Camila Ematné do Amaral

**Estudo do fator de transcrição Max no hipocampo de camundongos
adolescentes submetidos a um modelo de submissão social
prolongada**

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

São Paulo
2012

Camila Ematné do Amaral

**Estudo do fator de transcrição Max no hipocampo de camundongos
adolescentes submetidos a um modelo de submissão social
prolongada**

Dissertação apresentada ao Departamento de
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
2012

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

© reprodução parcial

Amaral, Camila Ematné.

Estudo do fator de transcrição Max no hipocampo de camundongos adolescentes submetidos a um modelo de submissão social prolongada / Camila Ematné Amaral. -- São Paulo, 2012.

Orientador: Profa. Dra. Silvana Chiavegatto.

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

Versão do título para o inglês: Study of the Max transcription factor in the adolescent mice hippocampus subjected to a model of prolonged social defeat.

1. Fator de transcrição Max 2. Hipocampo 3. Adolescente
4. Depressão 5. Modelo de submissão social I. Chiavegatto, Profa. Dra. Silvana II. Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas. Programa de Pós-Graduação em Farmacologia III. Título.

ICB/SBIB0143/2012

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

Candidato(a): Camila Ematné Amaral.

Título da Dissertação: Estudo do fator de transcrição Max no hipocampo de camundongos adolescentes submetidos a um modelo de submissão social prolongada.

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

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

() **Aprovado(a)**

() **Reprovado(a)**

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Presidente: Assinatura:
Nome:
Instituição:

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

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

CERTIFICADO

Certificamos que o protocolo registrado sob nº **069** nas fls. **104** do livro **02** para uso de animais em experimentação, sob a responsabilidade do) **Silvana Chiavegatto**, Coordenador(a) da Linha de pesquisa "*Estudo do fator de transcrição Max no hipocampo de camundongos adolescentes submetidos a um modelo de submissão social prolongada*" do qual participam o(s) alunos **Camila Ematné do Amaral, Débora Maria Gomes Cunha, Rafael Bento da Silva Soares**, 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 **03.06.2011**, com validade de **3 anos**.

São Paulo, 07 de junho de 2011.

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

Prof. Dr. ARIEL MARIANO SILBER
Secretário
CEUA – ICB/USP

Aos meus pais, familiares e amigos pelo
incentivo e apoio constante para a minha
formação.

Muito obrigada!

AGRADECIMENTOS

Primeiramente à Profa. Dra. Silvana Chiavegatto, por ter me aceito em seu laboratório e me orientado na realização deste trabalho.

Agradecimento especial ao Prof. Dr. Luiz Roberto G. de Britto, por ter permitido que eu utilizasse as dependências de seu laboratório para realizar os procedimentos de Imuno-histoquímica e Imunofluorescência, também por sua paciência e orientação dada durante a realização destes procedimentos. Ao técnico Adilson pela assistência dada durante a realização deste projeto.

Ao Prof. Dr. Rafael Linden, Profa. Dra. Hilda Petrs-Silva e ao Dr. Daniel Adesse, do Laboratório de Neurogênese, do Instituto de Biofísica da Universidade Federal do Rio de Janeiro, onde foi realizada uma etapa do presente estudo.

Aos Professores Prof. Dr. Luiz Roberto Britto, Profa. Dra. Carolina Demarchi Munhoz de Souza e Prof. Dr. José Ernesto Belizário, pelos conselhos valiosos dados no momento da qualificação.

À Rosangela Eichler, por me ensinar técnicas de biologia molecular e laboratoriais que contribuíram para o meu desenvolvimento profissional.

Ao Luiz Roberto M. Mundel e Andréa Calvento, por todo o auxílio na manutenção do biotério.

À Thais Marques e à Sandra Regina da Silva, do Biotério do Instituto de Ciências Biomédicas (ICB).

Às secretárias Mônica Nunes, Camila Gonçalves e Selma Rigonati, do Instituto de Ciências Biomédicas (ICB).

Agradecimento especial a duas grandes profissionais, que conquistaram mais do que meu respeito, conquistaram a minha admiração, Dra. Roseli Shavitt e Alice de Mathis. Obrigada pelo apoio e carinho dados nesta etapa pessoalmente muito

importante da minha vida, mas principalmente obrigada por acreditarem no meu potencial. Meus sinceros agradecimentos!

Aos colegas e amigos que fiz na Universidade de São Paulo, Alessandra Ofuchi, Anne Sacilloto, Débora Cunha, Rafael Soares, Leonardo Alves, Leandro Rodrigues, Marina Sorrentino, Gabriela Chaves, Priscila Carrara, Jaqueline Rocha, Fernando Velloso, muito obrigada pelo companheirismo e apoio dados neste momento, e pela oportunidade que tive de aprender com cada um de vocês.

Aos amigos, Claudete Viscaio, Tatiana Cristina Silva, Alberto Sorria, Viviane Tucci, Daniel Fatori, Isabela Fortes; obrigada pelo apoio!

Agradeço à minha família e amigos - meus pais, José Laércio e Claudia, minha irmã Monique, aos padrinhos Mirtes e Giovani - pelo apoio e pelo amor que sempre me deram. Especialmente, gostaria de agradecer aos meus pais, que se sacrificam para que seus filhos realizem seus sonhos. Agradeço pelo incentivo, pelo carinho, pela segurança, pela dedicação e pelo exemplo.

Aos Professores da Universidade de São Paulo, pelo conhecimento transmitido durante o período da pós-graduação.

À CAPES pela bolsa de mestrado.

Ao Instituto Nacional da Psiquiatria do Desenvolvimento pelo apoio financeiro dado a este projeto.

“Quem é inteligente”?
Aquele que aprende de todo o ser humano
A sabedoria não é um saber, mas a habilidade
de aprender”.

Nilton Bonder

RESUMO

Amaral CE. Estudo do fator de transcrição Max no hipocampo de camundongos adolescentes, submetidos a um modelo de submissão social prolongada [dissertação (Mestrado em Farmacologia)]. São Paulo: Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo; 2012.

Transtornos depressivos afetam 1-6% dos adolescentes a cada ano ao redor do mundo sendo a 3ª principal causa de suicídio. Pouco se sabe sobre mecanismos moleculares envolvidos na depressão induzida por estresse crônico. Nosso objetivo foi padronizar um modelo de submissão social prolongada em camundongos adolescentes e avaliar os efeitos sobre comportamentos emocionais e sobre a expressão do fator de transcrição Max no hipocampo. **Metodologia:** Camundongos C57BL/6 machos adolescentes foram pareados por 21 dias a um agressor. Comportamentos relacionados à ansiedade e depressão foram avaliados. Max foi quantificado por qPCR e western blot, e visualizado por imunoistoquímica e fluorescência. **Resultados:** Os animais apresentaram comportamentos pró-depressivos associados ao aumento da expressão proteica, mas não gênica, de Max nas regiões CA1, CA3 e DG hipocampais, onde sua localização foi nuclear. Com este modelo padronizado investigaremos o acúmulo nuclear de Max e sua contribuição na neuroplasticidade hipocampal durante o estresse na adolescência e idade adulta.

Palavras-chave: Fator de transcrição Max. Hipocampo. Adolescência. Depressão. Modelo de submissão social.

ABSTRACT

Amaral CE. The transcription factor Max in the hippocampus of adolescent social defeated mice [Masters thesis (Pharmacology)]. São Paulo: Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo; 2012.

Depressive disorders affect 1-6% of adolescents each year around the world, being considered the 3rd leading cause of suicide. Little is known about molecular mechanisms contributing to chronic stress induced depression. This study aimed to establish a model of social defeat in adolescent mice and evaluate the effects on emotional behaviors and on hippocampal Max transcription factor gene and protein expression. **Methodology:** C57BL/6 male mice were paired to an aggressor in a daily basis for 21 days. Anxiety- and depression-related behaviors were analyzed. Max was quantified in the hippocampus by qPCR and western blot, and visualized by immunohistochemistry and fluorescence. **Results:** Social-defeated mice showed depressive-like behaviors and increased Max protein, but not mRNA, in the subfields CA1, CA3 and DG of hippocampus, where its localization was nuclear. In our established model, we will further investigate the nuclear accumulation of Max and its contribution to aspects of neuroplasticity in the hippocampus of chronic stressed adolescent and adult mice.

Keywords: Transcription factor Max. Hippocampus. Adolescence. Depression. Social defeat.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 -	Modelo de submissão prolongada durante 21 dias em camundongos machos adolescentes.....	34
Figura 2 -	Linha cronológica dos procedimentos da Série Experimental I.....	35
Figura 3 -	Linha cronológica dos procedimentos da Série Experimental II.....	35
Figura 4 -	Registro do animal em um aparelho de Campo-Aberto.....	36
Figura 5 -	Registro do animal em um aparelho de labirinto em Cruz Elevado.....	37
Figura 6 -	Registro do animal submetido ao teste do Nado-Forçado.....	38
Figura 7 -	Efeito do estresse prolongado por subjugação social em camundongos machos adolescentes, sobre a atividade locomotora total, central e periférica em um Campo-Aberto durante 5 min.....	48
Figura 8 -	Efeitos do estresse prolongado por subjugação em camundongos machos adolescentes, sobre comportamentos relacionados à ansiedade, observados por 5 min em um labirinto em Cruz elevado.....	49
Figura 9 -	Efeitos do estresse por subjugação social em camundongos machos adolescentes sobre a duração da imobilidade (s) nos 4 últimos minutos do teste do Nado Forçado.....	50
Figura 10 -	Efeitos do estresse de subjugação social em camundongo machos adolescente sobre o consumo de água e sacarose.....	51
Figura 11 -	Efeitos do estresse de subjugação social por 21 dias em camundongos machos adolescentes sobre a quantificação sérica de corticosterona.....	52
Figura 12 -	Efeitos do estresse de subjugação social por 21 dias em camundongos machos adolescentes sobre a quantificação do RNAm de Max no hipocampo.....	54
Figura 13 -	Efeitos do estresse de subjugação social por 21 dias em camundongos machos adolescentes sobre a expressão proteica de Max no hipocampo quantificada por western blot.....	55
Figura 14 -	Imagens digitais de cortes coronais dos cérebros de camundongos ilustrando a expressão de Max nas regiões CA1, CA3 e Giro Denteado (DG), do hipocampo de camundongos machos adolescentes, submetidos ao modelo de estresse social e seus respectivos controles.....	56
Figura 15 -	Imagens digitais de cortes coronais dos cérebros de camundongos ilustrando a expressão de Max na região do caudado putamen (CP) de camundongos machos adolescentes submetidos ao modelo de estresse social, e seu respectivo controle.....	57

Figura 16 -	Efeitos do estresse de subjugação social por 21 dias em camundongos machos adolescentes sobre a expressão de Max quantificada por imunoistoquímica.....	57
Figura 17 -	Efeitos do estresse de subjugação social por 21 dias em camundongos machos adolescentes sobre a expressão de Max quantificada por imunoistoquímica.....	58
Figura 18 -	Efeitos do estresse de subjugação social por 21 dias em camundongos machos adolescentes sobre o número de células marcadas com Max quantificadas por imunoistoquímica no hilo do hipocampo.....	58
Figura 19 -	Imunofluorescência de cortes coronais dos cérebros de camundongos ilustrando a expressão de Max nas regiões CA1, CA3 e Giro Denteado (DG), do hipocampo de camundongos machos adolescentes, submetidos ao modelo de estresse social e seus respectivos controles.....	59

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ACTH - Hormônio adrenocorticotrófico

Bcl-2 - *B cell lymphoma 2 (linfoma de células B 2)*

Bcl-xl - *anti-apoptotic B cell lymphoma like X- (célula anti-apoptótica de linfoma B)*

BDNF - *Brain Derived Neurotrophic Factor* →(fator neurotrófico derivado do cérebro)

bHLHZ - Hélice-alça-hélice leucina zíper

CA - Campo-aberto

CEEA - Comissão de ética em experimentação animal

Cm - Centímetros

COBEA - Colégio brasileiro de experimentação animal

CRF - Peptídeo liberador de corticotropina

DNA - Ácido dextrirribonucléico

DSM-IV - Manual diagnóstico e estatístico de transtornos mentais 4º edição

E-box - *Enhancer Box*

GBD - *Global Burden of Disease*

HAT - Histona acetiltransferase

HPA - Hipotálamo-pituitária-adrenal

Kg - Kilogramas

LCE - Labirinto em cruz elevada

Mad - Proteína de dimerização ao Max

Mad1 - Proteína 1 de dimerização ao Max

Mad3 - Proteína 3 de dimerização ao Max

Mad4 - Proteína 4 de dimerização ao Max

Max - Proteína Myc associada ao fator X

Mga - Proteína associada ao gene Max

Mnt - Proteína regulatória de ligação ao Max

Mxd1-4 - Proteína 1-4 de dimerização ao Max

Mxi1 - Proteína 1 de interação com o Max

Myc - Oncogene mielocitomatoso

NaCl - Cloreto de sódio

NF - Nado-forçado

p27Kip1 - Inibidor 1B das quinases-ciclina-dependentes (CDKI)

PBS - *Phosphate-buffered saline*-(tampão de salina fosfatado)

PCR - Reação em cadeia da polimerase

PFA - Paraformaldeído

PPS - Preferência por sacarose

pb - pares de bases

qPCR - PCR quantitativo em tempo real

RNA - Ácido ribonucleico

RNAm - RNA mensageiro

s - segundos

SNC - Sistema nervoso central

TDM - Transtorno depressivo maior

Triton X-100 - 4-(1,1,3,3-Tetrametilbutil) phenil-polietileno glicol

trkB - *tyrosine kinase receptor B*- (receptor de tirosina kinase B)

TUNEL - *Terminal deoxynucleotidyl transferase Uracil Nick End Labeling*

WHO - *World Health Organization* (Organização Mundial de Saúde)

WISQARS - Web-based Injury Statistics Query and Reporting System

Mm - micrometro

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	18
1.1 Depressão induzida pelo estresse	18
1.2 Estresse na adolescência e na fase adulta	21
1.3 Modelos animais e o estresse crônico	23
1.4 Plasticidade neural, estresse e depressão	25
1.5 Fator de transcrição MAX	28
2 OBJETIVOS	31
2.1 Objetivo geral	31
2.2 Objetivos específicos	31
3 MATERIAIS E MÉTODOS	32
3.1 Animais	32
3.2 Metodologia	32
3.2.1 Estabelecimento do modelo de estresse social prolongado	32
3.2.1.1 Seleção dos animais agressivos	31
3.2.1.2 Indução do estresse social prolongado	32
3.2.2 Delineamento experimental	33
3.2.3 Atividade motora espontânea no Campo-Aberto (CA)	36
3.2.4 Comportamento relacionado à ansiedade no Labirinto em Cruz-Elevado (LCE)	37
3.2.5 Comportamento relacionado à depressão no teste do Nado-Forçado (NF)(Porsolt)	38
3.2.6 Comportamento de anedonia no teste de Preferência por Sacarose (PPS)	39
3.3 Sacrifício dos animais	39
3.3.1 Preparação das amostras da Série Experimental I	39
3.3.2 Preparação das amostras da Série Experimental II	40
3.4 Determinação da concentração sérica de corticosterona	40
3.5 Preparação das amostras para a quantificação da expressão gênica de Max	40
3.5.1 Extração do RNA	40
3.5.2 Síntese do DNA complementar (DNAC)	41
3.5.3 Procedimento para confecção dos oligonucleotídeos iniciadores (primers)	41
3.5.4 Reação em cadeia de polimerases (PCR) em Tempo Real	42
3.6 Extração de proteínas para detecção de MAX	43
3.6.1 Quantificação da expressão proteica de MAX por Western Blot	44
3.7 Avaliação da expressão proteica de Max por imunoistoquímica	45
3.8 Análise microscópica, obtenção das imagens digitais e quantificação	46
3.9 Avaliação subcelular da expressão proteica de Max por imunofluorescência	47
3.10 Análise Estatística	47
4 RESULTADOS	48
4.1 Atividade motora espontânea no Campo-Aberto (CA)	48

4.2 Comportamento relacionado à ansiedade no Labirinto em Cruz-Elevado (LCE).....	49
4.3 Comportamento relacionado à depressão no teste do Nado-Forçado (Porsolt) (NF).....	51
4.4 Comportamento de anedonia no teste de Preferência por Sacarose (PPS).....	52
4.5 Concentração sérica de corticosterona.....	53
4.6 Pares de iniciadores utilizados para a amplificação dos genes.....	53
4.7 Quantificação de RNAm para Max no hipocampo.....	54
4.8 Análise da expressão proteica de Max.....	55
4.9 Avaliação da expressão proteica de Max por imunoistoquímica.....	56
4.10 Avaliação subcelular de Max no hipocampo através da técnica de imunofluorescência.....	59
5 DISCUSSÃO	62
5.1 Aspectos comportamentais.....	62
5.2 Dosagem de corticosterona.....	66
5.3 Aspectos Moleculares.....	67
6 CONCLUSÃO	71
REFERÊNCIAS	72

1 INTRODUÇÃO

Transtornos depressivos afetam 1-6% dos adolescentes a cada ano ao redor do mundo (Costello et al., 2006; Green et al., 2005; Thapar et al., 2010). Esse aparecimento precoce anuncia uma doença mais grave e persistente na vida adulta (Lewinsohn et al., 1994), como mostram os estudos prospectivos, associando a depressão na adolescência a um risco aumentado de suicídio, sendo essa a terceira principal causa de morte na faixa etária entre 14-29 anos (Web-based Injury Statistics Query and Reporting System, 2009). Para uma proporção considerável destes pacientes, os antidepressivos não apresentam eficácia, além de produzirem efeitos colaterais significativos. Uma vez que as opções de tratamento disponíveis são limitadas, a prevenção, ou pelo menos o retardamento do aparecimento da depressão em adolescentes, tem representado prioridade de saúde pública e clínica (Licinio e Wong, 2004). Os exatos mecanismos moleculares envolvidos na fisiopatologia da depressão e do estresse crônico ainda não são compreendidos, portanto, estudos que venham a contribuir para o descobrimento de novos fatores biológicos e moleculares envolvidos na etiologia da depressão são extremamente necessários (Krishnan e Nestler, 2008; Manji e Duman, 2001).

1.1 Depressão induzida pelo estresse

O Transtorno Depressivo Maior (TDM) é considerado a terceira doença mais prevalente em todo o mundo e há projeções de que se torne a primeira em 2030 (World Health Organization, Global Burden Disease, 2004). Além de aumentar o risco de suicídio, o TDM apresenta comorbidade frequente com outros transtornos psiquiátricos e tem sido identificado como um fator de risco para muitas doenças, incluindo obesidade, doenças cardiovasculares e neurodegenerativas, dentre outras (Andrus et al., 2012; Kessler et al., 2003; Rumsfeld e Ho, 2005; Swaab et al., 2005). Desta forma, a compreensão da fisiopatologia do TDM e o desenvolvimento de melhores tratamentos melhorariam a saúde mental e a qualidade de vida de grande parte da população psiquiátrica do mundo.

Duas grandes hipóteses tentam explicar a etiologia do TDM. A primeira refere-se à deficiência de monoaminas neurotransmissoras e a segunda considera

que o estresse desencadearia a depressão (Andrus et al., 2012; Delgado et al., 2000; Fava e Kendler, 2000; Ruhé et al., 2007), apesar de não serem mutuamente excludentes. A primeira hipótese propõe que a depressão possa ser etiológicamente explicada por uma deficiência nos neurotransmissores serotonina, noradrenalina e dopamina, e consequentemente de seus respectivos sistemas de neurotransmissão. Embora esta hipótese seja ainda aceita, e constitua a base da maioria das terapias antidepressivas desenvolvidas até o momento, a opinião atual é de que a deficiência em monoaminas explique apenas parcialmente a etiologia do TDM (Andrus et al., 2012).

Com base nas observações dos transtornos depressivos, a segunda hipótese relaciona as alterações patológicas no eixo hipotálamo-pituitária-adrenal (HPA), em resposta ao estresse, como sendo um fator causal da depressão. O estresse manifesta-se como uma resposta fisiológica a uma ameaça geralmente percebida por regiões corticais do cérebro. Este, como dito anteriormente, ativa o caminho neuroendócrino definido como eixo HPA (De Kloet et al., 2005). Desta forma, fatores estressantes estimulam o hipotálamo a liberar o peptídeo liberador de corticotropina (CRF), que irá agir em receptores localizados na glândula pituitária. Esta, por sua vez, libera o hormônio adrenocorticotrófico (ACTH) na circulação, que estimula a liberação de glicocorticoides pelo córtex adrenal. Glicocorticoides, como o cortisol, exercem inúmeras alterações fisiológicas relacionadas ao estresse, mas também são agentes antiinflamatórios. Após o estresse crônico, e também em pacientes deprimidos, é comum haver uma resistência dos receptores aos glicocorticoides, o que resulta em elevados níveis de cortisol (Belmaker e Agam, 2008; De Kloet et al., 2005; Dinan, 2005). Estudo de meta-análise, baseado em 14.250 participantes, demonstrou claramente que os eventos estressantes da vida têm uma associação forte com o risco de desenvolver depressão (Risch et al., 2009). Tais estudos indicaram que o alelo 5-HTTLPR aumenta a vulnerabilidade à depressão apenas na presença dos eventos adversos, demonstrando, desta forma, a importância do estresse na patologia deste transtorno (Frodl et al., 2010).

Em indivíduos que apresentam depressão grave, desencadeada pelo estresse, foi observada uma redução do volume hipocampal (Bremner et al., 2000; Frodl et al., 2002a; MacQueen et al., 2003) e do córtex pré-frontal ventral (Drevets et al., 1998), redução no número de células gliais nesta região (Rajkowska et al., 1999) e, diferentemente, um aumento no volume da amígdala (Frodl et al., 2002b).

Desta forma, tem-se sugerido que o aumento da atividade da amígdala, associada à reduzida função do córtex infralímbico, possam contribuir para o desequilíbrio autonômico observado na depressão (Drevets et al., 1998). Outro estudo envolvendo uma meta-análise concluiu haver uma redução no volume do hipocampo em pacientes com depressão unipolar, mas o mesmo não ocorreu nos pacientes com depressão bipolar (Tae et al., 2011).

A disfunção nesta rede pré-frontal medial também parece contribuir para a anedonia, falta de motivação e desatenção que se manifestam na depressão (Price e Drevets, 2010). Além dos vários estudos em humanos sobre depressão, induzida pelo estresse, enfatizarem o sistema límbico como sendo um sistema muito afetado (principalmente a amígdala, hipocampo e o córtex pré-frontal), estudos em animais também têm reforçado estes achados. Modelos de estresse crônico em roedores têm demonstrado um prejuízo na neuroplasticidade associado à indução ou exacerbação da depressão (Pittenger e Duman, 2008). Nesses modelos observou-se perda celular no hipocampo, atrofia e retração de dendritos apicais no mesmo e diminuição da neurogênese (Magariños et al., 1996; Watanabe et al., 1992). No córtex pré-frontal destes roedores houve uma redução no número de espinhas dendríticas (Cook e Wellman, 2004; Radley et al., 2004) e redução do número de células da glia (Banar et al., 2007). Adicionalmente, foi observado um aumento do tamanho e das ramificações dendríticas na amígdala, resultando em sua hipertrofia (Vyas et al., 2006). Curiosamente, a diminuição da neurogênese induzida pelo estresse no hipocampo parece ocorrer mais em sua região ventral do que dorsal, o que corrobora estudos anteriores que afirmaram haver maior vulnerabilidade desta região ao estresse (Jayatissa et al., 2006).

Outros estudos envolvendo modelos de estresse crônico moderado demonstraram que distúrbios como a depressão são acompanhados por inflamação nervosa periférica e central, lesão celular neuronal, diminuição da neurogênese e apoptose no hipocampo (Kubera et al., 2011). Antidepressivos reduzem a inflamação periférica e central através da estimulação da diferenciação neuronal, plasticidade sináptica, crescimento axonal e regeneração através de efeitos estimulantes sobre a expressão de diferentes fatores neurotróficos, como por exemplo, o *trkB* (*tyrosine kinase receptor B*- receptor de tirosina kinase B), o receptor para o BDNF (*Brain Derived Neurotrophic Factor* – fator neurotrófico derivado do cérebro) e a atenuação das vias apoptóticas, ativando as proteínas Bcl-

2 (*B cell lymphoma 2-linfoma de células B 2*) e Bcl-xl (*anti-apoptotic B cell lymphoma like X-célula anti-apoptótica de linfoma B*) e suprimindo a caspase-3. Portanto, os fatores externos que levam ao estresse podem desencadear comportamentos depressivos associados à ativação de mecanismos inflamatórios, oxidativos, mecanismos antineurogênicos e apoptóticos e a eficácia clínica dos antidepressivos parece ser atribuída à sua capacidade de reverter essas diferentes vias (Kubera et al., 2011).

Apesar de muitos estudos sustentarem o papel do estresse no TDM, a natureza e o grau da sua participação ainda são incertos. A complexidade do assunto culmina com o surgimento de um novo conceito no qual não há uma teoria unificada que explique a depressão, principalmente se aceitarmos o fato de haver subtipos diferentes de depressão, que podem estar sendo regulados por diversas vias. Isso enfatiza a necessidade de estudos que venham a contribuir para o descobrimento de novos fatores de transcrição envolvidos com a etiologia da depressão (Krishnan e Nestler, 2008; Manji et al., 2001). O conhecimento dos mecanismos moleculares envolvidos na depressão induzida pelo estresse e o fato de compartilharem os mecanismos moleculares envolvidos na depressão poderiam orientar o desenvolvimento de diferentes alternativas de tratamento (Andrus et al., 2012). Dentro do contexto abordado destaca-se o processo de apoptose como outro mecanismo de contribuição à depressão relacionada ao estresse crônico. A apoptose ou morte celular programada é essencial para o ciclo de vida de muitos organismos, e nos animais ocorre como consequência de uma variedade de estímulos, como por exemplo, o estresse (Muñoz-Pinedo, 2012). A apoptose parece estar relacionada com a maior susceptibilidade de certas populações de neurônios aos efeitos nocivos do estresse. Investigações sobre o papel da apoptose na depressão, bem como na mediação dos efeitos moleculares, fisiológicos e comportamentais dos antidepressivos poderiam ajudar na compreensão da terapêutica atual, com vistas às manipulações alternativas nessas vias de uma forma mais específica (Kubera et al., 2011).

1.2 Estresse na adolescência e na fase adulta

A adolescência é marcada por um período de mudanças cerebrais críticas, principalmente nas regiões pré-frontais e límbicas, na maioria das espécies animais.

Neste período, o sistema dopaminérgico mesocorticolímbico passa por reorganização substancial, permitindo o desenvolvimento emocional e cognitivo, que ajuda na transição para a vida adulta (Novick et al., 2011; Spear, 2000; Wahlstrom et al., 2010). Essas mudanças são inerentemente adaptativas para a sobrevivência; porém elas também tornam o cérebro adolescente particularmente vulnerável à experiência do estresse (Novick et al., 2011; Wahlstrom et al., 2010). O estresse ocasionado durante as etapas do desenvolvimento acelera o início dos sintomas depressivos, que se manifestam durante a adolescência (Leussis et al., 2012).

Além disso, o período da adolescência é ainda caracterizado pela maturação do eixo HPA, e exposições a experiências estressantes durante a adolescência podem comprometer o desenvolvimento desta circuitaria e suas futuras funções fisiológicas necessárias frente ao estresse (Barha et al., 2010). Estudos em modelos animais demonstraram que ratos machos e fêmeas adolescentes apresentam uma liberação mais prolongada de corticosterona, em resposta ao estresse, quando comparados com ratos adultos (Romeo et al., 2004; Romeo e McEwen, 2006; Viau et al., 2005). Adicionalmente, a exposição ao estresse físico imprevisível ou psicológico durante a adolescência resultou na diminuição do volume de regiões do hipocampo, como CA1, CA3 e giro denteado em ratos machos (Isgor et al., 2004). Curiosamente, os efeitos do estresse durante a adolescência podem ser permanentes, ao contrário daquele ocorrido na idade adulta, em que muitos efeitos do estresse sobre o hipocampo são reversíveis com o tempo (Girotti et al., 2006). Ao que tudo indica, o estresse parece afetar diferentemente a neurogênese hipocampal na idade adulta, mas, até o presente momento, não se conhecem relatos de estudos que tenham examinado os efeitos do estresse durante a adolescência sobre a neurogênese adulta (Barha et al., 2010).

Outro dado que apoia a hipótese de que o cérebro do adolescente é particularmente vulnerável ao estresse é o fato de que o estresse afeta o córtex pré-frontal, um dos mais notáveis circuitos cerebrais "em construção" durante a adolescência (Buwalda et al., 2010). O córtex pré-frontal dos adolescentes parece ser mais vulnerável ao estresse do que o córtex pré-frontal juvenil. Abusos sexuais em crianças entre 3 e 5 anos resultaram numa diminuição da estrutura do hipocampo, enquanto abusos ocorridos durante a adolescência, entre 14 e 16 anos, reduziram o volume do córtex pré-frontal e tiveram pouco efeito sobre o tamanho do hipocampo (Andersen e Teicher, 2008). Estes achados indicam que a

vulnerabilidade das diferentes estruturas cerebrais ao estresse é idade-específica (Buwalda et al., 2010). Outros estudos envolvendo o estresse social demonstram que a submissão social atrapalha o desenvolvimento neural normal em ratos machos adolescentes, produzindo alterações nas respostas de ansiedade no adulto, e alteração da função monoaminérgica em regiões límbicas responsivas ao estresse, implicadas na toxicodependência, e também em alguns transtornos psiquiátricos humanos (Blumberg et al., 2009). Além disso, exposição ao estresse crônico social, durante o período da adolescência de camundongos, pode acelerar o declínio no desempenho da memória espacial e prejudicar a plasticidade do hipocampo durante o envelhecimento (Sterlemann et al., 2010).

Com a atividade social em seu auge, durante a adolescência, há alta probabilidade de que experiências sociais negativas tenham efeitos prejudiciais que persistam na vida adulta (Blumberg et al., 2009). De fato, numerosos estudos clínicos têm demonstrado que experiências repetidas de estresse social na adolescência, muitas vezes na forma de “bullying”, seriam correlacionadas com uma maior incidência de transtornos psiquiátricos na vida adulta (Gladstone et al., 2006; Hoffman et al., 2000). Desta forma, destaca-se a necessidade de uma melhor compreensão do potencial impacto que a exposição ao estresse social na adolescência possa ter sobre os sistemas neurais associados com psicopatologias no adulto (Blumberg et al., 2009).

1.3 Modelos animais e o estresse crônico

Ainda hoje a comunidade científica depara-se com a dificuldade em decidir quando um modelo animal de transtorno mental (em particular) é adequadamente válido para garantir estudos adicionais, tanto como uma ferramenta para decifrar a fisiopatologia quanto como base para o desenvolvimento de novos tratamentos. Consideramos um bom modelo animal quando a etiologia, a expressão fenotípica e a resposta terapêutica são homólogas entre o caso clínico e a preparação experimental pré-clínica (Chiavegatto, 2011). Embora muito se tenha aprendido sobre os circuitos neurais do humor e uma série de distúrbios neuroquímicos e neuroendócrinos tenham sido descritos em indivíduos deprimidos, nenhuma anormalidade provou ser suficientemente robusta para diagnosticar a depressão,

quer seja em seres humanos ou mesmo na validação de um modelo animal (Krishnan et al., 2008; Nestler et al., 2010).

A ausência de conhecimento das causas genéticas da depressão e a dificuldade em modelar sintomas emocionais, tais como humor deprimido ou irritável, e sintomas cognitivos, como culpa e suicídio, representam um desafio na construção e validação de modelos animais na depressão. Desta forma, apenas um subconjunto de sintomas, como anedonia e comportamentos psicomotores, podem ser medidos objetivamente em roedores (Nestler et al., 2010).

Devido a essas dificuldades, a modelagem em animais baseou-se na observação de que as perdas emocionais e o estresse representavam um alto fator de risco (Nestler et al., 2010). Uma vez que a diminuição do interesse ou prazer é um dos critérios do DSM-IV (Manual diagnóstico e estatístico de transtornos mentais, 4^o edição) para a caracterização da depressão clínica, pesquisadores concluíram que uma breve experiência de submissão social poderia induzir à longa duração destes sinais da depressão (Buwalda et al., 2011). Assim, vários procedimentos de estresse têm sido empregados buscando alcançar a validade do construto. Entre eles destacam-se modelos de estresse leve e crônico, estresse imprevisível e submissão social.

Em pesquisas laboratoriais, o estresse de submissão social pode ser induzido através do paradigma denominado de residente-intruso. Nesse paradigma os animais experimentais são introduzidos no território de um macho agressivo e, a partir desse momento, o animal é rapidamente investigado, atacado e derrotado pelo macho agressor (Buwalda et al., 2005; Koolhaas et al., 1997; Tornatzky e Miczek, 1993). Após isso, os roedores mostram uma variedade de características semelhantes aos sintomas da depressão, incluindo anedonia e isolamento social, que podem ser revertidos pela administração crônica, mas não aguda, de antidepressivos (Krishnan et al., 2007). Sendo assim, os procedimentos de submissão social exibem características de validade de face, constructo e preditiva. Validade semelhante foi estabelecida para o estresse precoce, como a separação materna, que induz, ao longo da vida, a anormalidades comportamentais e neuroendócrinas nos filhotes, sendo algumas revertidas por antidepressivos (Meaney, 2001). Em contraste com todas estas formas de estresse "ativo", roedores adultos, mantidos em isolamento social por semanas ou meses, também desenvolvem anedonia, que pode ser tratada através da utilização crônica de

antidepressivos (Wallace et al., 2009). Adicionalmente, foi demonstrado que o estresse de submissão social, durante a adolescência, não só afeta a ansiedade de forma contexto-específica, mas também modula o desenvolvimento do comportamento agressivo (Buwalda et al., 2011).

Desta forma, a aplicação de modelos animais de submissão social ou de subordinação pelo estresse crônico, torna-se ferramenta útil na compreensão de mecanismos que podem levar a distúrbios comportamentais duradouros, e na saúde psicossocial de jovens e adolescentes que sofrem *bullying* (Buwalda et al., 2011).

1.4 Plasticidade neural, estresse e depressão

Dentre as alterações neurobiológicas envolvidas com a fisiopatologia dos transtornos de humor, relacionados ao estresse, destacamos a regulação da neurogênese e o aumento da morte celular no SNC, especialmente no hipocampo (McEwen e Magarinos, 1997; Shishkina et al., 2010). Uma variedade de estudos em animais compartilha estes achados, demonstrando uma diminuição na proliferação celular e aumento da morte celular, tanto no hipocampo, como também no córtex cerebral, após o estresse crônico do tipo imprevisível, ou social (Bachis et al., 2008; Czéh et al., 2007), desencadeando comportamentos semelhantes à depressão (Bachis et al., 2008; Banasr et al., 2007). Dentre as regiões hipocâmpais, CA1 e CA3 parecem ser as mais sensíveis à morte neuronal, sendo enfatizadas no estudo de Sapolsky et al. (1990). Posteriormente, diversos outros estudos confirmaram os achados de Sapolsky, agregando o papel do estresse crônico como um dos fatores causais, para que o consequente aumento das concentrações de corticosterona leve à retração, ou remodelamento de dendritos, principalmente na região CA3 hipocâmpal (Fuchs et al., 2006; Lucassen et al., 2010; McEwen, 2006a; Sousa et al., 2008).

Consistentes com esses achados, estudos *post-mortem* em tecidos cerebrais de pacientes deprimidos mostraram uma diminuição da densidade e número de células gliais nas regiões corticais, incluindo as áreas pré-frontal e cíngulo anterior (Banasr et al., 2007; Cotter et al., 2001; Uranova et al., 2004), bem como uma fragmentação do DNA e apoptose neuronal. Ambos os resultados sugerem um aumento da vulnerabilidade neuronal durante a depressão (Lucassen et al., 2006, Bachis et al., 2008). A vulnerabilidade neuronal aos efeitos do estresse crônico

parece ser região-específica, conforme demonstrado em roedores; uma diminuição da proliferação celular em áreas corticais e giro denteado no hipocampo, mas não no estriado (Banasr et al., 2007). Assim, dentro do contexto de que o estresse prolongado resulta em morte neuronal através da apoptose (Lucassen et al., 2001), Bachis et al. (2008) investigaram a ativação da proteína caspase-3 neste evento. Esta proteína é executora da apoptose (Salvesen, 2002) e, quando se encontra estimulada nos neurônios, representa forte indicativo de que estas células estão comprometidas a morrer (Yuan et al., 2000). Neste estudo foram identificadas células positivas para caspase-3 no córtex cerebral, e em menor proporção na região CA1 do hipocampo (Bachis et al., 2008). Em conclusão, o córtex cerebral de ratos mostrou-se sensível aos efeitos deletérios do estresse crônico imprevisível e, além da supressão da neurogênese, este estresse também pode levar à apoptose (Lucassen et al., 2006).

Vários trabalhos já têm sugerido um possível papel do estresse nas fases de renovação neuronal, impedindo sua proliferação e sobrevivência (Czeh et al., 2001, 2002; Mirescu e Gould, 2006; Oomen, 2007; Wong e Herbert, 2004). Neste sentido, um estudo coordenado por Lucassen demonstrou que a redução na proliferação celular induzida pelo estresse em ratos, poderia ter como causa a apoptose de células progenitoras, ou a parada do ciclo celular. Neste estudo, eles verificaram que, após o estresse crônico, tanto a proliferação celular quanto a apoptose estavam reduzidas em contrapartida ao aumento de um fator inibitório do ciclo celular (p27Kip1), indicando que mais células haviam entrado em parada no ciclo (Heine et al., 2004b).

Ao que tudo indica, a interferência do estresse crônico como fator gerador de apoptose no SNC, mostrando uma inter-relação entre sistemas, como ocorre com o sistema cardíaco. Em um estudo atual foi demonstrado que ratos que apresentavam anedonia e comportamentos muito semelhantes à depressão, após serem submetidos a um estresse crônico, também apresentavam maior expressão de genes relacionados à apoptose no hipocampo, bem como no miocárdio (Wang et al., 2011).

As mudanças estruturais induzidas pelo estresse parecem ter caráter transitório, e algumas vezes acabam desaparecendo espontaneamente, quando os animais são submetidos a um período de recuperação (Heine et al., 2004a, b), ou quando os níveis elevados de corticosteroides são normalizados (Starkman et al.,

1992). Estas observações direcionaram muitos estudos para a investigação da ação de fármacos antidepressivos na rede neuronal alterada pelo estresse. Um destes trabalhos utilizou um tratamento com o antidepressivo Desipramina em ratos após estresse crônico e revelou que o fármaco opunha-se aos efeitos deletérios do estresse, uma vez que bloqueou a presença da caspase-3 em fatias de córtex, e aumentou a sobrevivência destes neurônios. O estudo ainda sugeriu que a depressão pode estar associada à perda neuronal, e que a intervenção farmacológica deva ser utilizada com o intuito de reverter a apoptose neuronal (Bachis et al., 2008). Ainda nesta linha de raciocínio, Wang et al. (2011) demonstraram recentemente que, durante o estresse crônico em ratos, ocorre um aumento das vias pró-apoptóticas no hipocampo, e que esse aumento foi revertido pelo fármaco antidepressivo venlafaxina. Este fármaco ainda aumentou a expressão do gene Bcl-xl (cuja proteína apresenta efeito anti-apoptótico) tanto no hipocampo, como no miocárdio.

Em outro estudo, ratos selecionados pela maior resiliência natural, por meio do menor tempo de imobilidade no teste do nado forçado, apresentaram aumento da expressão do gene Bcl-xl no hipocampo. Estes resultados, associados com a observação de redução de RNAm para Bcl-xl no hipocampo de ratos, após estresse crônico imprevisível (Kosten et al., 2008), sugerem fortemente um papel importante para esta proteína, como um fator de resistência ao desenvolvimento da depressão induzida pelo estresse. Além disso, o estresse imprevisível também reduziu a expressão do RNAm para Bcl-2, uma proteína de membrana com propriedade anti-apoptótica, em estruturas límbicas de ratos (Jiao et al., 2005; Kosten et al., 2008).

Portanto, pouco ainda se sabe sobre os efeitos do estresse crônico na expressão de genes que codificam proteínas apoptóticas (Shishkina et al., 2010). Uma vez que a apoptose é um processo essencial para o desenvolvimento normal do cérebro, bem como o desenvolvimento do sistema nervoso periférico (Akhtar et al., 2004; Jacobson et al., 1997), torna-se necessário um maior investimento em estudos acerca das vias de transdução de sinal relacionadas com os mecanismos de apoptose. Explorar novos mecanismos e fatores de transcrição que venham a impactar as vias apoptóticas representa um potencial para o surgimento de novas terapias para comorbidades médicas relacionadas à depressão (Pasco et al., 2010).

1.5 Fator de transcrição MAX

Proteínas do tipo hélice-alça-hélice leucina zipper (*basic helix-loop-helix/leucine zipper* - bHLHZ), são críticas para o desenvolvimento de quase todos os eucariotos e são conhecidas por contribuir com a neurogênese, miogênese, desenvolvimento do coração, hematopoiese, proliferação celular e na determinação da linhagem celular (Jones, 2004).

A proteína Max, anteriormente denominada de fator X associado à proteína Myc, é uma pequena fosfoproteína do tipo bHLHZ, composta de 159 aminoácidos e ubiquamente expressa (Blackwood e Eisenman, 1991; Hurlin e Huang, 2006). Ela se comporta como um componente obrigatório para o funcionamento da rede de fatores de transcrição Myc/Max/Mad, que controla a proliferação celular, diferenciação, apoptose e transformação celular (Faiola et al., 2007). Esta rede compreende um grupo de fatores de transcrição cujas funções afetam profundamente o comportamento das células (Amati e Land, 1994; Bouchard et al., 1998; Facchini e Penn, 1998; Henriksson e Lüscher, 1996) e que possuem duas características comuns. A primeira refere-se à presença dos domínios bHLHZ responsáveis pela mediação das interações proteína-proteína, e da interação com o DNA (Ferre D'Amare et al., 1994; Murre et al., 1989 a, b). A segunda é que cada um dos membros da rede utiliza seus domínios bHLHZ para formar heterodímeros com Max, resultando em dímero com sequência específica de ligação ao DNA e com atividade transcricional.

Como as proteínas que interagem com Max se ligam fracamente ao DNA, sugere-se que esta associação altamente específica ao Max proporcione a manifestação de suas atividades transcricionais. A habilidade de modular a transcrição é proveniente dos domínios específicos dentro dos fatores que dimerizam com Max, que através de outras interações atuarão como ativadores ou repressores (Grandori et al., 2000). Max é uma proteína estável (meia-vida aproximada de 24 h) com expressão homogênea, enquanto que as proteínas que se associam a ela apresentam meia-vida curta (por volta de 30 min) e biossíntese altamente regulada (Hurlin e Huang, 2006). Este perfil sugere que a regulação da rede seja, em grande parte, dependente da abundância destes fatores de transcrição associados ao Max (Berberich et al., 1992; Blackwood et al., 1992). Além disso, Max pode se ligar a outra molécula de Max, formando um homodímero, mas

esta união parece ser transcricionalmente inerte (Kato et al., 1992), ou apresentar uma fraca atividade repressora (Kretzner et al., 1992).

Max interage especificamente com todas as proteínas da família Myc (oncogene mielocitomatoso), resultando em heterocomplexos que reconhecem a sequência hexamérica do DNA, CACGTG (pertencentes à maior classe de sequências denominada de E-box, CANNTG). Desta forma, Myc requer Max para ativar a transcrição de genes que contêm sítios de ligação E-box (Amati et al., 1992), e a função de ativação da transcrição de Myc é mediada, pelo menos em parte, pelo recrutamento de uma histona acetiltransferase (HAT) (McMahon et al., 2000). O fator Max também interage com repressores transcricionais, tais como Mnt (Rox), Mxd1-4 (anteriormente denominados Mad1, Mxi1, Mad3, Mad4) e Mga; todos contendo domínios bHLHZ (Gallant e Steiger, 2009). Esses heterodímeros reprimem a transcrição de genes que são ativados pelo dímero Myc/Max, através da ligação direta a esses genes, recrutamento de complexos co-repressores, e por meio da competição das proteínas Myc para se ligarem com o Max (Gallant e Steiger, 2009). Como descrito anteriormente, Max é expresso constitutivamente em vários tipos celulares, porém Myc, e os repressores transcricionais mencionados, apresentam padrões de expressão contrastantes e altamente dinâmicos (Gallant e Steiger, 2009). O envolvimento destas proteínas nos principais eventos biológicos sugere que a função desta rede possa ser crítica para o desenvolvimento e crescimento celular (Grandori et al., 2000).

A importância biológica do fator Max é enfatizada pela precoce letalidade de camundongos desprovidos deste fator, enquanto sua superexpressão em células endoteliais pode antagonizar a apoptose (Shen-Li et al., 2000; Shichiri et al., 1999). Em um estudo desenvolvido por cientistas brasileiros (Petr-Silva et al., 2004), observou-se que o fator de transcrição Max desaparecia do núcleo de células ganglionares da retina de ratos após lesão axonal e de forma concomitante era encontrado em abundância no citoplasma e dendritos destas células. Este evento ocorria antes dos primeiros sinais de morte neuronal. A morte de células ganglionares da retina é um modelo amplamente aceito de apoptose no SNC (Weishaupt e Bahr, 2001). Ainda no modelo de Petr-Silva et al. (2004), foi demonstrado que esta exclusão (ou degradação) nuclear do fator de transcrição Max é um evento precoce, que precede e é independente da ativação de caspases na morte celular por apoptose destes neurônios ganglionares.

O mesmo grupo de pesquisadores, em outro trabalho, utilizando um vetor do tipo adenovirus-associado recombinante contendo o gene *max*, mostrou que esta proteína desempenha um papel protetor em neurônios da retina de ratos. Eles sugeriram que a exclusão (ou degradação) nuclear precoce de Max, em axônios danificados de células ganglionares, poderia ser um passo necessário para a execução da degeneração retrógrada (Petr-Silva et al., 2005).

Até o momento, pouco se sabe sobre este fator de transcrição fora do contexto de ciclo e proliferação celular, sendo principalmente estudados em trabalhos relacionados à área da oncologia. Não há relatos na literatura de estudos sobre o fator de transcrição Max em modelos animais de depressão induzida pelo estresse crônico, processos estes que parecem envolver a neurodegeneração. Desta forma, dentre os diversos fatores de transcrição envolvidos nos processos neurodegenerativos, Max parece apresentar a particularidade de exclusão (ou degradação) do núcleo e concomitante aparecimento (ou acúmulo) no citoplasma nos estágios iniciais que precedem a neurodegeneração, além de seu efeito protetor como descrito anteriormente. Dentro deste contexto, o melhor entendimento do fator Max em síndromes como a depressão, pode vir a contribuir não só para o entendimento de sua fisiopatologia, mas para o descobrimento de novos marcadores moleculares e terapias gênicas e/ou farmacológicas mais específicas para esta importante patologia.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Estabelecimento e padronização de um modelo de depressão através da submissão social prolongada em camundongos machos adolescentes. Verificar seus efeitos sobre comportamentos emocionais e sobre a expressão gênica e proteica do fator de transcrição Max no hipocampo.

2.2 Objetivos específicos

- ✓ Indução de subjugação social por 21 dias em camundongos C57BL/6 machos adolescentes.
- ✓ Análise dos efeitos desta subjugação prolongada sobre:
 - a) os comportamentos emocionais testados no Campo-Aberto (CA), labirinto em Cruz-Elevado (LCE), Nado-Forçado (NF) e Preferência por Sacarose (PPS);
 - b) a quantidade de RNAm para o gene *max* no hipocampo por transcrição reversa (RT) seguida de PCR quantitativo (qPCR);
 - c) a quantidade da proteína Max no hipocampo por imunoblot (Western Blot);
 - d) a localização da proteína Max nas sub-regiões hipocampais: CA1, CA3 e giro denteado, por imunohistoquímica;
 - e) a localização sub-celular da proteína Max no hipocampo por imunofluorescência.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Animais

Foram utilizados 32 animais C57BL/6 machos, adolescentes, provenientes da colônia do Instituto de Ciências Biomédicas (ICB) da Universidade de São Paulo (USP), e mantidos em nosso biotério no Instituto de Medicina Tropical (IMT), da Faculdade de Medicina da USP (FMUSP). Os animais com 30 dias de vida (desmame no 21º dia) foram selecionados aleatoriamente para os grupos experimentais. Os animais foram mantidos em grupos de três ou quatro por gaiola de polipropileno (28x17x12cm), recebendo água e comida *ad libitum* em um ciclo de claro-escuro de 12 h (claro às 7 h) e com temperatura ambiente de 22±2°C. Outros 12 camundongos C57BL/6 machos, adultos reprodutores de nossa colônia no IMT foram utilizados para os pareamentos conforme descrito posteriormente. A manipulação dos animais foi conduzida de acordo com os “Princípios Éticos de Experimentação Animal”, adotado pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA), e todo esforço foi feito para minimizar o desconforto dos animais durante o estudo. Este estudo foi aprovado pela *COMISSÃO DE ÉTICA EM EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL* (CEEA) do ICB, com protocolo registrado sob nº 069 em 03/06/2011.

3.2 Metodologia

3.2.1 Estabelecimento do modelo de estresse social prolongado

A indução do estresse crônico psicossocial em camundongos foi realizada de acordo com os procedimentos descritos por Miczek e O'Donnell (1978), Czéh et al. (2002), e adaptados por Pereira Junior (2008), conforme descrito a seguir.

3.2.1.1 Seleção dos animais agressivos

Esta seleção fez-se necessária para obtermos os camundongos que subjugaram os animais experimentais. Foram testados doze animais machos, adultos reprodutores, isolados há pelo menos quatro semanas, pois esta condição

sabidamente promove a elevação da agressividade (Bibancos et al., 2007). Em seguida, estes animais foram pareados individualmente em suas gaiolas-moradia com um camundongo jovem adulto, que estivesse agrupado com outros animais em suas gaiolas (condição de alojamento que promove menor grau de agressividade). Este pareamento foi observado por 15 min e uma escala de escores (+, ++, +++) foi adotada para classificar o grau de agressividade de cada camundongo isolado. A agressividade foi avaliada conforme parâmetros descritos por Chiavegatto et al., 2001, sendo estes: latência para a primeira mordida, número total de ataques com mordidas, duração total dos episódios de ataques e interações agressivas (*grooming* violento, perseguição, ameaças laterais). Os pareamentos foram repetidos por três dias consecutivos, e os animais que apresentaram escore +++, nos dois últimos pareamentos, foram utilizados nos testes experimentais como indutores do estresse por subjugação.

3.2.1.2 Indução do estresse social prolongado

Os animais agressivos selecionados foram mantidos isolados em suas gaiolas-moradia e a maravalha não foi trocada na semana que antecedeu o experimento. No dia do teste, um camundongo macho com 30 dias de vida (mantido agrupado e desprovido de qualquer manipulação experimental) foi introduzido cuidadosamente na gaiola do camundongo agressivo isolado (previamente selecionado). A gaiola foi coberta com uma tampa de vidro e o comportamento dos animais foi observado até que se iniciasse a interação agressiva.

No momento em que o animal-teste apresentou os primeiros sinais de fuga e/ou congelamento (*freezing*), uma tela metálica foi inserida no meio da gaiola de modo a separar os dois camundongos. Estas telas de arame, com malha de diâmetro médio de 0,8 cm, foram utilizadas para separar firmemente cada gaiola ao meio durante o experimento. Para cada camundongo agressivo foi utilizada uma tela de uso exclusivo. Um cuidado adicional foi dado em relação ao lado da gaiola em que o animal subjugado foi mantido após a separação com a tela, sendo mantidos de maneira aleatória, à esquerda, ou à direita do agressor. Cada animal-teste esteve por um período de 30 min junto ao seu agressor, mantendo a interação visual, olfativa e auditiva entre os animais (sem contato físico) (**Figura 1**).

Após este período, os camundongos-teste foram retirados e recolocados em suas gaiolas-moradia. Este procedimento foi repetido diariamente, no período entre 14 e 18 h, durante 21 dias consecutivos, sendo que os camundongos agressivos foram alternados nos pareamentos, não sendo utilizados mais que quatro vezes no mesmo dia. Animais do grupo controle foram manipulados diariamente, ao mesmo tempo em que os animais do grupo experimental se tornavam subjugados, porém em ambientes distantes para evitar pistas auditivas. Estes animais foram colocados em gaiolas vazias, limpas e de mesmas condições, sendo também separados ao meio por uma tela metálica durante 30 min. Cada animal controle possuía uma tela de uso exclusivo, para evitar pistas olfativas.

Figura 1 - Modelo de submissão social prolongado durante 21 dias em camundongos machos adolescentes.

Pareamentos diários por 30 min. As setas em vermelho indicam o animal agressor.

3.2.2 Delineamento experimental

Uma bateria de testes comportamentais foi iniciada no 16º dia de pareamento com o agressor. Todos os testes foram conduzidos no período da manhã entre 8 e 12 h. Os experimentos ocorreram na seguinte ordem: campo-aberto (CA), labirinto em cruz elevado (LCE), nado-forçado (NF) e teste de preferência por sacarose (PPS). Apenas um teste comportamental foi realizado por dia, e um período mínimo entre testes de 24 h foi utilizado. Em cada dia de teste, os experimentos foram feitos intercalando-se os camundongos do grupo experimental e controle. Durante todo este período, os animais de ambos os grupos continuaram no período da tarde sendo submetidos ao modelo de estresse social prolongado até que se completassem 21 dias.

Para possibilitar a avaliação dos aspectos comportamentais e moleculares dos animais, duas séries experimentais foram desenvolvidas.

Série Experimental I – Os animais desta série (6 de cada grupo), após terem sido analisados pela bateria comportamental, tiveram seus hipocampus coletados para análise da expressão gênica de Max por qPCR e expressão proteica por Western Blot. O sangue destes animais foi coletado para dosagem da corticosterona, **Figura 2**.

Figura 2 - Linha cronológica dos procedimentos da Série Experimental I.

Série Experimental II – Os animais desta série (10 de cada grupo), após terem sido analisados pela bateria comportamental, tiveram seus encéfalos fixados para a realização da imunohistoquímica (n=5/grupo) e imunofluorescência (n=5/grupo), **Figura 3**.

Figura 3 - Linha cronológica dos procedimentos da Série Experimental II.

3.2.3 Atividade motora espontânea no Campo-Aberto (CA)

O CA é um aparelho utilizado para a avaliação da atividade locomotora espontânea dos camundongos, e consiste em uma arena quadrada, de fórmica branca, de 60 cm, dividida em 36 quadrantes e com paredes de 30 cm altura, **Figura 4**. Possui uma abertura superior, que permite ao observador uma visão global do animal. O nível de luminosidade foi semelhante ao do biotério (aproximadamente 62 lux). O animal foi colocado individualmente no centro da arena e cada sessão teve 5 min de duração. Os parâmetros comportamentais foram registrados e quantificados pelo software ViewPoint® (Videotrack 3.0.; View Point, Lyon, France), que forneceu a distância total (cm) percorrida por cada animal nas respectivas áreas: área total (representada pelos 36 quadrantes); área central (4 quadrantes centrais) e área periférica (20 quadrantes adjacentes às paredes da arena).

O software registrou também a permanência (s) de cada animal nas respectivas áreas descritas. Embora o objetivo principal deste teste seja avaliar a atividade motora e exploratória do animal, ele possibilita também observar comportamentos relacionados à ansiedade e medo, devido ao conflito do roedor entre o estímulo de explorar um ambiente novo, e o medo gerado por ambientes abertos e claros. Isto é avaliado através da comparação entre a exploração no centro do CA (região aversiva) e na periferia, ou seja, quadrantes próximos às paredes do CA, que representam regiões mais seguras ao animal (Archer, 1973). Para minimizar a influência por odores emitidos pelo animal anterior, o CA foi limpo com uma solução de álcool 5% entre cada animal.

Figura 4 - Registro do animal em um aparelho de Campo-Aberto.

3.2.4 Comportamento relacionado à ansiedade no Labirinto em Cruz Elevado (LCE)

O comportamento relacionado à ansiedade foi avaliado através da utilização do LCE, construído a partir do descrito em Lister em 1987, com pequenas modificações, **Figura 5**.

Figura 5 - Registro do animal em um aparelho de labirinto em Cruz Elevado.

O aparato consiste em dois braços abertos e dois braços fechados de madeira recoberto por fórmica preta, sendo que cada braço possui 30 cm de comprimento e 5 cm de largura, estando a 50 cm do solo. Adicionalmente, os braços fechados possuem paredes de 15 cm de altura, e os braços abertos um pequeno degrau de 0,5 cm para minimizar possíveis quedas do camundongo. O ponto onde os braços se cruzam é formado por uma arena central de 5x5 cm, onde o animal é colocado, de frente para o braço aberto. O comportamento foi registrado e quantificado pelo software ViewPoint® (Videotrack 3.0.; View Point, Lyon, France), durante 5 min, fornecendo a distância total (cm) percorrida por cada animal nos braços abertos e a permanência (s) do mesmo nas respectivas áreas. O nível de luminosidade foi similar ao do biotério.

O LCE é um aparelho que promove uma situação de conflito no roedor, entre a tendência de explorar os braços do labirinto (ambiente novo) e a esquiva (medo ou insegurança) ao ambiente aberto, estreito e elevado representado pelos braços abertos. Neste sentido, a análise do padrão de exploração dos braços fechados (região segura) e abertos (região aversiva), permite avaliar o comportamento relacionado à ansiedade nos animais.

3.2.5 Comportamento relacionado à depressão no Teste do Nado-Forçado (NF) (Porsolt)

O NF é um modelo validado farmacologicamente para avaliar comportamentos associados à depressão em ratos (Detke e Lucki, 1996; Porsolt et al., 1978) e camundongos (Lucki et al., 2001; Porsolt et al., 1977). O NF é um teste comportamental que induz um estresse do tipo inescapável ao roedor, o qual após um período inicial de atividade vigorosa, na tentativa de escapar, adota uma postura imóvel. A administração de antidepressivos reduz o tempo de imobilidade (Porsolt et al., 1977b). Desta forma, trata-se de um teste utilizado amplamente na triagem de novos fármacos com possível efeito antidepressivo.

Os animais foram colocados individualmente, pela cauda, em um cilindro de vidro de 24 cm de profundidade e 17 cm de diâmetro, preenchido com 19 cm de água a $25 \pm 0,5$ °C (**Figura 6**). Os testes tiveram duração de 6 min, porém a medida comportamental foi feita nos últimos 4 min do teste, já que durante os primeiros 2 min o comportamento de imobilidade dificilmente é observado (Porsolt et al., 1977b). Os parâmetros registrados e quantificados pelo software ViewPoint® (VideoTrack 3.0) foram: o tempo total (s) em imobilidade (flutuação) e o tempo total (s) em nado (movimento) de cada animal.

Figura 6 - Registro do animal submetido ao teste do Nado-Forçado.

3.2.6 Comportamento de anedonia no Teste de Preferência por Sacarose (PPS)

A anedonia pode ser definida como incapacidade de sentir prazer diante de um estímulo prazeroso e trata-se de um dos sintomas descritos na depressão (American Psychiatric Association, 2000). Em modelo animal, este comportamento pode ser estudado através do teste de PPS, já que soluções adocicadas normalmente eliciam um comportamento hedônico (prazeroso) em roedores (Leeb et al., 1991).

O teste de PPS consistiu na quantificação da porcentagem de preferência do animal por sacarose, ao invés de água. O procedimento experimental foi realizado segundo a metodologia descrita por Pothion et al. (2004), com adaptação de Ofuchi (2010). Desta forma, no final da tarde do 18º dia, os animais foram alojados em gaiolas individuais e submetidos a um período de habituação de 24 h com dois bebedouros contendo água, que foram posicionados ao redor da ração (no lado direito ou esquerdo da caixa). Após 24 h, no 19º dia, um dos bebedouros contendo água foi substituído por outro contendo uma solução de sacarose 2% (Synth, Diadema, S.P., Brasil), e um período de habituação de 24 h com a solução adocicada foi oferecido aos animais.

No final da tarde do 21º dia, a quantificação do consumo por 24 h de água e de solução de sacarose 2% (iniciada no 20º dia) foram feitas através da diferença do volume de líquido inicial e final de cada bebedouro. Assim, a PPS foi obtida através da seguinte fórmula: $\text{Preferência (\%)} = [\text{solução de sacarose ingerida (mL)} / \text{total de fluido ingerido (mL)}] \times 100$. Em ambos os dias, os bebedouros foram trocados e uma nova solução de sacarose foi feita. Com o intuito de evitar a possibilidade de o animal ingerir mais líquido de um bebedouro em detrimento do outro, devido à localização, a posição dos bebedouros foi invertida de 12 em 12 h.

3.3 Sacrifício dos animais

3.3.1 Preparação das amostras da Série Experimental I

Os animais foram sacrificados por decapitação 24 h após último pareamento, portanto no 22º dia após início dos pareamentos, de maneira intercalada entre os grupos controle e experimental. O sangue do tronco de cada animal foi coletado em

microtubos mantidos em gelo até processamento. Os encéfalos foram imediatamente removidos dos crânios e os hipocampus direito e esquerdo dissecados sobre placa de *Petri* contendo gelo picado e congelados individualmente em nitrogênio líquido. As amostras hipocampais ficaram armazenadas a -80 °C até o uso.

3.3.2 *Preparação das amostras da Série Experimental II*

No 22^o dia do experimento, ou seja, 24 h após o último pareamento, os animais foram profundamente anestesiados com 5 mg/100 g de cloridrato de cetamina (Dopalen-Vetbrands) e 1 mg/100 g de cloridrato de xilazina (Anasedan-Vetbrands) intraperitonealmente, e perfundidos por via transcardíaca com salina tamponada e paraformaldeído a 4% em tampão fosfato 0,1 M (PB; pH 7,4). Os encéfalos foram retirados, pós-fixados no mesmo fixador por 4-6 h e posteriormente transferidos para uma solução de sacarose a 30% em PB, até a realização dos procedimentos de imunoistoquímica e imunofluorescência.

3.4 Determinação da concentração sérica de corticosterona

Os sangues coletados em microtubos em gelo foram centrifugados a 10.000 g por 15 min a 4 °C, para a obtenção dos soros. A dosagem de corticosterona foi feita por imunoensaio enzimático (Arbor Assays- DetectX® Corticosterone Enzyme Immunoassay Kit, # K014-H5). A curva padrão de corticosterona, assim como a dosagem das amostras, foram feitas em triplicata, em placa de 96 poços e segundo as especificações do fornecedor. Calculou-se a absorbância média das triplicatas, e a partir da curva padrão obteve-se a concentração das amostras. A absorbância foi lida em 595 nm no espectrofotômetro de placas Techne TC-5000 (Bibby Scientific).

3.5 Preparação das amostras para a quantificação da expressão gênica de *max*

3.5.1 *Extração do RNA*

O RNA total foi extraído com o reagente TRIzol (Invitrogen, Carlsbad, CA, EUA), seguindo protocolo sugerido pelo fabricante. Os hipocampus congelados,

provenientes de um hemisfério cerebral de cada animal e escolhidos aleatoriamente, foram rapidamente imersos em 1 mL de TRIzol gelado, homogeneizados por 30 s (Polytron PT10/35- Brinkmann, NY, EUA) e incubados à temperatura ambiente durante 5 min.

As amostras foram homogeneizadas com 200 µL de clorofórmio (Merck Inc., Darmstadt, Hessen, Alemanha) e incubadas por 3 min em temperatura ambiente e centrifugadas a 12.000 g, 4 °C, durante 15 min. O sobrenadante (fase aquosa) contendo RNA foi coletado, e adicionou-se 0,5 mL de álcool isopropílico (Merck), promovendo precipitação do RNA. O material foi incubado durante 10 min à temperatura ambiente e centrifugado a 12.000 g, 4 °C, durante 10 min. O sobrenadante foi removido e a fração precipitada de RNA foi lavada com etanol (Merck) e centrifugada a 7.500 g, 4 °C, durante 5 min. O precipitado obtido foi então ressuspensionado em 25 µL de água livre de RNases/DNases. A concentração e a pureza das amostras foram verificadas em espectrofotômetro (NanoDrop, Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, Mass, EUA) e através de um gel de agarose 1%. As soluções de RNA foram armazenadas em freezer a -80 °C, até o uso.

3.5.2 Síntese do DNA complementar (DNAC)

A síntese do DNAC foi feita utilizando-se 2 µg do RNA total, 4 µL de buffer 5X (250 mM de Tris-HCl pH 8,3; 375 mM KCl e 15 mM de MgCl₂), 1 µL de DTT 0,1 M, 0,5 µg de *primer* oligo(dT) (Invitrogen), 0,5 mM de cada dATP, dGTP, dCTP e dTTP, 40 U da enzima Rnase OUT (Invitrogen) e 200 U da enzima *SuperScript III Reverse Transcriptase* (Invitrogen), em um volume total de 20 µL de água isenta de RNases e DNases. Inicialmente, o RNA foi aquecido a 65 °C, por 5 min, e colocado no gelo até adição dos demais componentes. A reação foi incubada a 50 °C por 1 hora, e interrompida pelo aquecimento a 70 °C, por 15 min. As soluções de DNAC foram armazenadas em freezer a -80 °C, até o uso. Com esta reação obteve-se a transcrição reversa do RNAm.

3.5.3 Procedimento para confecção dos oligonucleotídeos iniciadores (*primers*)

Os oligonucleotídeos iniciadores específicos para o gene de interesse Max dos camundongos (*Mus musculus*), e para genes candidatos a controle interno

(genes com expressão similar entre os tratamentos, definido como genes de referência), foram desenhados utilizando-se o programa Primer 3 (http://www.genome.wi.mit.edu/cgi-bin/primer/primer3_www.cgi), sua especificidade foi verificada através do *BLAST* (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>) e a qualidade confirmada no programa BeaconDesign (<http://www.premierbiosoft.com>). Os oligonucleotídeos foram obtidos da IDT (Integrated DNA Technologies Inc., Coralville, IA, EUA). Os parâmetros teóricos utilizados na confecção consideraram: a) temperatura de anelamento em torno de 60 °C; b) tamanho máximo do produto de até 228 pb; c) porcentagem GC em torno de 50%; d) preferência por regiões situadas em diferentes exons ; e) tamanho do iniciador de no máximo 21 pb.

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

As reações de PCR quantitativo em tempo real (*qPCR*) foram feitas no equipamento *Rotor Gene 3000* (Corbett Research, Concord, Australia). A quantificação no *qPCR* é feita através do C_q (ciclo de quantificação), para cada amostra, que é o número de ciclos necessários para que a fluorescência emitida pela amostra alcance uma linha de detecção arbitrária (*threshold*), que está presente na fase exponencial da reação na qual a linearidade é mantida. É nesta fase que o resultado e a eficiência da reação são obtidos, e a fluorescência adquirida é proporcional ao número inicial de cópias da amostra. As reações continham 1 µL de amostra (DNAc), 200 nM de iniciadores senso e antisenso, sais, deoxinucleotídeos, a enzima *AmpliTaQ Gold* DNA polimerase (Applied Biosystems, Warrington, Reino Unido), o composto fluorescente *Sybr Green I*, otimizados para um volume final de 20µL.

A concentração ideal de DNAc a ser amplificado foi definida através de uma curva padrão de amplificação, contendo diluições seriadas para cada par de iniciador. As reações foram incubadas inicialmente a 95 °C, por 10 min, seguidas por 40 ciclos de 15 s a 95 °C e 60 s a 60 °C. Para cada corrida foram feitos os controles negativos: NTC (ausência de DNAc) e uma amostra de RNA total (controle negativo para verificar a possível presença de DNA genômico). As amostras referentes ao grupo controle e experimental, para cada gene, foram processadas sempre na mesma corrida, ou seja, na mesma série de microtubos e em triplicata. Após o término de cada corrida, a especificidade do produto de PCR formado foi

determinada através de uma corrida de dissociação (95 °C por 15 s, estabilização a 60 °C, seguida de aumento gradual de temperatura de 2 °C por min). Assim, somente foram utilizados os iniciadores cujos produtos amplificados mostraram pico único, claro e bem definido na temperatura correta.

As análises de expressão relativa foram feitas utilizando-se o programa Excel (Microsoft), seguindo metodologia escrita por Vandesompele et al. (2002). Através da média das triplicatas dos Cq obtidos para cada amostra e o valor de eficiência da amplificação, foi possível converter os dados obtidos de escala logarítmica para escala linear. A escolha do gene de referência utilizado no processo de normalização do gene de interesse foi feita através do programa geNorm (Vandesompele et al., 2002). Desta forma, a quantidade final normalizada do gene *max* foi obtida através da divisão de seu valor absoluto pelo valor absoluto do gene de referência selecionado.

3.6 Extração de proteínas para detecção de Max

Os hipocampus provenientes de um hemisfério cerebral de cada animal, e escolhidos aleatoriamente, foram descongelados em gelo e homogeneizados com pistilo em tampão de Lise – RIPA (50 mM Tris-HCl pH 7,4, 0,1% SDS, 5 mM EDTA, 1% Triton X-100, 1% deoxicolato de sódio, 1% NP-40, 150mM de NaCl), contendo coquetel de inibidores de proteases e fosfatases (1:1.000, Sigma), na proporção de 10 µl de tampão a cada 30 mg de tecido. Após a homogeneização, as amostras foram centrifugadas a 13.000 g por 15 min a 4 °C e os sobrenadantes foram retirados e armazenados a -20 °C, até o momento da quantificação.

A dosagem da concentração de proteínas foi realizada através do método de Bradford (1976), cujo princípio consiste na adição de um corante ácido a uma solução de proteínas, e subsequente medição da absorbância no comprimento de onda de 595 nm, em uma leitora de microplacas. A comparação com uma curva padrão de BSA na concentração de 1 µg/µl fornece a concentração de proteínas presentes nas amostras. Assim, 0,3 µl de amostra (extrato proteico diluído em tampão Ripa 1:3) foram aplicados por poço de uma microplaca de ELISA, juntamente com 200 µl/poço de corante de Bradford diluído 1:5 (Bio-Rad Laboratories, Inc., Hercules, CA, EUA). A curva padrão de BSA, com concentrações variando entre 6,25 e 200 ng de proteína/µl, também foi aplicada à placa acrescido

de 200 µl de corante de Bradford diluído 1:5 por poço. Após 10 min de incubação foi realizada a leitura espectrofotométrica a 595 nm (ECOM 6122, Eppendorf).

3.6.1 Quantificação da expressão proteica de Max por Western Blot

O sobrenadante recolhido durante a preparação do extrato foi utilizado no ensaio de western blot. A concentração de proteínas foi ajustada para cada amostra com água deionizada e tampão de amostra (60 mM Tris-base, 25% glicerol, 2% SDS, 0,1% azul de bromofenol pH 6,8) totalizando um volume de 30 µl. As amostras foram fervidas por 5 min a 95 °C e aplicadas em gel de SDS-poliacrilamida 15% [acrilamida/bisacrilamida (37,5:1), 15% SDS]. O gel foi submetido à eletroforese em tampão de corrida (250 mM Tris-base, 190 mM glicina e 20% SDS) por 2 h, a 100 V. As proteínas separadas e contidas no gel foram transferidas eletroforicamente para uma membrana de nitrocelulose por 2 h, a 250 mA, em tampão de transferência (250 mM Tris-base, 190 mM glicina, 20% metanol).

As membranas foram lavadas rapidamente com TTBS [TBS (20 mM Tris-base, 137 mM NaCl), 1% Tween® 20, pH 7,4] e incubadas por 1 h à temperatura ambiente, com 50 ml de tampão de bloqueio (5% BSA em TTBS), sob agitação. Novamente, elas foram lavadas com TTBS e seladas juntamente com o anticorpo primário anti-Max feito em coelho (C-17, # SC-197, Lot. G219, Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, EUA), diluído 1:1.000 em 5% de BSA, com TTBS. As membranas foram incubadas sob agitação, por um período de 16 h, a 4 °C. Após essa etapa, elas foram lavadas 2 vezes em TTBS, por 10 min, sob agitação e à temperatura ambiente. Foram seladas e incubadas por 1 h à temperatura ambiente, sob agitação, com o anticorpo secundário anti-coelho (Anti-rabbit IgG, HRP-linked Antibody- Cell Signaling Technology, Inc., Beverly, MA, EUA), diluído 1:2.000 em TTBS. Após esta etapa, as membranas foram lavadas 3 vezes em TTBS, por 10 min, sob agitação e à temperatura ambiente. A revelação foi feita com o kit de quimioluminescência ECL-Plus® (GE Healthcare UK Limited, Little Chalfont, Buckinghamshire, Reino Unido).

As mesmas membranas, após a revelação com ECL, foram lavadas 3 vezes com TTBS, por 10 min, sob agitação e à temperatura ambiente. Em seguida, as mesmas foram incubadas com tampão de bloqueio por 1 h, à temperatura ambiente, sob agitação, lavadas rapidamente com TTBS e incubadas por um período de 16 h,

a 4 °C, sob agitação, com anticorpo primário anti- α -tubulina, feito em camundongo (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA), diluído 1:10.000 em 5% BSA, com TTBS. As membranas foram lavadas 2 vezes com TTBS, por 10 min, sob agitação e à temperatura ambiente e incubadas com anticorpo secundário anti-camundongo (Sigma-Aldrich), diluído 1:2.000 em TTBS, por 1 h, à temperatura ambiente, sob agitação. Após nova série de 3 lavagens em TTBS, por 10 min à temperatura ambiente e sob agitação, as membranas foram reveladas com o kit de quimioluminescência ECL-Plus®. Os filmes de cada uma das membranas foram escaneados e a quantificação da densidade óptica foi realizada com o *software* ImageJ (NIH ImageJ versão 371.43u), normalizando-se os valores de densidade óptica de Max pelos valores de densidade óptica da α -tubulina. Este ensaio foi feito com a assistência da professora Hilda Petrs-Silva da Universidade Federal do Rio de Janeiro.

3.7 Avaliação da expressão proteica de Max por imunoistoquímica

Os encéfalos fixados foram seccionados coronalmente a 30 μ m de espessura, em um micrótomo deslizante, para congelamento. Os cortes histológicos foram colocados em placa de cultivo de 6 compartimentos, mantidos sob agitação constante e submetidos às seguintes etapas:

- a) 3 lavagens em PB de 10 min cada;
- b) incubação por um período de 12 h à temperatura ambiente, em solução contendo PB-T (0,3% de Triton X-100), 5% de soro normal de cabra e anticorpo primário policlonal de coelho, contra a porção carboxi-terminal da proteína Max (C-17, # SC-197, Lot. K2911, Santa Cruz Biotechnology), diluído a 1:200;
- c) 3 lavagens em PB de 10 min cada;
- d) incubação durante 2 h à temperatura ambiente, com anticorpo secundário biotilado (Biotin-SP-Conjugated Goat Anti-Rabbit IgG, Lot.60640, Jackson Immunoresearch, West Grove, PA, EUA), diluído a 1:200 em PB, contendo 0,3% de Triton X-100;
- e) 3 lavagens em PB de 10 min cada;
- f) incubação com um complexo avidina-biotina-peroxidase (ABC-Elite, Vector, CA, USA), preparada com 10 μ L da solução A e 10 μ L da solução B por mL

de PB, contendo 0,3% de Triton X-100 e NaCl (0,3M – 0,5M), durante 90 min, à temperatura ambiente;

- g) três lavagens com PB durante 10 min cada. A marcação com peroxidase foi realizada utilizando-se o cromógeno 3,3'-diaminobenzidina (DAB) dissolvido em PB durante 3 min, e em seguida foi adicionada uma solução de 0,3% de peróxido de hidrogênio em água destilada.

Após o desenvolvimento da cor, os cortes foram lavados 3 vezes com PB por 10 min cada, colocados sobre lâminas de vidro gelatinizadas e deixados por aproximadamente 24 h em uma placa de aquecimento a 37 °C para uma melhor adesão dos cortes nas lâminas. Em seguida, as lâminas foram deixadas por 5 min em água destilada e mergulhadas em uma solução de 0,05% de tetróxido de ósmio por aproximadamente 15 s, para intensificação da marcação. Logo após, as lâminas foram submetidas a 3 lavagens em PB de 10 min cada e submetidas a uma bateria de desidratação, que consiste em uma série crescente de alcoóis e por um solvente clareador (Hemo-De, Fisher, PA, EUA), com duração de 5 min para cada estágio. As lâminas foram cobertas com lamínulas usando Permount (Fisher, PA, EUA) como meio de montagem. A imunoistoquímica foi realizada com a assistência do Prof. Luiz Roberto G. de Britto, do Departamento de Fisiologia do Instituto de Ciências Biomédicas da USP.

3.8 Análise microscópica, obtenção das imagens digitais e quantificação

As imagens digitais das sub-regiões do hipocampo CA1, CA3 e giro denteado foram obtidas por meio de um microscópio Aristoplan (Leitz), equipado com uma câmera CCD-72S (Dage-MTI, Michigan City, IN, EUA). A média da densidade óptica das imagens digitais foi comparada com a média da densidade óptica de regiões adjacentes às estruturas analisadas no respectivo corte histológico, utilizando-se o programa ImageJ 4.37 (Wayne Rasband, National Institutes of Health, USA). Desta maneira, obteve-se um índice que reflete a razão entre regiões marcadas e não marcadas. Os índices obtidos foram comparados estatisticamente entre animais controles e experimentais. As regiões encefálicas foram identificadas de acordo com Paxinos e Franklin (2001), e no mínimo 5 cortes de cada região do hipocampo (bregma 2,40 mm a 2,20 mm) de cada animal foi examinada.

3.9 Avaliação subcelular da expressão protéica de Max por imunofluorescência

Os cortes dos encéfalos dos animais foram incubados com o anticorpo primário policlonal de coelho, contra a porção carboxi-terminal da proteína Max (C-17, # SC-197, Lot. K2911, Santa Cruz Biotechnology) diluído a 1:100 e 5% de soro normal de cabra. Após a incubação por um período de 12 h com o anticorpo primário, os cortes foram lavados 3 vezes por 10 min em PB e incubados com o anticorpo secundário fluorescente e DAPI (4',6'-diamidino-2-phenylindole; Prolong® Gold antifade reagent, Invitrogen), diluídos 1:50 em PB, contendo 0,3% de Triton X-100, por 2 h no escuro. O secundário utilizado foi um anticorpo anti-coelho feito em cabra conjugado a rodamina (TRITC; Jackson ImmunoResearch Laboratories), e para a marcação nuclear foi utilizado o DAPI.

Após 3 lavagens de 10 min em PB, os cortes foram montados em lâminas e deixados para secar em temperatura ambiente durante 1 h. Em seguida, as lâminas foram cobertas com lamínulas, utilizando-se uma solução de glicerol carbonato e vedadas com esmalte. Finalmente, o material foi analisado em microscópio de fluorescência (Aristoplan-Leitz) e as imagens digitais foram coletadas e montadas com o programa Adobe Photoshop (Adobe Systems Inc.). A imunofluorescência foi realizada com a assistência do Prof. Luiz Roberto G. de Britto.

3.10 Análise estatística

Todos os resultados obtidos estão expressos em média $\pm$ erro padrão da média (EPM). As análises foram feitas utilizando-se o programa estatístico GraphPad Prism (versão 5.0, GraphPad Software, San Diego, CA, EUA). Desta forma, para análise dos resultados que apresentavam distribuição paramétrica foi utilizado teste *t* de *Student*. A probabilidade de $p < 0,05$ foi utilizada para revelar diferença estatisticamente significativa entre os grupos comparados.

4 RESULTADOS

4.1 Atividade motora espontânea no Campo-Aberto (CA)

A atividade motora espontânea dos animais foi avaliada no CA no 16º dia do início do protocolo diário de estresse por submissão social. Os animais pertencentes à Série Experimental I (n=6/grupo), não apresentaram alteração estatisticamente significativa na locomoção total, quando comparados aos animais do grupo controle (t=0,94 e p=0,36), **Figura 7**. O mesmo também foi observado na locomoção central (t=0,70 e p=0,50) e na lateral (adjacente às paredes), que não diferiram entre os grupos (t=0,42 e p=0,68), **Figura 7**. Não foi observada alteração estatisticamente significativa na locomoção total, central e lateral nos animais do grupo experimental em relação ao grupo controle, pertencentes à Série Experimental II (n=10/grupo) (t=0,041 e p=0,96; t=1,1 e p=0,29; t=0,48 e p=0,63; respectivamente).

Não foi observada alteração estatisticamente significativa em relação ao tempo gasto nas diferentes áreas (total, central e lateral) do CA, entre os grupos de ambas as séries. Série Experimental I (t=0,97 e p=0,35; t=0,28 e p=0,78; t=0,30 e p=0,77) e Série Experimental II (t=0,24 e p=0,81; t=1,0 e p=0,33; t=0,15 e p=0,88), **Figura 7**.

Figura 7- Efeitos do estresse prolongado por subjugação social em camundongos machos adolescentes, sobre a atividade locomotora total, central e periférica em um campo-aberto durante 5 min.

A

B

Teste realizado no 16º dia do início do pareamento diário com o agressor. Os gráficos abaixo representam a distância percorrida em centímetros (cm) e a duração da atividade locomotora em segundos (s). **A.** Série Experimental I. **B.** Série Experimental II. Média $\pm$ EPM; $p > 0,05$, teste *t* de Student.

4.2 Comportamento relacionado à ansiedade no Labirinto em Cruz Elevado (LCE)

No 17º dia do início do protocolo diário de estresse por submissão social, os animais foram testados quanto à presença de comportamentos relacionados à ansiedade no modelo do LCE. Os animais pertencentes à Série Experimental I ($n=6/\text{grupo}$) não apresentaram alteração estatisticamente significativa em relação à permanência no braço aberto ($t=0,55$ e $p=0,6$), nem na locomoção no braço aberto ($t=1,3$ e $p=0,22$). O mesmo foi observado com os animais pertencentes à Série

Experimental II (n=10/grupo) que não apresentaram diferença estatisticamente significativa em relação à permanência no braço aberto, ($t=0,85$ e $p=0,4$), nem na locomoção no braço aberto ($t=0,71$ e $p=0,48$), quando comparados aos animais do grupo controle, **Figura 8**. Desta forma, os resultados mostraram que o modelo de estresse social empregado neste estudo não interferiu no comportamento ansioso, observado através das medidas analisadas.

Figura 8 - Efeitos do estresse prolongado por subjugação social em camundongos machos adolescentes, sobre comportamentos relacionados à ansiedade, observados por 5 min em um labirinto em cruz elevado.

A

B

Teste realizado no 17º dia do início do pareamento diário com o agressor.

A. Série Experimental I. **B.** Série Experimental II. Média $\pm$ EPM; $p > 0,05$, teste *t* de Student.

4.3 Comportamento relacionado à depressão no Teste do Nado Forçado (Porsolt) (NF)

A duração da imobilidade e da atividade média no teste do NF foi avaliada no 18º dia do início do pareamento diário com o agressor. A análise dos 4 últimos min do teste mostrou um efeito pró-depressivo do estresse de subjugação social, através de um aumento na imobilidade observada no grupo experimental em relação ao grupo controle (n=6/grupo) na Série Experimental I (t=2,6 e p=0,02), **Figura 9**. O mesmo efeito não foi observado nos animais pertencentes à Série Experimental II, em que não foi observado diferença estatisticamente significativa no tempo de imobilidade dos animais do grupo experimental em relação aos do grupo controle (n=10/grupo) (t=1,3 e p=0,22), **Figura 9**.

Figura 9 - Efeitos do estresse por subjugação social em camundongos machos adolescentes sobre a duração da imobilidade nos 4 últimos minutos do teste de nado forçado.

A

B

Teste realizado no 18º dia de início do pareamento diário com o agressor.

A. Série Experimental I. **B.** Série Experimental II. Média ± EPM; *p<0,05, teste *t* de Student.

4.4 Comportamento de anedonia no teste de Preferência por Sacarose (PPS)

O comportamento relacionado à anedonia foi verificado no 21º dia, no qual os consumos de água e de solução de sacarose 2% foram avaliados durante um período de 24 h. A determinação dos consumos foi feita através da medida do volume nos bebedouros. A análise dos resultados evidenciou uma redução de 41% da preferência por sacarose nos animais do grupo experimental em relação aos do grupo controle (n=6/grupo, Série Experimental I) ($t=1,65$ e $p=0,03$), **Figura 10**. Efeito semelhante foi observado nos animais experimentais da Série Experimental II, apresentando uma redução de 19% da preferência por sacarose em relação ao controle (n=10/grupo) ($t=2,2$ e $p=0,04$), **Figura 10**.

Figura 10 - Efeitos do estresse de subjugação social em camundongos machos adolescentes sobre o consumo de água e sacarose.

A

B

Teste realizado no 21º dia de início do pareamento diário com o agressor por um período de 24h

A. Série Experimental I. **B.** Série Experimental II. Média $\pm$ EPM; * $p < 0,05$, teste *t* de Student.

4.5 Concentração sérica de corticosterona

A concentração sérica de corticosterona, avaliada no 21^o dia do pareamento diário com o agressor, não se mostrou estatisticamente diferente entre os animais dos grupos controle e experimental (n=6/grupo) da Série Experimental 1 (t=0,56 e p=0,59). Resultados representados na **Figura 11**.

Figura 11 - Efeitos do estresse de subjugação social por 21 dias em camundongos machos adolescentes sobre a quantificação sérica de corticosterona.

Dados representam a média $\pm$ EPM; $p > 0,05$, teste t de Student.

4.6 Pares de iniciadores utilizados para a amplificação dos genes

A tabela a seguir (**Tabela 1**) apresenta os iniciadores desenhados para a produção dos transcritos referentes ao gene de interesse Max e aos genes de referência *Ppia*, *Actb*, *Hprt1* e *Gapdh*, bem como o seu tamanho.

Quadro 1 - Sequência dos pares de iniciadores utilizados para *qPCR* e o tamanho do produto (pares de base)

Gene	Sequência 5 -> 3 -F/R	Tamanho do produto (pb)
Max (NM_008558.1)	GCAGTGAGGTGGTTGTCGCCC/ ACCTCGGTTGCTCTTCGTCGC	228
Ppia (NM_008907)	AATGCTGGACCAAACACAAA/ CCTTCTTTCACCTTCCCAA	101
Actb (NM_007393)	GTGGGAATGGGTCAGAAGG/ GGTCATCTTTTCACGGTTGG	228
Hprt1 (NM_013556)	TGTTGTTGGATATGCCCTTG/ GCGCTCATCTTAGGCTTTGT	106
Gapdh (NM_001001303)	AGGAGCGAGACCCCACTAAC/ GTGGTTCACACCCATCACAA	179

4.7 Quantificação de RNAm para Max no hipocampo

A quantidade de transcritos (referente ao RNAm) do gene Max no hipocampo dos camundongos estressados não diferiu daquela encontrada no grupo controle (n=6/grupo, Série Experimental I, t=0,074 e p=0,94). A quantidade de transcritos foi representada de forma relativa, calculada através da normalização dos resultados brutos pela expressão do gene que menos se alterou no hipocampo com o tratamento realizado (gene de referência). Para isso, foram testados 4 genes de referência: *Ppia* (ciclofilina), *Hprt* (hipoxantina-guanina-fosforibosil-transferase), *Gapdh* (gliceraldeído-3 fosfato desidrogenase) e *Actb* (*b*-actina). A média geométrica da quantidade de transcritos do *Ppia* foi utilizada como fator de normalização. Os níveis de expressão dos três genes normalizadores testados não variaram entre os grupos (*Ppia*: 0,627 ± 0,113 vs. 0,786 ± 0,187; *Hprt1*: 0,341 ± 0,164 vs. 0,403 ± 0,030; *Gapdh*: 0,740 ± 0,192 vs. 0,875 ± 0,160; *Actb* 0,488 ± 0,275 vs. 0,561 ± 0,17; p>0.05). Dados ilustrados na **Figura 12**.

Figura 12 - Efeitos do estresse de subjugação social por 21 dias em camundongos machos adolescentes sobre a quantificação do RNAm de Max no hipocampo.

Dados representam a média $\pm$ EPM; $p > 0,05$, teste t de Student.

4.8 Análise da expressão protéica de Max

Nossos resultados mostram um aumento de 20% ($t=0,55$ e $p=0,01$) na expressão proteica de Max nos animais da Série Experimental I submetidos ao estresse por submissão social, quando comparados ao grupo controle ($n=6$ /grupo). Os resultados são demonstrados na **Figura 13**.

Figura 13 - Efeitos do estresse de subjugação social por 21 dias em camundongos machos adolescentes sobre a expressão proteica de Max no hipocampo quantificada por western blot.

Dados representam a média $\pm$ EPM; $p^* < 0,05$, teste t de Student.

4.9 Avaliação da expressão protéica de Max por imunoistoquímica

Nossos resultados de imunoistoquímica mostram que o estresse por submissão social promoveu um aumento da imunomarcção de Max no grupo experimental, nas três sub-regiões do hipocampo analisadas, quando comparadas aos seus respectivos controles ($n=5/\text{grupo}$, Série Experimental II), **Figura 14**. Na área CA1 houve aumento de 36% ($t=2,3$ e $p=0,04$), na área CA3 houve aumento de 30% ($t=2,5$ e $p=0,03$), e no giro denteado (DG) houve aumento de 20% ($t=2,9$ e $p=0,02$). Os valores estão apresentados na **Figura 16**. A contagem do número de células imunomarcadas feitas na região do hilo do hipocampo não mostrou diferença significativa entre os grupos ($n=5/\text{grupo}$, $t=1,3$ e $p=0,23$), **Figura 18**. A região do caudado putamen (CP) não mostrou diferença estatisticamente significativa na imunomarcção entre os grupos experimental e controle ($n=4/\text{grupo}$, $t=0,50$ e

$p=0,53$). As imagens da imunistoquímica e a quantificação da expressão proteica de Max estão representadas pelas **Figuras 15 e 17**, respectivamente.

Figura 14 - Imagens digitais de cortes coronais dos cérebros de camundongos ilustrando a expressão de Max nas regiões CA1, CA3 e giro denteado (DG), do hipocampo de camundongos machos adolescentes submetidos ao modelo de estresse social, e seus respectivos controles.

Notar o aumento da expressão de Max no grupo experimental em todas as estruturas. Aumento de 10X.

Figura 15 - Imagens digitais de cortes coronais dos cérebros de camundongos ilustrando a expressão de Max na região do caudado putamen (CP) de camundongos machos adolescentes submetidos ao modelo de estresse social, e seu respectivo controle.

Figura 16 - Efeitos do estresse de subjugação social por 21 dias em camundongos machos adolescentes sobre a expressão de Max quantificada por imunistoquímica.

Áreas CA1, CA3, giro denteado (DG) do hipocampo (n=5/grupo). Análise estatística por Teste t *Student* *p < 0,05.

Figura 17 - Efeitos do estresse de subjugação social por 21 dias em camundongos machos adolescentes sobre a expressão de Max quantificada por imunistoquímica.

Região do caudado putamen (CP) (n=4/grupo). Análise estatística por Teste t *Student* $p > 0,05$.

Figura 18 - Efeitos do estresse de subjugação social por 21 dias em camundongos machos adolescentes sobre o número de células marcadas com Max quantificadas por imunistoquímica no hilo do hipocampo (n=5/grupo).

Análise estatística por Teste t *Student* $p > 0,05$.

4.10 Avaliação subcelular de Max no hipocampo através da técnica de imunofluorescência

Ao analisar as regiões hipocâmpais (área CA1, CA3 e giro dentado), observamos a imunomarcagem de Max presente nos mesmos compartimentos celulares marcados com DAPI. Isto ocorreu tanto no grupo controle como no grupo experimental (n=5/grupo, Série Experimental II); **Figura 19**.

Figura 19 - Imunofluorescência de cortes coronais dos cérebros de camundongos ilustrando a expressão de Max nas regiões CA1, CA3 e giro denteado (DG) do hipocampo de camundongos machos adolescentes, submetidos ao modelo de estresse social por 21 dias e seus respectivos controles.

Para marcação nuclear foi utilizado DAPI (representado em azul) e para identificação de Max utilizou-se o anticorpo policlonal contra a porção carboxi-terminal da proteína (marcado em vermelho). Aumento 40X.

5 DISCUSSÃO

5.1 Aspectos comportamentais

A avaliação da atividade motora espontânea foi feita em um CA por 5 minutos, no 16º dia do estresse diário. Os animais subjugados prolongadamente ambularam de forma semelhante aos animais do grupo controle, bem como demonstraram um mesmo padrão de locomoção entre as áreas da arena.

Em nosso estudo, os animais que sofreram a submissão social não demonstraram alteração na atividade exploratória no CA, o que está de acordo com os achados de Kinsey et al. (2007). Estes autores relataram que camundongos adultos das linhagens C57BL/6 e CD-1, que sofreram submissão social através de um camundongo-agressor durante seis dias, e por um período diário de duas horas, não apresentaram diferença significativa no CA, independente da linhagem utilizada. O estudo também relatou que, de acordo com o modelo de estresse por submissão social utilizado, houve um aumento da ansiedade sem, portanto, afetar os níveis de atividade geral (Kinsey et al., 2007). Da mesma forma, em outro estudo utilizando ratos Wistar, os animais foram submetidos ao estresse por submissão social durante dois dias, por um período diário de uma hora. Neste trabalho, os animais eram expostos duas vezes ao seu agressor, sofrendo, portanto, duas vezes o estresse por submissão social. Este estudo também relatou não haver diferença na atividade locomotora total e periférica no CA (Kinn et al., 2008).

Por outro lado, outros trabalhos descritos na literatura revelam haver reduções na locomoção, ou da atividade exploratória no CA, após terem sofrido o estresse de submissão social. Assim, foi observado em ratos Wistar, submetidos diariamente, durante uma hora e por um período de cinco semanas ao estresse de submissão social, uma diminuição da atividade locomotora e exploratória no CA, indicando uma perda de interesse por situações estimulantes novas (Koolhaas et al., 1997; Meerlo et al., 1996; Overstreet et al., 2005; Pistovcakova et al., 2005; Rygula et al., 2005). Curiosamente, dentro deste contexto, foi observado em camundongos machos adultos, e que sofreram por um período de 4 semanas, variados tipos de estresse, tais como: estresse de restrição, submissão e suspensão pela cauda, uma hiperlocomoção e mudanças no comportamento do nado forçado. O mesmo não foi observado em animais que sofreram eventos estressantes similares, mas por um

período de apenas uma semana (Strekalova et al., 2005). Desta forma, Strekalova et al. (2005) concluíram que a duração do estresse é um fator crítico, particularmente na indução da hiperatividade em camundongos. Assim, a identificação da ansiedade elevada e a hiperlocomoção em camundongos cronicamente estressados não implica a presença de anedonia e síndromes como a depressão, pelo menos na linhagem C57BL/6N (Strekalova e Steinbusch, 2010). Curiosamente, recentes estudos psicofarmacológicos suportam a falta de relação entre anedonia, ansiedade e hiperlocomoção, como consequências "não-específicas" do estresse (Strekalova e Steinbusch, 2010). Assim, os nossos resultados tomados em conjunto com os relatos da literatura reforçam a importância da validação detalhada de cada modelo estudado dentro do contexto próprio de cada laboratório.

O componente emocional relacionado à ansiedade foi avaliado também através do LCE. A análise do comportamento dos animais no LCE, no 17º dia do estresse diário, não revelou nenhuma alteração nos diversos parâmetros estudados. Neste sentido, os animais exploraram de maneira semelhante os braços fechados (região segura) e abertos (região aversiva) do aparelho. Neste teste, fármacos ansiolíticos do tipo benzodiazepínicos aumentam a exploração dos braços abertos, enquanto reduzem a exploração dos braços fechados (Lister et al., 1987). Assim, a análise da ansiedade em dois paradigmas diferentes – o CA e o LCE – sugeriu que o modelo de estresse social empregado neste estudo, possivelmente não altere este componente emocional. Uma possível explicação para estes resultados, e que corroboram estudos anteriores, seria o fato de que após sofrerem o estresse de submissão social, os animais não permaneceram alojados isoladamente. Desta forma, o alojamento dos animais em grupos possivelmente evitou o resultado comportamental negativo (Isovich et al., 2001; Ruis et al., 1999). Outro estudo mais recente, e que obteve resultados semelhantes, foi realizado com ratos adolescentes, que após sofrerem o estresse de submissão social por 5 dias consecutivos demonstraram ser menos ansiosos no LCE e na exploração do CA. Neste estudo, os animais experimentais também permaneceram socialmente alojados após as subjugações e mostraram um forte aumento na concentração de norepinefrina, no giro denteado ventral do hipocampo, que mostrou correlação altamente significativa com a diminuição do comportamento de ansiedade (Watt et al., 2009), corroborando os nossos achados. Desta forma, a presença do comportamento ansioso em camundongos submetidos ao estresse crônico não implica na presença de anedonia

e no comportamento depressivo. É interessante ressaltar que alguns estudos psicofarmacológicos demonstram não haver uma relação específica e obrigatória entre a anedonia e os comportamentos de ansiedade e hiperlocomoção, que podem estar presentes como consequência do estresse (Strekalova e Steinbusch, 2010).

O teste do Nado-Forçado (NF) foi idealizado por Porsolt e colaboradores em 1977, sendo um experimento clássico utilizado para verificar o efeito de drogas sobre o comportamento relacionado à depressão em roedores. Após um período de atividade de nado vigoroso, o roedor adota uma postura passiva de imobilidade que é inibida por antidepressivos (Porsolt et al., 1977b). Muitos estudos envolvendo modelos animais de estresse crônico por submissão social mostram um aumento da imobilidade no teste do NF em roedores que sofreram o estresse. Um trabalho coordenado por Peter Gass demonstrou que camundongos adultos, da linhagem C57BL/6, apresentavam um aumento na duração da imobilidade após terem sido submetidos à submissão social por um período de quatro semanas (Strekalova et al., 2004). O mesmo foi observado por Rygula et al. (2005), em ratos *Wistar*, que sofreram estresse por submissão social por um período de 5 semanas. A análise do comportamento dos nossos animais da primeira série experimental neste teste revelou um aumento do período de imobilidade no grupo submetido ao estresse de submissão social, quando comparado ao controle, indicando, portanto, que 21 dias de estresse crônico por submissão social foi suficiente para gerar um efeito pró-depressivo. O mesmo no entanto não foi observado nos animais da segunda série experimental e que sofreram o mesmo tipo de estresse. Esta diferença nos resultados enriquece a discussão deste trabalho, pois embora o NF seja um teste comportamental amplamente utilizado, ele não é o melhor parâmetro para avaliar a depressão. A maior vulnerabilidade neste parâmetro encontra-se no fato de que neste teste um estresse de curta-duração é aplicado ao roedor, o que é muito diferente da depressão humana, na qual há uma vulnerabilidade genética combinada a uma cronicidade da exposição ambiental para, enfim, produzir uma patologia comportamental de longa duração. Do mesmo modo, a capacidade dos antidepressivos em produzir uma resposta rápida, após doses únicas nestes testes, contradiz totalmente com a necessidade, já bem estabelecida, do uso de forma crônica de antidepressivos (semanas a meses) para a obtenção de uma resposta clínica em humanos (Berton e Nestler, 2006; Nestler et al., 2002).

Além disso, permanece desconhecido se estes testes são sensíveis a

mecanismos de ação não-monoaminérgicos dos antidepressivos. Apesar dessas fragilidades, o NF é amplamente usado para demonstrar que uma mutação genética ou uma manipulação experimental produziu depressão ou um efeito antidepressivo em roedores (Nestler e Hyman, 2010). Outros estudos reforçam os comentários descritos acima, uma vez que diferentes linhagens de ratos e camundongos mostraram neste teste respostas basais completamente diferentes. Camundongos da linhagem DBA/2, por exemplo, apresentam ausência de resposta de antidepressivos no NF. Assim, as desvantagens do emprego do teste do NF, é que ele apresenta baixa validade de face e constructo, sendo o estímulo estressor causador da imobilidade um estímulo agudo, o que não corresponde com o TDM em humanos (Yan et al., 2010; Willner e Mitchell, 2002). A anedonia é considerada hoje, o sintoma central da depressão, razão pela qual, a maioria dos modelos atuais só reproduz este comportamento (Krishnan e Nestler, 2008).

A anedonia e o humor deprimido são considerados como os principais sintomas da depressão clínica (Klein, 1974). Devido à anedonia ser um fenômeno central de transtornos depressivos, que podem ser vistos em roedores, o déficit hedônico pode ser considerado um elemento principal a ser abordado em modelos de depressão em animais (Strekalova e Steinbusch, 2010). Além disso, esta abordagem tem a vantagem de ser baseada nos sintomas de depressão e, portanto, possuir validade de face mais convincente (Nestler e Hyman, 2010). Modelos de diminuição da preferência por sacarose não são resultantes de um déficit motor ou sensorial, são interpretados como demonstração de anedonia e, portanto, de comportamentos associados à depressão. Embora a anedonia não seja específica para a depressão (ela também é vista na esquizofrenia e na retirada de estimulantes), é um sintoma central nesta síndrome, sobre a qual hipóteses neurobiológicas são testáveis, tornando-se um alvo atrativo para investigação em modelos animais (Nestler e Hyman, 2010).

Por sua vez, o estresse crônico é considerado um dos métodos mais adequados para imitar a depressão em roedores, isto porque ele encaixa-se nos critérios de validade de face, que implica na indução da anedonia, e simula relevância etiológica do estresse em transtornos depressivos (Anisman e Matheson, 2005; Cryan e Holmes, 2005; McArthur e Borsini, 2006; Strekalova, 2008). Com base nos princípios teóricos e metodológicos de simular a depressão em um paradigma de estresse crônico, uma série de procedimentos foram elaborados e validados

durante as décadas seguintes em ratos e camundongos (Baker et al., 2006; Ducottet e Belzung, 2005; Harkin et al., 2002; Jayatissa et al., 2006; Krishnan et al., 2007; Moreau et al., 1992; Von Frijtag et al., 2000; Sterlemann et al., 2010). Assim, em modelos animais de depressão por estresse crônico, observamos um aumento da reprodutibilidade do modelo, quando há presença da anedonia, pelo menos na linhagem C57Bl/6 (Strekalova e Steinbusch, 2010).

Desta forma, nosso estudo mostrou diferença estatisticamente significativa no teste de preferência por sacarose, evidenciando uma redução na porcentagem de preferência pela solução adocicada nos animais submetidos ao estresse de submissão social, quando comparados com o grupo controle, de maneira semelhante a estudos anteriores descritos pela literatura. Portanto, o modelo de submissão social, adotado nesse estudo, gerou um efeito pró-depressivo nos nossos camundongos.

5.2 Dosagem de corticosterona

No presente estudo não houve diferença estatisticamente significativa nos níveis de corticosterona do grupo experimental em relação ao controle. Resultado semelhante foi obtido em um outro estudo desenvolvido pelo nosso grupo e que utilizou o mesmo modelo de estresse crônico por submissão social (Pereira e Chiavegatto, Dissertação de Mestrado, 2008). É relatado em diversos estudos que em numerosos protocolos de estresse crônico houve uma diminuição dos receptores de glicocorticóides no hipocampo e lesões nesta região não afetariam as respostas do eixo HPA associadas ao estresse crônico. Numerosos estudos ligam o hipocampo com a inibição do eixo HPA e com a diminuição da secreção de glicocorticóides em ratos e humanos (Ulrich-Lai e Herman, 2009) além disso, durante o estresse crônico, foi demonstrado que após o aumento dos níveis séricos de corticosterona que ocorrem inicialmente nas primeiras semanas, estes níveis retornam aos basais, mesmo com a exposição continuada ao agente estressor (Reber et al., 2006; Silberman et al., 2003). Assim, os dados da concentração de corticosterona similares entre camundongos estressados e não estressados, podem ser devido a processos adaptativos no eixo HPA (hipotálamo-pituitária-adrenal) durante a exposição prolongada ao estresse, para proteger o organismo dos efeitos deletérios dos níveis elevados de glicocorticóides.

5.3 Aspectos moleculares

Uma vez tendo estabelecido o modelo de estresse crônico por submissão social e obtido animais com um comportamento do tipo deprimido, o próximo passo deste estudo foi avaliar a expressão gênica e proteica do fator de transcrição Max no hipocampo destes animais. O hipocampo foi a estrutura encefálica escolhida como alvo primário neste trabalho devido a sua grande vulnerabilidade aos efeitos do estresse, além de ser uma área onde ocorrem processos de neuroplasticidade, como neurogênese e fortalecimentos sinápticos (Eriksson et al., 1998; Malberg et al., 2000; Whitlock et al., 2006).

O hipocampo total dos camundongos que sofreram o estresse crônico apresentou maior quantidade de proteína Max quando comparado ao dos animais controle ($p < 0,05$), determinada pela técnica quantitativa de Western Blot. Este resultado foi confirmado, de maneira independente, nos animais experimentais da outra série experimental. Nestes últimos, através da análise da imunomarcação, foi possível identificar as sub-regiões hipocâmpais onde a proteína apresentava-se mais expressa. Nas três sub-regiões em que determinamos e quantificamos a densidade de imunomarcação para Max: CA1, CA3 e giro denteado, o aumento ocorreu em todas ($p < 0,05$), quando comparadas ao grupo controle, e em proporções aproximadamente iguais entre estas sub-regiões (variando de 27 a 36%).

A densidade de imunomarcação de Max também foi determinada em uma área encefálica não diretamente implicada em processos de neuroplasticidade, que ocorrem em modelos de estresse ou depressão, como os núcleos caudado-putâmen (CP). Os camundongos que sofreram o estresse prolongado não apresentaram alteração na quantidade de imunomarcação de Max nesta região, quando comparados com os controles. Vale ressaltar que o CP também foi utilizado para a quantificação de Max por Western Blot, porém por dificuldades técnicas não conseguimos visualizar as bandas no gel.

Para verificar se o aumento da imunomarcação no hipocampo ocorria concomitantemente ao aumento do número de células neurais marcadas, fizemos a quantificação das mesmas no hilo hipocâmpal, uma sub-região onde as células se apresentam mais esparsas, facilitando a identificação e contagem das mesmas. Não ocorreu alteração na quantidade de células Max-positivas nesta região entre os grupos ($p > 0,05$). Apesar de uma estimativa indireta, este resultado sugere que o

aumento na quantidade de Max nas sub-regiões hipocampais estudadas ocorreu em cada célula imunoreativa, e não houve uma população adicional de células neurais expressando Max no grupo experimental.

A quantidade de transcritos para Max no hipocampo total não apresentou-se diferente entre os grupos ($p > 0,05$). Este resultado, obtido por qPCR, foi replicado e confirmado no hipocampo de camundongos prolongadamente estressados, provenientes de outra série experimental feita em nosso laboratório, e não reportada nesta dissertação. Tomados em conjunto, o aumento da quantidade de proteína Max em cada célula hipocampal imunoreativa, e a ausência de aumento na quantidade de transcritos, sugere um acúmulo proteico não decorrente de aumento na transcrição gênica, mas uma possível redução na sua degradação proteica.

A degradação proteica celular ocorre através da ação de proteases em complexos proteicos, os proteassomas, localizados no núcleo e citoplasma (Peters et al., 1994). O proteassoma também degrada proteínas envolvidas em processos celulares, como na transdução de sinal, regulação do ciclo celular, metabolismo, inflamação e apoptose (Goldberg et al., 1997; Muratani e Tansey, 2003). O sistema ubiquitina-proteasoma é importante para a eliminação de proteínas nocivas para a célula, tais como: proteínas que sofreram mutações, proteínas deformadas, danificadas ou aquelas que se apresentam em excesso (Varshavsky, 1997). Um importante papel para o sistema de degradação proteica tem sido demonstrado ocorrer no SNC, tanto nos processos de neurodegeneração, como no desenvolvimento neuronal, na formação e função de circuitos neurais, e plasticidade (Murphey e Godenschwege, 2002; Tai e Schuman, 2008; Yi e Ehlers, 2007).

O acúmulo proteico de Max hipocampal, verificado em nosso estudo, poderia ser decorrente de uma disfunção no sistema de degradação induzido pelo estresse psicossocial prolongado nestes camundongos. Neste sentido, um estudo recente investigou os efeitos da disfunção proteassomal no neurodesenvolvimento de camundongos (Romero-Granados et al., 2011). A inibição farmacológica do proteassoma, durante os primeiros 10 dias de vida, levou a um prejuízo comportamental na idade adulta em tarefas de memória, coordenação motora, bem como induziu características similares à depressão nestes animais. Estes déficits foram acompanhados de perda neuronal no hipocampo, amígdala e tronco cerebral, bem como diminuição na neurogênese na idade adulta (Romero-Granados et al., 2011). Assim, em nosso estudo, a hipótese de que o estresse prolongado tenha

promovido uma inibição sobre o sistema do proteassoma em áreas cerebrais mais vulneráveis torna-se muito atraente. Pretendemos futuramente estudar a atividade do sistema proteassomal em nosso modelo animal.

Investigamos a distribuição subcelular da imunomarcação de Max com o auxílio da marcação conjunta de regiões ricas em A-T do DNA, proporcionada pelo composto fluorescente DAPI. Em todas as sub-regiões hipocâmpais analisadas, a imunomarcação de Max encontrava-se quase que exclusivamente nos compartimentos celulares também marcados com DAPI, em ambos os grupos experimentais. Apesar de não termos utilizado um marcador para diferenciar entre células neuronais ou gliais, a inspeção morfológica cuidadosa destas células Max-positivas revelam características típicas de neurônios. Estes resultados sugerem que a proteína Max apresenta-se mais abundante nos núcleos, e não no citoplasma, de neurônios hipocâmpais dos camundongos que sofreram estresse crônico e que sua distribuição subcelular não foi alterada.

A translocação de fatores de transcrição através da membrana nuclear é bem descrita pela literatura e está associada com a regulação funcional de várias proteínas (Khokhlatchev et al., 1998; Toyoshima-Morimoto et al., 2001; Yang et al., 1999). Muitas proteínas translocam entre compartimentos frente ao estresse celular ou na indução da morte celular, sendo esta redistribuição crucial para a função da proteína (Ferrando-May, 2005). A localização nuclear de fatores de transcrição é necessária para que ocorram suas ações transcricionais (Muratani e Tansey, 2003). Assim, o acúmulo de Max no núcleo neuronal poderia sugerir um efeito na modulação da transcrição gênica. Estudos *in vitro* demonstraram que Max rapidamente forma homodímeros e que seu estado de fosforilação seria crítico para sua ligação às sequências E-box do DNA. Porém, apesar desta sua capacidade de ligação ao DNA, Max parece ser transcricionalmente inerte ou apresentar atividade repressora fraca (revisado em Hurlin e Huang, 2006). Pode-se também hipotetizar que Max estaria complexado como heterodímero e, portanto, sua maior disponibilidade favoreceria os efeitos transcricionais de seu parceiro ligante, tais como Myc, Mad ou outra proteína relacionada. Para testar esta hipótese precisamos quantificar estes outros fatores de transcrição nestas áreas hipocâmpais em nosso modelo experimental.

Aumento nos níveis de Max através de sua superexpressão em células endoteliais *in vitro* foi capaz de bloquear a apoptose induzida pela privação do soro

do meio de cultura (Shichiri et al., 1999). O uso de vetor viral recombinante para aumentar a expressão de Max *in vivo* em células ganglionares, da retina de ratos recém-nascidos, mostrou efeito protetor após a axotomia (Petr-Silva et al., 2005). Estes mesmos pesquisadores já haviam demonstrado *in vitro* que a ausência da proteína Max, no núcleo de neurônios ganglionares da retina, estava associada à morte destas células por apoptose após a injúria (Petr-Silva et al., 2004; Petr-Silva et al., 2008). Em conjunto, estes resultados sugerem um papel neuroprotetor para o aumento nuclear de Max. Esta possibilidade será futuramente testada em nosso modelo animal de estresse prolongado. Desta forma, investigaremos se existe redução de neurogênese hipocampal e se este evento está associado ao aumento de Max, na tentativa de contrapor aos efeitos deletérios do estresse. Para isto, a identificação do(s) parceiro(s) de dimerização de Max poderá ajudar a entender se realmente este seria um possível papel para este fator de transcrição nos processos de plasticidade que ocorrem neste modelo, ou uma função nova ainda não descrita para Max.

Nossos resultados também fornecem subsídios para investigações adicionais em outras estruturas encefálicas que podem estar envolvidas nos efeitos do estresse prolongado. O córtex pré-frontal é uma região particularmente interessante para isto devido ao seu envolvimento em muitos aspectos do TDM.

É importante ressaltar que os resultados obtidos foram baseados em um momento único após o estresse prolongado durante a adolescência e que não investigamos a dinâmica destas alterações no cérebro destes animais. Se este aumento de Max no hipocampo também ocorre com o estresse psicossocial na idade adulta, ou ainda se é passível de reversão, também são questões que merecem investigações futuras. Também devemos lembrar que estes resultados são obtidos com técnicas e reagentes atualmente disponíveis, com limitações em resolução celular/molecular.

Como Max é um componente central de uma rede de fatores de transcrição que regulam uma variedade de genes envolvidos em importantes processos celulares, e sua necessidade vital no desenvolvimento embrionário ter sido demonstrada através da precoce letalidade de camundongos Max^{-/-} (Shen-Li et al., 2000), nossos resultados parecem intrigantes e estimulam novas pesquisas nesta direção.

6 CONCLUSÃO

O desenvolvimento de modelos animais que retratem de forma eficiente os transtornos neuropsiquiátricos representa um grande desafio. A depressão, como um transtorno sindrômico, apresenta diversas facetas e, portanto, várias alterações comportamentais que podem não estar presentes ao mesmo momento. Uma vez que a anedonia é um sintoma central na depressão e a maioria dos modelos atuais tendem a se ater à presença deste comportamento, o nosso modelo de estresse crônico por submissão social durante a adolescência atingiu seu objetivo, evidenciando um comportamento do tipo deprimido nestes animais.

O fator de transcrição Max, envolvido com a proliferação celular, diferenciação, apoptose e transformação celular e, portanto, muito estudado na área de oncologia, foi aqui investigado pela primeira vez em um modelo de depressão. A observação do aumento desta proteína no núcleo de células hipocâmpais dos camundongos submetidos ao estresse social sugere uma participação deste fator em eventos moleculares associados.

Este trabalho estabeleceu e padronizou um modelo animal e ainda abriu uma nova linha de investigações futuras em nosso laboratório, na tentativa de entender o papel do Max nos eventos neuroplásticos hipocâmpais frente ao estresse.

REFERÊNCIAS*

- Akhtar RS, Ness JM, Roth KA. Bcl-2 family regulation of neuronal development and neurodegeneration. *Biochim Biophys Acta*. 2004;1644(2-3):189-203.
- Amati B, Dalton S, Brooks MW, Littlewood TD, Evan GI, Land H. Transcriptional activation by the human c-Myc oncoprotein in yeast requires interaction with Max. *Nature*. 1992;359(6394):423-6.
- Amati B, Land H. Myc-Max-Mad: a transcription factor network controlling cell cycle progression, differentiation and death. *Curr Opin Genet Dev*. 1994;4(1):102-8.
- Andrus BM, Blizinsky K, Vedell PT, Dennis K, Shukla PK, Schaffer DJ, Radulovic J, Churchill GA, Redei EE. Gene expression patterns in the hippocampus and amygdala of endogenous depression and chronic stress models. *Mol Psychiatry*. 2012;17(1):49-61.
- Andersen SL, Teicher MH. Stress, sensitive periods and maturational events in adolescent depression. *Trends Neurosci*. 2008;31(4):183-91.
- Anisman H, Matheson K. Stress, depression, and anhedonia: caveats concerning animal models. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*. 2005;29:525-46.
- Archer J. Tests for emotionality in rats and mice: a review. *Anim Behav*. 1973;21(2):205-35.
- Bachis A, Cruz MI, Nosheny RL, Mocchetti I. Chronic unpredictable stress promotes neuronal apoptosis in the cerebral cortex. *Neurosci Lett*. 2008;442(2):104-8.
- Baker SL, Kentner AC, Konkle AT, Santa-Maria Barbagallo L, Bielajew C. Behavioral and physiological effects of chronic mild stress in female rats. *Physiol Behav*. 2006;28;87(2):314-22.
- Banasr M, Valentine GW, Li XY, Gourley SL, Taylor JR, Duman RS. Chronic unpredictable stress decreases cell proliferation in the cerebral cortex of the adult rat. *Biol Psychiatry*. 2007;62(5):496-504.
- Barha CK, Brummelte S, Lieblich SE, Galea LA. Chronic restraint stress in adolescence differentially influences hypothalamic-pituitary-adrenal axis function and adult hippocampal neurogenesis in male and female rats. *Hippocampus*. 2011;21(11):1216-27.

* 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>.

Belmaker RH, Agam G. Major depressive disorder. *N Engl J Med*. 2008;358(1):55-68.

Berberich S, Hyde-DeRuyscher N, Espenshade P, Cole M. Max encodes a sequence-specific DNA-binding protein and is not regulated by serum growth factors. *Oncogene*. 1992;7(4):775-9.

Berton O, Nestler EJ. New approaches to antidepressant drug discovery: beyond monoamines. *Nat Rev Neurosci*. 2006;7(2):137-51.

Bibancos T, Jardim DL, Aneas I, Chiavegatto S. Social isolation and expression of serotonergic neurotransmission-related genes in several brain areas of male mice. *Genes Brain Behav*. 2007;6(6):529-39.

Blackwood EM, Eisenman RN. Regulation of Myc: Max complex formation and its potential role in cell proliferation. *Tohoku J Exp Med*. 1991;168(2):195-202.

Blackwood EM, Kretzner L, Eisenman RN. Myc and Max function as a nucleoprotein complex. *Curr Opin Genet Dev*. 1992;2(2):227-35. Review.

Basic Local Alignment Search Tool (BLAST). Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>. [2011 Jul 3].

Blumberg MS, Michael J, Watt, Andrew R, Burke¹, Kenneth J, Renner and Gina L. Forster. Adolescent male rats exposed to social defeat exhibit altered anxiety behavior and limbic monoamines as adults *Behav Neurosci*. 2009;123(3):564–76.

Bouchard C, Staller P, Eilers M. Control of cell proliferation by Myc. *Trends Cell Biol*. 1998;8(5):202-6.

Bremner JD, Narayan M, Anderson ER, Staib LH, Miller HL, Charney DS. Hippocampal volume reduction in major depression. *Am J Psychiatry*. 2000;157(1):115-8.

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 on hippocampal functioning. *Neurosci Biobehav Rev*. 2005;29(1):83-97.

Buwalda B, van der Borght K, Koolhaas JM, McEwen BS. Testosterone decrease does not play a major role in the suppression of hippocampal cell proliferation following social defeat stress in rats. *Physiol Behav*. 2010;101(5):719-25.

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.

Centers for Disease Control and Prevention. National Center for Injury Prevention and Control. Web-based injury statistics query and reporting system (WISQARS). 2009. Available from: <http://webappa.cdc.gov/sasweb/ncipc/leadcaus10.html>. [2011 Jul 25].

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

Cook SC, Wellman CL. Chronic stress alters dendritic morphology in rat medial prefrontal cortex. *J Neurobiol*. 2004;60(2):236-48.

Costello EJ, Erkanli, A, Angold, A. Is there an epidemic of child or adolescent depression? *J Child Psychol Psychiatry*. 2006;47(3):1263-71.

Cotter D, Mackay D, Landau S, Kerwin R, Everall I. Reduced glial cell density and neuronal size in the anterior cingulate cortex in major depressive disorder. *Arch Gen Psychiatry*. 2001;58(6):545-53.

Cryan, JF, Holmes, A. The ascent of mouse: advances in modelling human depression and anxiety. *Nature Reviews: Drug Discovery*. 2005;4(9):775–90.

Czéh B, Michaelis T, Watanabe T, Frahm J, de Biurrun G, van Kampen M, et al. Stress-induced changes in cerebral metabolites, hippocampal volume, and cell proliferation are prevented by antidepressant treatment with tianeptine. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2001;98(22):12796-801.

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

Czéh B, Müller-Keuker JI, Rygula R, Abumaria N, Hiemke C, Domenici E, et al. Chronic social stress inhibits cell proliferation in the adult medial prefrontal cortex: hemispheric asymmetry and reversal by fluoxetine treatment. *Neuropsychopharmacology*. 2007;32(7):1490-503.

De Kloet ER, Joëls M, Holsboer F. Stress and the brain: from adaptation to disease. *Nat Rev Neurosci*. 2005;6(6):463-75. Review.

Delgado PL. Depression: the case for a monoamine deficiency. *J Clin Psychiatry*. 2000;61(6):7-11. Review.

Detke MJ, Lucki I. Detection of serotonergic and noradrenergic antidepressants in the rat forced swimming test: the effects of water depth. *Behav Brain Res*. 1996;73(1-2):43-6.

Dinan TG. Stress: the shared common component in major mental illnesses. *Eur Psychiatry*. 2005;20(3):326-8. Review.

Drevets WC, Ongür D, Price JL. Neuroimaging abnormalities in the subgenual prefrontal cortex: implications for the pathophysiology of familial mood disorders. *Mol Psychiatry*. 1998;3(3):220-6,190-1.

Ducottet C, Belzung C. Correlations between behaviours in the elevated plus-maze and sensitivity to unpredictable subchronic mild stress: evidence from inbred strains of mice. *Behav Brain Res*. 2005;156(1):153-62.

Eriksson P, Perfilova E, Bjork-Eriksson T, Alborn A, Nordborg C, Peterson D, Gage F. Neurogenesis in the adult human hippocampus. *Nature Med*. 1998;4:1313-17.

Facchini LM, Penn LZ. The molecular role of Myc in growth and transformation: recent discoveries lead to new insights. *FASEB J*. 1998;12(9):633-51.

Faiola F, Wu YT, Pan S, Zhang K, Farina A, Martinez E. Max is acetylated by p300 at several nuclear localization residues. *Biochem J*. 2007;403(3):397-407.

Fava M, Kendler KS. Major depressive disorder. *Neuron*. 2000;28(2):335-41.

Ferrando-May, E. Nucleocytoplasmic transport in apoptosis. *Cell Death Diff*. 2005;12(10):1263-76.

Ferre-D'Amare AR, Pognonec P, Roeder RG, Burley SK. Structure and function of the b/HLH/Z domain of USF. *EMBO J*. 1994; 1;13(1):180-9.

Frodl T, Meisenzahl EM, Zetsche T, Born C, Groll C, Jäger M, Leinsinger G, Bottlender R, Hahn K, Möller HJ. Hippocampal changes in patients with a first episode of major depression. *Am J Psychiatry*. 2002a;159(7):1112-8.

Frodl T, Meisenzahl E, Zetsche T, Bottlender R, Born C, Groll C, et al. Enlargement of the amygdala in patients with a first episode of major depression. *Biol Psychiatry*. 2002b;51(9):708-14.

Frodl T, Reinhold E, Koutsouleris N, Reiser M, Meisenzahl EM. Interaction of childhood stress with hippocampus and prefrontal cortex volume reduction in major depression. *J Psychiatr Res*. 2010;44(13):799-807.

Fuchs E, Flugge G, Czeh B. Remodeling of neuronal networks by stress. *Front Biosci*. 2006;1(11):2746-58.

Gallant P, Steiger D. Myc's secret life without Max. *Cell Cycle*. 2009;8(23):3848-53.

Girotti M, Pace TW, Gaylord RI, Rubin BA, Herman JP, Spencer RL. Habituation to repeated restraint stress is associated with lack of stress-induced c-fos expression in primary sensory processing areas of the rat brain. *Neuroscience*. 2006;138(4):1067-81.

Gladstone GL, Parker GB, Malhi GS. Do bullied children become anxious and depressed adults? A cross-sectional investigation of the correlates of bullying and anxious depression. *J Nerv Ment Dis*. 2006; 194(3):201-8.

Goldberg AL, Akopian TN, Kisselev AF, Lee DH, Rohrwild M. New insights into the mechanisms and importance of the proteasome in intracellular protein degradation. *Bio Chem.* 1997;378(3-4):131-40.

Grandori C, Cowley SM, James LP, Eisenman RN. The Myc/Max/Mad network and the transcriptional control of cell behavior. *Annu Rev Cell Dev Biol.* 2000;16:653-99.

Harkin A, Houlihan DD, Kelly JP. Reduction in preference for saccharin by repeated unpredictable stress in mice and its prevention by imipramine. *J Psychopharmacol.* 2002;16(2):115-23.

Heine VM, Maslam S, Joëls M, Lucassen PJ. Increased P27KIP1 protein expression in the dentate gyrus of chronically stressed rats indicates G1 arrest involvement. *Neuroscience.* 2004b;129(3):593-601.

Heine VM, Maslam S, Zareno J, Joëls M, Lucassen PJ. Suppressed proliferation and apoptotic changes in the rat dentate gyrus after acute and chronic stress are reversible. *Eur J Neurosci.* 2004a;19(1):131-44.

Henriksson M, Lüscher B. Proteins of the Myc network: essential regulators of cell growth and differentiation. *Adv Cancer Res.* 1996;68:109-82.

Hoffman KB, Cole DA, Martin JM, Tram J, Seroczynski AD. Are the discrepancies between self- and others' appraisals of competence predictive or reflective of depressive symptoms in children and adolescents: a longitudinal study, Part II. *J Abnorm Psychol.* 2000;109(4):651-62.

Hoffmann J, Cerbone F, Su S. A Growth Curve Analysis of Stress and Adolescent Drug Use. *Subst Use Misuse.* 2000;35(5):687-716.

Hurlin PJ, Huang J. The MAX-interacting transcription factor network. *Semin Cancer Biol.* 2006;16(4):265-74. Review.

Isgor C, Kabbaj M, Akil H, Watson SJ. Delayed effects of chronic variable stress during peripubertal-juvenile period on hippocampal morphology and on cognitive and stress axis functions in rats. *Hippocampus.* 2004;14(5):636-48.

Isovich E, Engelmann M, Landgraf R, Fuchs E. Social isolation after a single defeat reduces striatal dopamine transporter binding in rats. *Eur J Neurosci.* 2001;13(6):1254-6.

Jacobson MD, Weil M, Raff MC. Programmed cell death in animal development. *Cell.* 1997;88(3):347-54.

Jayatissa MN, Bisgaard C, Tingström A, Papp M, Wiborg O. Hippocampal cytogenesis correlates to escitalopram-mediated recovery in a chronic mild stress rat model of depression. *Neuropsychopharmacology.* 2006;31(11):2395-404.

Jiao J, Huang X, Feit-Leithman RA, Neve RL, Snider W, Datt DA, et al. Bcl-2 enhances Ca(2+) signaling to support the intrinsic regenerative capacity of CNS axons. *EMBO J*. 2005;24(5):1068-78.

Jones S. An overview of the basic helix-loop-helix proteins. *Genome Biol*. 2004;5(6):226.

Kato GJ, Lee WM, Chen LL, Dang CV. Max, functional domains and interaction with c-Myc. *Genes Dev*. 1992; 6(1):81-92.

Kessler RC, Ormel J, Demler O, Stang PE. Comorbid mental disorders account for the role impairment of commonly occurring chronic physical disorders: results from the National Comorbidity Survey. *J Occup Environ Med*. 2003;45(12):1257-66.

Kessler RC, Chiu WT, Demler O, Merikangas KR, Walters EE. Prevalence, severity, and comorbidity of 12-month DSM-IV disorders in the National Comorbidity Survey Replication. *Arch Gen Psychiatry*. 2005; 62(6):617-27

Kinn AM, Gronli J, Fiske E, Kuipers S, Ursin R, Murison R, Portas CM. A double exposure to social defeat induces sub-chronic effects on sleep and open field behaviour in rats. *Physiol Behav*. 2008;28;95(4):553-61

Kinsey SG, Bailey MT, Sheridan JF, Padgett DA, Avitsur R. Repeated social defeat causes increased anxiety-like behavior and alters splenocyte function in C57BL/6 and CD-1 mice. *Brain Behav Immun*. 2007;21(4): 458-66.

Klein DF. Endogenomorphic depression. A conceptual and terminological revision. *Arch Gen Psychiatry*. 1974; 31(4):447-54.

Khokhlatchev AV, Canagarajah B, Wilsbacher J, Robinson M, Atkinson M, Goldsmith E, Cobb MH. Phosphorylation of the MAP kinase ERK2 promotes its homodimerization and nuclear translocation. *Cell*. 1998;15;93(4):605-15.

Kretzner L, Blackwood EM, Eisenman RN. Myc and Max proteins possess distinct transcriptional activities. *Nature*. 1992 359(6394):426-9.

Koolhaas JM, De Boer SF, De Rutter AJ, Meerlo P, Sgoifo A. Social stress in rats and mice. *Acta Physiol Scand Suppl*. 1997;640:69-72.

Kosten TA, Galloway MP, Duman RS, Russell DS, D'Sa C. Repeated unpredictable stress and antidepressants differentially regulate expression of the bcl-2 family of apoptotic genes in rat cortical, hippocampal, and limbic brain structures. *Neuropsychopharmacology*. 2008;33(7):1545-58.

Krishnan V, Han MH, Graham DL, Berton O, Renthal W, Russo SJ, et al. Molecular adaptations underlying susceptibility and resistance to social defeat in brain reward regions. *Cell*. 2007;131(2):391-404.

Krishnan V, Nestler EJ. The molecular neurobiology of depression. *Nature*. 2008;455(7215):894-902.

Krishnan V, Berton O, Nestler E. The use of animal models in psychiatric research and treatment. *Am J Psychiatry*. 2008;165(9):1109.

Kubera M, Obuchowicz E, Goehler L, Brzeszcz J, Maes M. In animal models, psychosocial stress-induced (neuro)inflammation, apoptosis and reduced neurogenesis are associated to the onset of depression. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*. 2011;35(3):744-59.

Leeb K, Parker L, Eikelboom R. Effects of pimozide on the hedonic properties of sucrose: analysis by the taste reactivity test. *Pharmacol Biochem Behav*. 1991;39(4):895-901.

Leussis MP, Freund N, Brenhouse HC, Thompson BS, Andersen SL. Depressive-Like Behavior in Adolescents after Maternal Separation: Sex Differences, Controllability, and GABA. *Dev Neurosci*. 2012. In press.

Leussis MP, Andersen SL. Is adolescence a sensitive period for depression? Behavioral and neuroanatomical findings from a social stress model. *Synapse*. 2008;62(1):22-30.

Lewinsohn PM, Clarke GN, Seeley JR, Rohde P. Major depression in community adolescents: age at onset, episode duration, and time to recurrence. *J Am Acad Child Adolesc Psychiatry*. 1994;33(6):809-18.

Licinio J, Wong ML. Back to where it all started: monoamines and behavior-from drug responses to genes. *Mol Psychiatry*. 2004;9(5):427.

Lister RG. The use of a plus maze to measure anxiety in the mouse. *Psychopharmacology*. 1987;92(2):180-5.

Lucassen PJ, Vollmann-Honsdorf GK, Gleisberg M, Czéh B, De Kloet ER, Fuchs E. Chronic psychosocial stress differentially affects apoptosis in hippocampal subregions and cortex of the adult tree shrew. *Eur J Neurosci*. 2001;14(1):161-6.

Lucassen PJ, Heine VM, Muller MB, van der Beek EM, Wiegant VM, De Kloet ER. Stress, depression and hippocampal apoptosis. *CNS Neurol Disord Drug Targets*. 2006;5(5):531-46.

Lucassen PJ, Meerlo P, Naylor AS, van Dam AM, Dayer AG, Fuchs E, Oomen CA, Czéh B. Regulation of adult neurogenesis by stress, sleep disruption, exercise and inflammation: Implications for depression and antidepressant action. *Eur Neuropsychopharmacol*. 2010;20(1):1-17.

Lucki I, Dalvi A, Mayorga AJ. Sensitivity to the effects of pharmacologically selective antidepressants in different strains of mice. *Psychopharmacology (Berl)*. 2001;155(3):315-22.

Lüscher B. Function and regulation of the transcription factors of the Myc/Max/Mad network. *Gene*. 2001;277(1-2):1-14. Review.

MacQueen GM, Campbell S, McEwen BS, Macdonald K, Amano S, Joffe RT, et al. Course of illness, hippocampal function, and hippocampal volume in major depression. *Proc Natl Acad Sci*. 2003;100(3):1387-92.

Magariños AM, McEwen BS, Flügge G, Fuchs E. Chronic psychosocial stress causes apical dendritic atrophy of hippocampal CA3 pyramidal neurons in subordinate tree shrews. *J Neurosci*. 1996;16(10):3534-40.

Malberg JE, Eisch AJ, Nestler EJ, Duman RS. Chronic antidepressant treatment increases neurogenesis in adult rat hippocampus. *J Neurosci*. 2000;20(24):9104-10.

Manji HK, Duman RS. Impairments of neuroplasticity and cellular resilience in severe mood disorders: implications for the development of novel therapeutics. *Psychopharmacol Bull*. 2001;35(2):5-49.

Mc Arthur R and Borsini F. Animal models of depression in drug discovery: a historical perspective. *Pharm Biochem Behav*. 2006;84(3):436-52

McDuff FO, Naud JF, Montagne M, Sauvé S, Lavigne P. The Max homodimeric b-HLH-LZ significantly interferes with the specific heterodimerization between the c-Myc and Max b-HLH-LZ in absence of DNA: a quantitative analysis. *J Mol Recognit*. 2009;22(4):261-9.

McKernan DP, Dinan TG, Cryan JF. "Killing the Blues": a role for cellular suicide (apoptosis) in depression and the antidepressant response? *Prog Neurobiol*. 2009;88(4):246-63. Review.

McEwen BS, Magarinos AM. Stress effects on morphology and function of the hippocampus. *Ann N Y Acad Sci*. 1997;821:271-84.

McEwen BS. Protective and damaging effects of stress mediators: central role of the brain. *Dialogues Clin Neurosci*. 2006a;8(4):367-81.

McEwen BS. Sleep deprivation as a neurobiologic and physiologic stressor: Allostasis and allostatic load. *Metabolism*. 2006;55(10):20-3.

McMahon SB, Wood MA, Cole MD. The essential cofactor TRRAP recruits the histone acetyltransferase hGCN5 to c-Myc. *Mol Cell Biol*. 2000;20(2):556-62.

Meaney MJ. Maternal care, gene expression, and the transmission of individual differences in stress reactivity across generations. *Annu Rev Neurosci*. 2001;24:1161-92.

Meerlo P, Overkamp GJ, Benning MA, Koolhaas JM, Van den Hoofdakker RH. Long-term changes in open field behaviour following a single social defeat in rats can be reversed by sleep deprivation. *Physiol Behav*. 1996;60(1):115-9.

Miczek KA, O'Donnell JM. Intruder-evoked aggression in isolated and nonisolated mice: effects of psychomotor stimulants and L-dopa. *Psychopharmacology (Berl)*. 1978;57(1):47-55.

Miczek KA, Yap JJ, Covington HE. Social stress, therapeutics and drug abuse: preclinical models of escalated and depressed intake. *Pharmacol Ther.* 2008;120(2):102-28.

Mirescu C, Gould E. Stress and adult neurogenesis. *Hippocampus.* 2006;16(3):233-8.

Moreau JL, Jenck F, Martin JR, Mortas P, Haefely WE. Antidepressant treatment prevents chronic unpredictable mild stress-induced anhedonia as assessed by ventral tegmentum self-stimulation behavior in rats. *Eur Neuropsychopharmacol.* 1992; 2(1):43-9.

Muñoz-Pinedo C. Signaling pathways that regulate life and cell death: evolution of apoptosis in the context of self-defense. *Adv Exp Med Biol.* 2012;738:124-43.

Muratani M, Tansey WP. How the ubiquitin–proteasome system controls transcription. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2003;4(3):192-201.

Murphey RK, Godenschwege TA. New roles for ubiquitin in the assembly and function of neuronal circuits. *Neuron.* 2002;36(1):5-8.

Murre C, McCaw PS, Baltimore D. A new DNA binding and dimerization motif in immunoglobulin enhancer binding, daughterless, MyoD, and myc proteins. *Cell.* 1989;56(5):777-83.

Murre C, McCaw PS, Vaessin H, Caudy M, Jan LY, Jan YN, et al. Interactions between heterologous helix-loop-helix proteins generate complexes that bind specifically to a common DNA sequence. *Cell.* 1989;58(3):537-44.

Nestler EJ, Hyman SE. Animal models of neuropsychiatric disorders. *Nat Neurosci.* 2010;13(10):1161-9.

Nestler EJ, Barrot M, DiLeone RJ, Eisch AJ, Gold SJ, Monteggia LM. Neurobiology of depression. *Neuron.* 2002;28;34(1):13-25.

Novick AM, Forster GL, Tejani-Butt SM, Watt MJ. Adolescent social defeat alters markers of adult dopaminergic function. *Brain Res Bull.* 2011;86(1-2):123-8

Ofuchi A. Administração prolongada do ácido 13-*cis*-retinóico (isotretinoína) em camundongos machos adolescentes: comportamentos emocionais e quantificação de transcritos de componentes do sistema serotoninérgico central. [dissertação (Mestrado em Farmacologia)]. São Paulo: Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo; 2010.

Oomen CA, Mayer JL, de Kloet ER, Joëls M, Lucassen PJ. Brief treatment with the glucocorticoid receptor antagonist mifepristone normalizes the reduction in neurogenesis after chronic stress. *Eur J Neurosci.* 2007;26(12):3395-401.

Oster SK, Ho CS, Soucie EL, Penn LZ, MarvelousLY. The myc oncogene, complex. *Adv Cancer Res.* 2002;84:81-154.

Overstreet DH, Friedman E, Mathe AA, Yadid G. The Flinders Sensitive Line rat: a selectively bred putative animal model of depression. *Neurosci Biobehav.* 2005;29(4-5):739-59. Review.

Pariante, CM. Depression, stress and the adrenal axis. *Journal of Neuroendocrinology.* 2003;15(8):811-2.

Parone PA, James D, Martinou JC. Mitochondria: regulating the inevitable. *Biochimie.* 2002;84(2-3):105-11. Review.

Pasco JA, Jacka FN, Williams LJ. Clinical implications of the cytokine hypothesis of depression: the association between use of statins and aspirin and the risk of major depression. *Psychother Psychosom.* 2010;79:323-5.

Pereira, J. Estudo 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.

Peters JM, Frank WW, Kleinschmidt JA. Distinct 19 S and 20 S subcomplexes of the 26 S proteasome and their distribution in the nucleus and the cytoplasm. *The Journal of Biological Chemistry.* 1994;269(10):7709-18.

Petr-Silva H, de Freitas FG, Linden R, Chiarini LB. Early nuclear exclusion of the transcription factor max is associated with retinal ganglion cell death independent of caspase activity. *J Cell Physiol.* 2004;198(2):179-87.

Petr-Silva H, Chiodo V, Chiarini LB, Hauswirth WW, Linden R. Modulation of the expression of the transcription factor Max in rat retinal ganglion cells by a recombinant adeno-associated viral vector. *Braz J Med Biol Res.* 2005;38(3):375-9.

Petr-Silva H, Chiarini LB, Linden R. Nuclear proteasomal degradation and cytoplasmic retention underlie early nuclear exclusion of transcription factor Max upon axon damage. *Exp Neurol.* 2008;213(1):202-9.

Pittenger C, Duman RS. Stress, depression, and neuroplasticity: a convergence of mechanisms. *Neuropsychopharmacology.* 2008;33(1):88-109.

Pistovcakova J, Makatsori A, Sulcova A, Jezova D. Felbamate reduces hormone release and locomotor hypoactivity induced by repeated stress of social defeat in mice. *Eur Neuropsychopharmacol.* 2005;15(2):153-8.

Porsolt RD, Anton G, Blavet N, Jalfre M. Behavioural despair in rats: A new model sensitive to antidepressant treatments. *Eur J Pharmacol.* 1978;47(4):379-91.

Porsolt RD, Bertin A, Jalfre M. Behavioral despair in mice: A primary screening test for antidepressants. *Arch Int Pharmacodyn Ther.* 1977a;229(2):327-36.

Porsolt RD, Le Pichon M, Jalfre M. Depression: A new animal model sensitive to antidepressant treatments. *Nature*.1977b;266(5604):730-2.

Pothion S, Bizot JC, Trovero F, Belzung C. Strain differences in sucrose preference and in the consequences of unpredictable chronic mild stress. *Behav Brain Res*. 2004;155(1):135.

Price JL, Drevets WC. Neurocircuitry of mood disorders. *Neuropsychopharmacology*. 2010;35(1):192-216.

Radley JJ, Sisti HM, Hao J, Rocher AB, McCall T, Hof PR, et al. Chronic behavioral stress induces apical dendritic reorganization in pyramidal neurons of the medial prefrontal cortex. *Neuroscience*. 2004;125(1):1-6.

Rajkowska G, Miguel-Hidalgo JJ, Wei J, Dilley G, Pittman SD, Meltzer HY, et al. Morphometric evidence for neuronal and glial prefrontal cell pathology in major depression. *Biol Psychiatry*.1999;45(9):1085-98.

Reber SO, Obermeier F, Straub RH, Falk W, Neumann ID. Chronic intermittent psychosocial stress (social defeat/overcrowding) in mice increases the severity of an acute DSS-induced colitis and impairs regeneration. *Endocrinology*. 2006; 147(10):4968-76.

Risch N, Herrell R, Lehner T, Liang KY, Eaves L, Hoh J, Griem A, Kovacs M, Ott J, Merikangas KR. Interaction between the serotonin transporter gene (5-HTTLPR), stressful life events, and risk of depression: a meta-analysis. *JAMA*.2009; 5;302(5):492.

Romeo RD, Lee SJ, McEwen BS. Differential stress reactivity in intact and ovariectomized prepubertal and adult female rats. *Neuroendocrinology*. 2004;80(6):387-93.

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

Romero-Granados R, Fontán-Lozano Á, Aguilar-Montilla FJ, Carrión ÁM. Postnatal proteasome inhibition induces neurodegeneration and cognitive deficiencies in adult mice: a new model of neurodevelopment syndrome. *PLoS One*. 2011;6(12):e28927.

Rygula R, Abumaria N, Flügge G, Fuchs E, Rüther E, Havemann-Reinecke U. Anhedonia and motivational deficits in rats: impact of chronic social stress. *Behav Brain Res*.2005;162(1):127-34.

Ruhé HG, Mason NS, Schene AH. Mood is indirectly related to serotonin, norepinephrine and dopamine levels in humans: a meta-analysis of monoamine depletion studies. *Mol Psychiatry*. 2007;12(4):331-59.

Ruis MA, Brake JH, Buwalda B, De Boer SF, Meerlo P, Korte SM, Blokhuis HJ, Koolhaas JM. Housing familiar male wild type rats together reduces the long-term adverse behavioural and physiological effects of social defeat. *Psychoneuroendocrinology*. 1999;24(3):285-300.

Rumsfeld JS, Ho PM. Depression and cardiovascular disease: a call for recognition. *Circulation*. 2005;111(3):250-3.

Salvesen GS. Caspases: opening the boxes and interpreting the arrows. *Cell Death Differ*. 2002;9(1):3-5.

Sapolsky RM, Uno H, Rebert CS, Finch CE. Hippocampal damage associated with prolonged glucocorticoid exposure in primates. *J Neurosci*. 1990;10(9):2897-902.

Shen-Li H, O'Hagan RC, Hou H, Horner JW, Lee HW, DePinho RA. Essential role for Max in early embryonic growth and development. *Genes Dev*. 2000;14(1):17-22.

Shichiri M, Kato H, Doi M, Marumo F, Hirata Y. Induction of max by adrenomedullin and calcitonin gene-related peptide antagonizes endothelial apoptosis. *Mol Endocrinol*. 1999;13(8):1353-63.

Shishkina GT, Kalinina TS, Berezova IV, Bulygina VV, Dygalo NN. Resistance to the development of stress-induced behavioral despair in the forced swim test associated with elevated hippocampal Bcl-xl expression. *Behav Brain Res*. 2010;213(2):218-24.

Silberman DM, Wald MR, Genaro AM. Acute and chronic stress exert opposing effects on antibody responses associated with changes in stress hormone regulation of T-lymphocyte reactivity. *J Neuroimmunol*. 2003;144(1-2):53-60.

Sousa N, Cerqueira JJ, Almeida OF. Corticosteroid receptors and neuroplasticity. *Brain Res Rev*. 2008;57(2):561-70.

Spear LP. The adolescent brain and age-related behavioral manifestations. *Neurosci Biobehav*. 2000;24(4):417-63.

Starkman MN, Schteingart DE, Schork MA. Discordant changes in plasma ACTH and beta-lipotropin/beta-endorphin levels in Cushing's disease patients with depression. *Psychoneuroendocrinology*. 1992;17(6):619-26.

Sterlemann V, Rammes G, Wolf M, Liebl C, Ganea K, Müller MB, Schmidt MV. Chronic social stress during adolescence induces cognitive impairment in aged mice. *Hippocampus*. 2010;20(4): 540-9.

Strekalova T. Optimization of the chronic stress depression model in C57 BL/6 mice: evidences for improved validity. In: Kalueff A, LaPorte J, editors. *Behavioral models in stress research*. New York: Nova Science Publishers Inc.; 2008 vol. 1.

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(11):2007-17.

Strekalova T, Spanagel R, Dolgov O, Bartsch D. Stress-induced hyperlocomotion as a confounding factor in anxiety and depression models in mice. *Behav Pharmacol.* 2005;16(3):171-80.

Strekalova T, Steinbusch HW. Measuring behavior in mice with chronic stress depression paradigm. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry.* 2010; 17;34(2):348-61.

Swaab DF, Bao AM, Lucassen PJ. The stress system in the human brain in depression and neurodegeneration. *Ageing Res Rev.* 2005;4(2):141-94.

Tae WS, Kim SS, Lee KU, Nam EC, Choi JW, Park JI. Hippocampal shape deformation in female patients with unremitting major depressive disorder. *Am J Neuroradiol.* 2011;32(4):671-6.

Tai HC, Schuman EM. Ubiquitin, the proteasome and protein degradation in neuronal function and dysfunction. *Nat Rev Neurosci.* 2008;9(11):826-38

Teicher MH, Anderson CM, Polcari A. Childhood maltreatment is associated with reduced volume in the hippocampal subfields CA3, dentate gyrus, and subiculum. *Proc Natl Acad Sci.* 2012;109(9):563-72.

Thapar A, Collishaw S, Potter R, Thapar AK. Managing and preventing depression in adolescents. *BMJ.* 2010;340:c209.

Tornatzky W, Miczek KA. Long-term impairment of autonomic circadian rhythms after brief intermittent social stress. *Physiol Behav.* 1993;53(5):983-93.

Toyoshima-Morimoto F, Taniguchi E, Shinya N, Iwamatsu A, Nishida E. Polo-like kinase 1 phosphorylates cyclin B1 and targets it to nucleus during prophase. *Nature.* 2001; 410(6825):215-20.

Ulrich-Lai YM, Herman JP. Neural regulation of endocrine and autonomic stress responses. *Nat Rev Neurosci.* 2009; 10(6):397-409.

Uranova NA, Vostrikov VM, Orlovskaya DD, Rachmanova VI. Oligodendroglial density in the prefrontal cortex in schizophrenia and mood disorders: a study from the Stanley Neuropathology Consortium. *Schizophr Res.* 2004;67(2-3):269-75.

Vandesompele J, Katleen DP, Filip P, Poppe B, Van Roy N, De Paepe A, Speleman F. Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes. *Genome Biol.* 2002;3(7): RESEARCH0034.1.

Viau V, Bingham B, Davis J, Lee P, Wong M. Gender and puberty interact on the stress-induced activation of parvocellular neurosecretory neurons and corticotropin-releasing hormone messenger ribonucleic acid expression in the rat. *Endocrinology.* 2005;146(1):137-46.

Von Frijtag JC, Reijmers LG, Van der Harst JE, Leus IE, Van den Bos R, Spruijt BM. Defeat followed by individual housing results in long-term impaired reward and cognition-related behaviours in rats. *Behav Brain Res*. 2000;117(1-2):137-46.

Vyas A, Jadhav S, Chattarji S. Prolonged behavioral stress enhances synaptic connectivity in the basolateral amygdala. *Neuroscience*. 2006;143(2):387-93.

Wahlstrom D, White T, Luciana M. Neurobehavioral evidence for changes in dopamine system activity during adolescence. *Neurosci Biobehav*. 2010;34(5):631-48.

Varshavsky A. The ubiquitin system. *Trends Biochem Sci*. 1997;(10):383-7.

Wallace DL, Han MH, Graham DL, Green TA, Vialou V, Iñiguez SD, et al. CREB regulation of nucleus accumbens excitability mediates social isolation-induced behavioral deficits. *Nat Neurosci*. 2009;12(2):200-9.

Wang Y, Xiao Z, Liu X, Berk M. Venlafaxine modulates depression-induced behaviour and the expression of Bax mRNA and Bcl-xl mRNA in both hippocampus and myocardium. *Hum Psychopharmacol*. 2011;26(2):95-101.

Watanabe Y, Gould E, McEwen BS. Stress induces atrophy of apical dendrites of hippocampal CA3 pyramidal neurons. *Brain Res*. 1992;588(2):341-5.

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

Weishaupt JH, Bähr M. Degeneration of axotomized retinal ganglion cells as a model for neuronal apoptosis in the central nervous system - molecular death and survival pathways. *Restor Neurol Neurosci*. 2001;19(1-2):19-27.

Whitlock JR, Heynen AJ, Shuler MG, Bear MF. Learning induces long-term potentiation in the hippocampus. *Science*. 2006;313(5790):1093-7.

Willner P, Mitchell PJ. The validity of animal models of predisposition to depression. *Behav Pharmacol*. 2002;13(3):169-88. Review.

Wong EY, Herbert J. The corticoid environment: a determining factor for neural progenitors' survival in the adult hippocampus. *Eur J Neurosci*. 2004;20(10):2491-8.

World Health Organization (WHO, GBD, 2004). Available from: www.who.int/healthinfo/global.../GBD_report_2004update_full.pdf. [2011 jul 25].

Yan HC, Cao X, Das M, Zhu XH, Gao TM. Behavioral animal models of depression. *Neurosci Bull*. 2010;26(4):327-37. Review.

Yi JJ, Ehlers MD. Emerging roles for ubiquitin and protein degradation in neuronal function. *Pharmacol Rev*. 2007;59(1):14-39.