seus efeitos anedônicos.

Além disso, mostramos que apesar de camundongos apresentarem uma baixa expressão proteica do receptor 5-HT_6 no SNC, quando comparada aos humanos e ratos, o núcleo paraventricular do hipotálamo e o tubérculo olfatório são áreas onde este receptor se expressa em quantidades significativas nesta espécie durante a adolescência.

Estes resultados representam uma importante contribuição acerca do receptor 5-HT_6. De forma inédita, demonstramos uma relação entre sua expressão gênica hipotalâmica, e as respostas anedônicas frente ao estresse psicossocial em animais adolescentes. Adicionalmente, reportamos sua localização proteica em áreas cerebrais de camundongos, até então não relatadas.

Futuramente, será necessário um estudo detalhado dos mecanismos moleculares envolvidos nessas alterações cerebrais pontuais da expressão gênica do receptor 5-HT_6, bem como o entendimento do papel que estas alterações possuem frente ao estresse psicossocial e aos efeitos anedônicos.

REFERÊNCIAS*

Alves-dos Santos L. 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.

Arellano, JI, Guadiana, SM, Breunig, JJ, Rakic, P, Sarkisian, MR. Development and distribution of neuronal cilia in mouse neocortex. J. Comp. Neurol. 2012; 520: 848–73.

Baik, JH. Dopamine signaling in reward-related behaviors. Front. Neural Circuits. 2013; 7: 152.

Barnes NM, Sharp T. A review of central 5-HT receptors and their function. Neuropharmacology. 1999; 38(8): 1083-152.

Bartolomucci A, Carola V, Pasucci T, Puglisi-Allegra S, Cabib S, Lesch KP, Parmigiani S, Palanza P, Gross C. Increased vulnerability to psychosocial stress in heterozygous serotonin transporter knockout mice. Disease models and mechanisms. 2010; 3: 459-70.

Beeler, JA, Cools, R, Luciana, M, Ostlund, SB, Petzinger, G. A kinder, gentler dopamine highlighting dopamine's role in behavioral flexibility. Front. Neurosci. 2014; 8: 4.

Berton O, Durand M, Aguerre S, Mormede P, Chaouloff F. Behavioral, neuroendocrine and serotonergic consequences of single social defeat and repeated fluoxetine pretreatment in the Lewis rat strain. Neuroscience. 1999; 92: 327-41.

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 Aug;6(6):529-39.

Blakemore SJ. The social brain in adolescence. Nat Rev Neurosci. 2008; 9: 267-277.

* 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

Blanchard RJ, McKittrick CR, Blanchard DC. Animal models of socialstress: effects on behavior and brain neurochemical systems. PhysiolBehav. 2001; 73: 261-71.

Branchek, TA, Blackburn, TP. 5-HT6 receptors as emerging targets for drug discovery. Ann. Rev. Pharmacol. 2000; 40:319–34.

Brodsky M, Lesiak AJ, Croicu A, Cohenca N, Sullivan JM, Neumaier JF. 5-HT6receptor blockade regulates primary cilia morphology in striatal neurons. Brain Research. 2017; 10–19.

Brown GW, Harris T. Social origins of depression: a reply. Psychological Medicine. 1978; 8(4): 577-588.

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.

Buwalda B, Kole MH, Veenema AH, Huininga M, De Boer SF, Korte SM, et al.Long-term effects of social stress on brain and behavior: a focus onhippocampal functioning. Neurosci Biobehav Rev. 2005; 29: 83-97.

Chang, et al. Economic burden of depression in South Korea. Soc Psychiatry Psychiatr Epidemiol, 2012; 47:683-89.

Charney, DS. Psychobiological mechanisms of resilience andvulnerability: implications for successful adaptation to extreme stress.Am. J. Psychiatry. 2004; 161, 195–216.

Chiavegatto S. Metodologia em Modelos Animais. In: Miguel EC; Gentil V; Gattaz WF.(Org.).ClínicaPsiquiátrica. Barueri: Manole; 2011: 2080-8.

Codony, X, Vela, JM, Ramírez, MJ. 5-HT6 receptor and cognition. Curr. Opin. Pharmacol. 2010; 11 (1): 94–100.

Cornejo,MP., Hentges,ST, Maliqueo,M, Coirini,H, Becu-Villalobos,D, and Elias,CF. Neuroendocrine Regulation of Metabolism. J Neuroendocrinol. 2016; 28.

Darcet F, Gardier AM, Gaillard R, David DJ, Guilloux JP. Cognitive Dysfunction in Major Depressive Disorder. A Translational Review in Animal Models of the Disease. Pharmaceuticals 2016, 9(1), 9 – 51.

Davidson JR. Major depressive disorder treatment guidelines in America and Europe. J ClinPsychiatry. 2010; 71: 04.

Dawson LA., Li P. Effects of 5-HT6 receptor blockade on the neurochemical outcome of antidepressant treatment in the frontal cortex of the rat. J Neural Transm. 2003; 110: 577 – 90.

Dawson L A., Nguyen HQ, Li P. In vivo effects of the 5-HT6 antagonist SB-271046 on striatal and frontal cortex extracellular concentrations of noradrenaline, dopamine, 5-HT, glutamate and aspartate. Br J Pharmacol. 2000; 130: 23 – 26.

de Lima AP, Sandini TM, Reis-Silva TM, Massoco CO. Long-lasting monoaminergic and behavioral dysfunctions in a mice model of socio-environmental stress during adolescence. Behav Brain Res. 2017; 317: 132–40.

Dudek M, Marcinkowska M, Bucki A, Olczyk A, Kołaczkowski M. Idalopirdine – a small molecule antagonist of 5-HT6 with therapeutic potential against obesity. Metab Brain Dis. 2015; 30:1487–94.

Elderon L, Whooley MA. Depression and Cardiovascular Disease. Symposium on Psychosocial Factors in Cardiovascular Disease. 2013; 55: 511-23.

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.

Frazer A; Hensler JG. Serotonin.In: Basic Neurochemistry: Molecular, Cellular, and Medical Aspects, 5th Ed. Edited by Siegel et al. Published by Raven Press Ltd, New York, 1994.

Furay AR, McDevitt RA, Miczeck KA, Neumaier JF. 5-HT1B mRNA expression after chronic social stress. Behavioural Brain Research. 2011; 244: 350-57.

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 of Child Adolescent Psychiatry 2013; 52 (6):628–41.

Garfield AS, Burke LK, Shaw J, Evans ML, Heisler LK. Distribution of cells responsive to 5-HT6 receptor antagonist-induced hypophagia. Behavioural Brain Research. 2014; 266: 201–6.

Geyer MA, Krebs-Thomson K, Braff DL, Swerdlow NR. Pharmacological studies of prepulse inhibition models of sensorimotor gating deficits in schizophrenia: a decade in review. Psychopharmacology (Berl). 2001; 156(2-3): 117-54.

Gladstone GL, Parker GB, Malhi GS. Do bullied children become anxiousanddepressed adults? A cross-sectional investigation of the correlates ofbullying andanxious depression. J Nerv Ment Dis. 2006; 194: 201-8.

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

Gonzalez MI, Farabollini F, Albonetti E, Wilson CA. Interactions between 5-hydroxytryptamine (5-HT) and testosterone in the control of sexual and nonsexual behaviour in male and female ratsPharmacol. Biochem. Behav.1994; 47: 591-601.

Graeff FG, Guimaraes FS, De Andrade TG, Deakin JF. Role of 5-HT in stress, anxiety, and depression. Pharmacol Biochem Behav. 1996; 54(1): 129-41.

Hanson JL, Chung MK, Avants BB, Rudolph KD, Shirtcliff EA, Gee JC, Davidson RJ, Pollak SD. Structural variations in prefrontal cortex mediatethe relationship between early childhood stress and spatial workingmemory. J Neurosci. 2012; 32: 7917-25.

Heshmati M, Russo SR. Anhedonia and the Brain Reward Circuitry in Depression. Current Behavioral Neuroscience Report. 2015; 2 (3):146–53.

Higgs S, Cooper AJ, Barnes NM. The 5-HT2C receptor agonist, lorcaserin, and the 5-HT6 receptor antagonist, SB-742457, promote satiety; a microstructural analysis of feeding behavior. Psychopharmacology. 2016; 233: 417–24.

Hirst WD, Abrahamsen B, Blaney FE, Calver AR, Aloj L, Price GW and Medhurst AD. Differences in the Central Nervous System Distribution and Pharmacology of the Mouse 5-Hydroxytryptamine-6 Receptor Compared with Rat and Human Receptors Investigated by Radioligand Binding, Site-Directed Mutagenesis, and Molecular Modeling. Mol Pharmacol 2003;64:1295-1308.

Hirst WD, Stean TO, Rogers DC, Sunter D, Pugh P, Moss SF, Bromidge SM, Riley G, Smith DR, Bartlett S, Heidbreder CA, Atkins AR, Lacroix LP, Dawson LA, Foley AG, Regan CM, Upton N. SB-399885 is a potent, selective 5-HT6 receptor antagonist with cognitive enhancing properties in aged rat water maze and novel object recognition models. Eur J Pharmacol. 2006; 553:109–19.

Holenz J; Pauwels PJ.; Diaz JL.; Merce R; Codony X; Buschmann H. Medicinal chemistry strategies to 5-HT6 receptor ligands as potential cognitive enhancers and antiobesity agents. Drug Discovery Today 2006, 11, 283−99.

Hollis F, Kabbaj M. Social Defeat as an Animal Model for Depression. Institute for Laboratory Animal Research Journal. 2014; 55 (2):221-32.

Holmberg K, Hjern A. Bullying and attention-deficit- hyperactivitydisorder in 10-year-olds in a Swedish community. Dev Med Child Neurol. 2008; 50: 134-38.

Hoyer D, Hannon JP, Martin GR. Molecular, pharmacological and functional diversity of 5-HT receptors. Pharmacol. Biochem. Behav. 2002; 71: 533–54.

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. International Journal of Neuropsychopharmacology. 2013; 16 (7):1635–47.

Iñiguez SD, Riggs LM, Nieto SJ, Dayrit G, Zamora NZ, Shawhan KL, Cruz B, Warren BL. Social defeat stress induces a depression-likephenotype in adolescent male c57BL/6 mice. The International Journal on the Biology of Stress. 2014; 17: 247-55.
Kaltiala-Heino R, Rimpelä M, Rantanen P, Rimpelä A. Bullying at school-anindicator of adolescents at risk for mental disorders. J Adolesc. 2000; 23: 661-74.

Kapornai K, Vetró A. Depression in children. Curr Opin Psychiatry. 2008; 21: 1-7.

Karila D, Freret T, Bouet V, Boulouard M, Dallemagne P, Rochais C. Therapeutic Potential of 5-HT6 Receptor Agonists. J Med Chem. 2015; 20 :7901-12.

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

Kerestes R, Harrison BJ, Dandash O, Stephanou, Whittle S, Pujol, Davey GC. Specific functional connectivity alterations of the dorsal striatum in young people with depression. Neuroimage Clinical. 2015; 7:266–72.

Kieran N, Ou XM, Iyo AH. Chronic social defeat downregulates the 5-HT1A receptor but not Freud-1 or NUDR in the rat prefrontal cortex. Neuroscience Letters. 2010; 469: 380-84.

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.

Kohen R, Metcalf M.A, Khan N, Druck T, Huebner K, Lachowicz J.E, Meltzer H.Y, Sibley D.R, Roth B.L, Hamblin M.W. Cloning, Characterization, and Chromosomal Localization of a Human 5-HT6 Serotonin Receptor. Journal of Neurochemistry. 1996; 66: 47-56.

Koolhaas JM, Meerlo P, De Boer SF, Strubbe JH, Bohus B. The temporaldynamics of the stress response. Neurosci Biobehav Rev. 1997; 21: 775-82.

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. Pharmacology Biochemistry and Behavior. 1991; 38 (2):315-20.

Liu K.C., Li J.Y., Tan H.H., Du C.X., Xie W., Zhang Y.M., Ma W.L., Zhang L. Serotonin6 receptors in the dorsal hippocampus regulate depressive like behaviors in unilateral 6-hydroxydopamine-lesioned Parkinson's rats. Neuropharmacology. 2015; 95: 290-8.

Loiseau F, Dekeyne A, Millan MJ. Pro-cognitive effects of 5-HT6 receptor antagonists in the social recognition procedure in rats: implication of the frontal cortex. Psychopharmacology (Berl). 2008; 196:93–104.

López,M, Nogueiras,R, Tena-Sempere,M, and Dieguez,C. Hypothalamic AMPK: a canonical regulator of whole-body energy balance. Nat. Rev. Endocrinol. 2016; 12: 421-32.

Majer M, Nater UM, Lin J-MS, Capuron L, Reeves WC. Association of childhood trauma with cognitive function in healthy adults: a pilotstudy. BMC Neurol. 2010; 10:61.

Marazziti D, Baroni S, Pirone A, Giannaccini G, Betti L, Schmid L, Vatteroni E, Palego L, Borsini F, Bordi F, Piano I, Gargini C, Castagna M, Catena-Dell'Osso M, Lucacchini A. Distribution of Serotonin Receptor of Type 6 (5-HT6) in Human Brain Post-mortem. A Pharmacology, Autoradiography and Immunohistochemistry Study. Neurochem Res. 2012; 37:920–27.

Mazer C, Muneyyirci J, Taheny K, Raio N, Borella A, Whitaker-Azmitia P. Serotonin depletion during synaptogenesis leads to decreased synaptic density and learning deficits in the adult rat: a possible model of neurodevelopmental disorders with cognitive deficits. Brain Res. 1997; 760(1-2): 68-73.

McEwen BS. Stress, Adaptation, and Disease: Allostasis and Allostatic Load. Ann N Y Acad Sci. 1998; 840: 33–44.

Mitchell ES, Neumaier JF. 5-HT6 receptors: a novel target for cognitive enhancement. Pharmacology & Therapeutics. 2005; 108: 320 – 33.

Monsma, FJ, Shen, Y, Ward, RP, Hamblin, MW, & Sibley, DR. Cloning and expression of a novel serotonin receptor with high affinity for tricyclic psychotropic drugs. Mol Pharmacol. 1993; 43: 320 – 27.

Moreno RA, Moreno DH, Demétrio FN.In: Miguel EC; Geltil V; Gattaz WF. (Org.) Clínica Psiquiátrica. 1 ed. Barueri, SP: Manole. 2011; 2: 1158-175.

Morrison,SF and Nakamura,K. Central neural pathways for thermoregulation. Front Biosci. (Landmark. Ed). 2011; 16: 74-104.

Munk A, Guyre PM, Holbrook NJ. Physiological functions of glucocorticoids in stress and their relation to pharmacological actions. Endocr Rev. 1984; 5(1): 25-44.

Murphy FC, Smith KA, Cowen PJ, Robbins TW, Sahakian BJ. The effects of tryptophan depletion on cognitive and affective processing in healthy volunteers. Psychopharmacology (Berl). 2002; 163(1): 42-53.

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.

Nelson RJ, Chiavegatto S. Molecular basis of aggression. Trends Neurosci. 2001; 24(12): 713-9.

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

Persson T, Roos BE. 5-hydroxytryptophan for depression. The Lancet.1967; 2: 987–88.

Plassat, JL, Amlaiky, N, & Hen, R. Molecular cloning of a mammalian serotonin receptor that activates adenylate cyclase. Mol Pharmacol. 1993; 44: 229 – 36.

Pereira-Junior J. 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.

Poluzzi, E, Piccinni, C, Sangiorgi, E, Clo, M, Tarricone, I., Menchetti, M, De Ponti, F. Trend in SSRI-SNRI antidepressants prescription over a 6-year period and predictors of poor adherence. Eur. J. Clin. Pharmacol. 2013; 69 (12): 2095–2101.

Price JL, Drevets WC. Neurocircuitry of mood disorders. Neuropsycopharmacology reviews. 2009; 35 (1): 192-216.

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: 1141-150.

Razzoli M, Andreoli M, Michielin F, Quarta D, Sokal DM. Increased phasic activity of VTA dopamine neurons in mice 3 weeks after repeated social defeat. Behavioural Brain Research. 2011; 218 (1):253-7.

Resende LS, Amaral CE, Soares RBS, Alves AS, Alves-dos-santos L, Britto LRG, Chiavegatto S. Social stress in adolescents induces depression and brain-region-specific modulation of the transcription factor MAX. Translational Psychiatry. 2016; 6 (10):e914

Roberts JC, Reavill C, East SZ, Harrison PJ, Patel S, Routledge C, Leslie RA. The distribution of 5-HT receptors in rat brain: an autoradiographic 6 binding study using the radiolabelled 5-HT receptor antagonist 6 125 [I]SB-258585. Brain Research. 2002; 934: 49–57.

Ruat, M, Traiffort, E, Arrang, JM, Tardivel-Lacombe, J, Diaz, J, Leurs,R. A novel rat serotonin (5-HT6) receptor: molecular cloning, localization and stimulation of cAMP accumulation. Biochem Biophys Res Commun. 1993; 193: 268 – 76.

Salvador-Carrillo JF. Suscetibilidade e resiliência aos efeitos da subjugação social prolongada em camundongos machos adolescentes: estudo da enzima neuronal de síntese do óxido nítrico (nNOS). [dissertação (Mestrado em Farmacologia)]. São Paulo: Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo; 2017.

Sanchez RL, Reddy AP, Bethea CL.Ovarian steroid regulation of the midbrain corticotropin releasing factor and urocortin systems in macaques Neuroscience.2010; 171: 893-909.

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

Schosser A, Serretti A, Souery D, Mendlewicz J, Zohar J, Montgomery S, Kasper S.European Group for the Study of Resistant Depression (GSRD)-where have wegone so far: review of clinical and genetic findings. Eur Neuropsychopharmacol. 2012; 22: 453-68.

Shali TZ, Banerjee P, Tarazi FI. The Preclinical and Clinical Effects of Vilazodone for the Treatment of Major Depressive Disorder. Expert Opinion on Drug Discovery. 2016; 12-59.

Spear LP. The adolescent brain and age-relatedbehavioral manifestations. Neurosci Biobehav Rev. 2010; 24: 417-63.

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: 2007–17.

Sun J, Wang F, Hong G, Pang M, Xu H, Li H, Tian F, Fang R, Yao Y, Liu J. Antidepressant-like effects of sodium butyrate and its possible mechanisms of action in mice exposed to chronic unpredictable mild stress. Neuroscience Letters. 2016; 618: 159-66.

Svenningsson P, Tzavara ET, Qi H, Carruthers R, Witkin JM, Nomikos GG, Greengard P. Biochemical and behavioral evidence for antidepressant-like effects of 5-HT6 receptor stimulation. J Neurosci. 2007; 27: 4201-9.

Swaab DF, Bao A, Lucassen PJ. The stress system in the human brain in depression and neurodegeneration. Ageing Research Review. 2005; 4 (2):141-91.

Tharp-Taylor S, Haviland A, D'Amico EJ. Victimization from mental andphysical bullying and substance use in early adolescence. Addict Behav 2009; 34: 561-67.

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

Vitale G, Ruggieri V, Filaferro M, Frigeri C, Alboni S, Tascedda F, Brunello N, Guerrini R, Cifani C, Massi M. Chronic treatment with the selective NOP receptor antagonist [Nphe(1), Arg (14), Lys (15)]N/OFQ-NH (2) (UFP-101) reverses the behavioural and biochemical effects of unpredictable chronic mild stress in rats. Psychopharmacology. 2009; 207(2):173–89.

Ward RP., Hamblin MW., Lachowicz JE., Hoffman BJD., Sibley DR., Dorsa DM. Localization of serotonin subtype 6 receptor messenger RNA in the rat brain by in situ hybridization histochemistry. Neuroscience. 1995; 64:1105-1111.

Wesolowska A. Study into a possible mechanism responsible for the antidepressant-like activity of the selective 5-HT6 receptor antagonist SB-399885 in rats. Pharmacol Rep. 2007; 59:664–71.

Whitaker-Azmitia P, Zhou F, Hobin J, Borella A. Isolation-rearing of rats produces deficits as adults in the serotonergic innervation of hippocampus. Peptides. 2000; 1(11): 1755-9.

Whitaker AM, Gilpin NW, Edwards S. Animal Models of Post-Traumatic Stress Disorder and Recent Neurobiological Insights. Behavioural pharmacology. 2014;25(0):398-409.

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

Wong P, Sze Y, Gray LJ, Chang CCR, Cai S, Zhang X. Early life environmental and pharmacological stressors result in persistent dysregulations of the serotonergic system. Front. Behav. Neurosci. 2015; 9:94.

Woolley ML, Marsden CA, Sleight AJ, Fone KC. Reversal of a cholinergic-induced deficit in a rodent model of recognition memory by the selective 5-HT6 receptor antagonist, Ro 04-6790. Psychopharmacology (Berl). 2003; 170:358–67.

Woolley ML, Charles AM, kevin CF. 5-ht6 receptors. Curr Drug Targets CNS Neurol Disord. 2004; 3:59–79.

Yin HH, Knowlton BJ, Balleine BW. Inactivation of dorsolateral striatum enhances sensitivity to changes in the action-outcome contingency in instrumental conditioning. Behav Brain Res. 2006; 166:189–96.

Yoshioka M, Matsumoto M, Togashi H, Mori K, Saito H. Central distribution and function of 5.ht, receptor subtype in the rat brain. Life Sciences. 1998: 1473-77.

Yu T, Guo M, Garza J, Rendon S, Sun XL, Zhang W. Cognitive and neural correlates of depression-like behavior in socially defeated mice: an animal model of depression with cognitive dysfunction. International Journal of Neuropsychopharmacology. 2011, 14(3):303–17.

Yun HM e Rhim H. The Serotonin-6 Receptor as a Novel Therapeutic Target. Exp Neurobiol. 2011; 20(4): 159-68.

Zannas AS, West A. Epigenetics and the regulation of stress vulnerability and resilience. Neuroscience. 2014; 0:157 –70.