UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

FFCLRP - DEPARTAMENTO DE PSICOLOGIA

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM PSICOBIOLOGIA

“Ansiedade induzida pelo estresse crônico variado e ativação diferencial das áreas límbicas relacionadas em camundongos”.

Fernanda Daher Pitta

Tese apresentada à Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto da USP, como parte das exigências para a obtenção do título de Doutora em Ciências, Área: Psicobiologia.

RIBEIRÃO PRETO - SP

2017

FERNANDA DAHER PITTA

**Ansiedade induzida pelo estresse crônico variado e ativação diferencial das áreas límbicas
relacionadas em camundongos**

Versão Corrigida

Tese apresentada à Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de
Ribeirão Preto da USP, como parte das exigências para a obtenção
do título de Doutora em Ciências.

Área de Concentração: Psicobiologia.

Orientadora: Profa. Dra. Rosana Mattioli

Co-orientadora: Profa. Dra. Cláudia Maria Padovan

RIBEIRÃO PRETO - SP

2017

Autorizo a reprodução e divulgação total ou parcial deste trabalho, por qualquer meio convencional ou eletrônico, para fins de estudo e pesquisa, desde que citada a fonte.

Daher Pitta, Fernanda

Ansiedade induzida pelo estresse crônico variado e ativação diferencial das áreas límbicas relacionadas em camundongos. Ribeirão Preto, 2017.

159 p. : il. ; 30 cm

Tese de Doutorado, apresentada à Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto/USP. Área de concentração: Psicobiologia.

Orientadora: Mattioli, Rosana.

1. Ansiedade. 2. Estresse crônico variado. 3. Resiliência. 4. Córtex pré-frontal medial. 5. Amígdala. 6. Fos. 7. L-histidina.

Nome: DAHER PITTA, Fernanda

Título: Ansiedade induzida pelo estresse crônico variado e ativação diferencial das áreas límbicas relacionadas em camundongos

Tese apresentada à Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de
Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo para obtenção do
título de Doutora em Ciências. Área: Psicobiologia.

Aprovado em:

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Elena Daher Pitta . Cláudia Daher Pitta . Cláudio Pitta . Prof^ª. Rosana Mattioli . Lucas Canto de Souza . Teresa Piassi . Genoveva Luna . Anna Carolyna Gianlorenço . Kelly Serafim . Carlos Fernandes . Bruna Marques . Prof. Thiago Russo . Prof^ª. Azair Canto de Souza . Lara Silveira . Daniela Baptista . Paulo Carneiro . Rimenez Souza . Prof^ª. Amanda de Oliveira . Ligia Tavares . Aura Fonseca . Carol Zaniboni . Isabela Carmona . Prof^ª. Cláudia M. Padovan . Thalita Gonçalves . Adriana Pereira . Thiago Martins . Prof. Ricardo Nunes de Souza . Tatiani Sorregotti . Paula Bianchi . Paola Palombo . Ana Cláudia Cipriano . Diego Mascarenhas . Gessynger Morais . Rosana Pupim . Bete Lepera . Nathália Costa . Prof. Fábio Cardoso Cruz . Rafaella Queiroz . Lígia Casula . Lucas Barretto . Lucas Gomes . Willian Ferreira . Matheus Pegoraro . Tirene Pavanelli . Leandro Oliveira . Joyce Gomes Tessari . Prof. Silvio Morato . Renata Vicentini Del Moro . Everton Horiquni Barbosa . Natalia Almeida . Rafael Bonuti . Manoela Fogaça . Vinícius Warisaia . Joyce Gomes . Aline Nakamura . Helena Vieira . Lucas Ferro . Guilherme de Moraes . Isabela Watanabe . Vinícius Pelarin . Ana Carolina Cardoso . Andre Godoy . Danilo Cardim . Fernando Almeida . Jéssica de Assis . Marcel Moitas . Prof^ª. Hannelore Ehrenreich . Prof. Ekrem Dere . Debora Boaventura . Ulrich Weikert . Bárbara Oliveira . Giulia Poggi . Esther Gómez . Mara Saccomano . Fernanda Ramos . Gustavo Palamone . Patrícia Mateus . Carolina Araujo . Cléssio Gomes . Daniela Winkler . Anja Ronnenberg . Hong Pan . Ludovico Castelvetti . Marina Mitjans Niubó . Anastasiya Schirmacher . Caroline Velte . Tina Kling . Wiebke Timmer . Karla . Silmary Bertolani . Karla Correia . Thomas Appleby . Marciliana Correa . Iza Ferreira . Carlos Rotta . Daniel Moraes

... a minha família Elena, Cláudia e Cláudio pelo apoio e amor.
... a minha orientadora Rosana pela supervisão e aconselhamento.
... aos professores Cláudia, Ricardo, Silvio, Ekrem, Hannelore e Azair pela infraestrutura de pesquisa e suporte teórico.
... aqueles especiais da minha vida e deste estudo: Débora, Anes, Tatiani, Lucas, Giulia, Bárbara, Anja, Daniela, Silmary, Natalia, Bekir e Ulrich.
Este é um trabalho de equipe.

Agradecimentos à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), que financiou a presente pesquisa (processo nº 2013/10761-9), ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pelos recursos concedidos à Profa. Rosana e ao Laboratório de Neurociências.

OBRIGADA

EPÍGRAFE

„Jeder Mensch aber ist nicht nur er selber, er ist auch der einmalige, ganz besondere, in jedem Fall wichtige und merkwürdige Punkt, wo die Erscheinungen der Welt sich kreuzen, nur einmal so und nie wieder.“

Hermann Hesse – Demian

RESUMO

DAHHER PITTA, F. **Ansiedade induzida pelo estresse crônico variado e ativação diferencial das áreas límbicas relacionadas em camundongos**. 2017. 154 f. Tese (Doutorado em Ciências) – Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2017.

A exposição prolongada a estressores socio-ambientais induz alterações duradouras nos níveis afetivo, cognitivo e fisiológico característicos de transtornos de ansiedade e depressão. No paradigma de estresse crônico variado (ECV) é possível modelar essas alterações com base na exposição aleatória, intermitente e incerta dos roedores a vários estressores. Porém, alguns indivíduos também demonstram uma capacidade notável de adaptação ativa e persistem diante de eventos imprevisíveis e incontrolláveis. Sabe-se também que o sistema neural histaminérgico (SNH) é um indicador sensível do estresse e regula as reações defensivas relacionadas. Contudo, pouco se sabe sobre o papel da histamina no modelo de ECV. Considerando ainda que o perfil comportamental dos camundongos estressados pelo ECV seja contraditório, o presente estudo investigou se (1) duas linhagens de camundongos seriam susceptíveis a respostas relacionadas ao estresse; (2) a neurotransmissão histaminérgica estaria envolvida na ansiedade induzida pelo estresse; (3) o tratamento crônico com L-histidina (LH) combinado ou não ao ECV modificaria a expressão de Fos em áreas cerebrais límbicas. Para testar o impacto do protocolo ECV sobre respostas do tipo depressivas, os comportamentos de camundongos Suíços não estressados (NST) e estressados (ST) foram analisados na tarefa de esquiva ativa de duas vias e no teste de suspensão da cauda. Não foi detectado aumento significativo da imobilidade passiva, mas o grupo ST apresentou hiperreatividade na tarefa de esquiva. Como etapa seguinte, os efeitos do ECV no comportamento ansioso dos animais NST e ST foi verificado no labirinto em cruz elevado (LCE). Notavelmente, camundongos C57Bl/6 estressados desenvolveram respostas ansiogênicas, enquanto a linhagem de Suíço exibiu um perfil comportamental heterogêneo no LCE. Estes resultados indicam que o regime de ECV induz um efeito ansiogênico de modo consistente em animais C57Bl/6 adultos, enquanto os camundongos Suíço são resilientes ao protocolo. Além disso, a ansiedade induzida pelo ECV não foi revertida ou potencializada pela administração crônica de LH, enquanto que a estimulação farmacológica prolongada do SNH poderia representar um potencial estresse isoladamente. Adicionalmente, uma hipoativação das áreas corticais prélimbicas e infralimbicas foi relacionada à condição de estresse crônico, sem efeitos resultantes do tratamento farmacológico. A expressão de Fos⁺ induzida pela exposição ao LCE foi detectada nos subnúcleos lateral, basolateral e central, porém não houve ativação diferencial destes subnúcleos amígdaloides influenciados pelo ECV e/ou tratamento. Assim, os resultados apresentados corroboram evidências de que respostas ao estresse são genética- e experiência-dependentes, resultando em resiliência ou má adaptação de indivíduos e linhagens. Além disso, o ECV foi capaz de causar uma resposta ansiogênica acompanhada de hipoativação de subáreas específicas do córtex pré-frontal medial, região cerebral importante na regulação dos comportamentos defensivos e nas respostas psicofisiológicas do estresse. Finalmente, o tratamento crônico com LH não alterou os parâmetros comportamentais e neuroanatômico-funcionais influenciados pelo estresse.

Palavras-chave: Ansiedade. Estresse crônico variado (ECV). Resiliência. Córtex pré-frontal medial (CPFm). Amígdala. L-histidina. Camundongo.

ABSTRACT

DAHER PITTA, F. **Stress-induced anxiety and differential activation of related limbic areas in mice**. 2017. 154 f. Thesis (Doctorate in Sciences) – School of Philosophy, Sciences and Languages of Ribeirão Preto, University of São Paulo, Ribeirão Preto, 2017.

Chronic exposure to socio-environmental stressors leads to a myriad of long-term alterations in affective, cognitive and physiological levels, which typifies prevalent neuropsychiatric disorders. Importantly, chronic variable stress (CVS) is an experimental model for anxiety- and depressive-like disorders based on the random, intermittent, and uncertain exposure to various stressors. Some individuals also show a remarkable ability to adapt and actively cope and persist in the face of such unpredictable and uncontrollable events. Histamine is a sensitive indicator of stressful experiences and modulates the activation of neuroendocrine stress response to influence defensive reactions. However, little is known about the role of histamine on CVS model. While the behavioral profile of CVS-stressed mice is also contradictory, we investigated whether (1) two widely used mouse strains were susceptible to stress-related responses; (2) histaminergic neurotransmission is involved on stress-induced anxiety; (3) L-histidine (LH) chronic treatment combined to CVS changes Fos expression in limbic areas. To test the impact of the CVS protocol on depressive-like responses, the performance of non-stressed (NST) and stressed (ST) Swiss animals was analyzed in the two-way avoidance task and in the tail suspension test. No increased passive immobility was detected, but the ST group did display hyperreactivity in the avoidance task. Next, the effects of CVS on anxiety were examined in the elevated plus maze (EPM). Remarkably, stressed C57Bl/6 developed anxiogenic responses, while Swiss mice displayed a heterogeneous behavioral profile in the EPM. These results indicate that 2-week-long CVS regimen consistently induces anxiogenic-like response in adult C57Bl/6 mice, while Swiss animals seem to be resilient. Additionally, CVS-induced anxiety is not reversed or potentialized by the chronic administration of LH, but the histamine precursor appears to be a potential stressor *per se*. Importantly, a hypoactivation of the prelimbic and infralimbic cortical areas was related to the chronic stress condition, with no main effects of the pharmacological treatment. EPM-induced Fos⁺ expression was detected in the lateral, basolateral and central subnuclei, without differential activation of these amygdaloid subnuclei provoked by CVS and/or histaminergic stimulation. The present evidences corroborate the concept that stress responses can be genetic- and experience-dependent, resulting in resilience or maladaptation of a particular strain. Also, stress-induced anxiety could be related to a hypoactivation of the medial prefrontal cortex, important brain region in regulating the defensive behaviors and HPA stress response.

Keywords: Anxiety. Chronic variable stress (CVS). Resilience. Medial prefrontal cortex (mPFC). Amygdala. L-histidine. Mouse.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 – Charles Darwin selecionou fotos que ilustraram seu livro “A expressão das emoções no homem e nos animais” (1872)	19
Figura 2 – Abordagens no estudo do estresse	21
Figura 3 – O eixo hipotálamo-hipófise-adrenal	23
Figura 4 – Efeitos do estresse agudo e crônico	25
Figura 5 – Impacto de 4 e 8 semanas de estresse crônico imprevisível nos comportamentos ansioso, exploratório e depressivo de camundongos	27
Figura 6 – Representação esquemática do desenho experimental combinando estresse crônico variado e tarefa de esquiva de duas vias ou teste de suspensão pela cauda	41
Figura 7 – Análise dos comportamentos de camundongos Suíços exibidos durante a tarefa de esquiva de duas vias após diferentes períodos e protocolos de estresse crônico variado (ECV)	45
Figura 8 – Análise dos comportamentos de camundongos Suíços exibidos durante o teste de suspensão pela cauda após serem submetidos ao protocolo C de estresse crônico variado	47
Figura 9 – Relação entre os sistemas de Fuga/Luta/Congelamento, de Aproximação Comportamental e de Inibição Comportamental	54
Figura 10 – O sistema neural histaminérgico e ratos: origem e projeções	58
Figura 11 – Os neurônios histaminérgicos tuberomamilares e seus alvos	59
Figura 12 – Modelo de uma sinapse histaminérgica	60
Figura 13 – Comparação de imagens cerebrais a partir da tomografia por emissão de pósitron (PET) de voluntários saudáveis e pacientes depressivos	61
Figura 14 – Mudanças na composição dos fatores transcrpcionais da família de proteínas ativadoras 1 (AP-1) ao longo do tempo	63
Figura 15 – Vias intracelulares subjacentes à regulação da expressão gênica	64
Figura 16 – Exemplares das linhagens de Suíço e C57Bl/6	66
Figura 17 – Desenho experimental sobre os efeitos do estresse e/ou L-histidina crônicos na ansiedade e expressão de Fos	74

Figura 18 – Análise comportamental da ansiedade de camundongos Suíços em P35, P56 e P77 no início do regime de estresse crônico variável de 7 dias	78
Figura 19 – Análise comportamental da ansiedade de camundongos Suíços e C57Bl/6 em P56 no início do regime de estresse crônico variável de 14 dias	81
Figura 20 – Efeitos do tratamento crônico de L-histidina (LH), precursor histaminérgico, sobre a ansiedade de camundongos C57Bl/6 estressados ou não por 14 dias	90
Figura 21 – Quantificação de células positivas para imunomarcacão da proteína Fos nas sub-regiões cingulada, pré-límbica e infralímbica do CPFm	94
Figura 22 – Fotomicrografias do CPFm das secções cerebrais de camundongos quantificadas	95
Figura 23 – Quantificação de células positivas para imunomarcacão da proteína Fos nos subnúcleos lateral, basolateral e central do complexo amigdalóide	97
Figura 24 – Fotomicrografias do complexo amigdalóide das secções cerebrais de camundongos quantificadas	98
Figura 25 – Análise do comportamento de desamparo em camundongos C57Bl/6 submetidos ao teste de suspensão pela cauda após o estresse crônico variado de 7 dias	134

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Estressores, sua natureza e duração da apresentação utilizados para compor os protocolos A, B e C de estresse crônico variado	37
Tabela 2 – Características dos estressores que compuseram os protocolos de estresse crônico variado A, B e C testados	38
Tabela 3 – Resultados dos testes de esquiva ativa e suspensão pela cauda de camundongos Suíços após exposição crônica ao estresse de 7 dias	46
Tabela 4 – Comportamentos exibidos por camundongos durante a exploração do labirinto em cruz elevado (LCE), variando em idade durante o início do estresse crônico variado (ECV), período do ECV e linhagem	83
Tabela 5 – Comportamentos exibidos por camundongos durante a exploração do labirinto em cruz elevado (LCE), variando em idade durante o início do estresse crônico variado (ECV), período do ECV e linhagem	84
Tabela 6 – Peso dos camundongos ao longo da exposição ao estresse crônico variado (ST), variando em idade durante o início do estresse, período de estresse e linhagem. Animais não estressados (NST) foram utilizados como controle	87
Tabela 7 – Comportamentos exibidos por camundongos C57Bl/6 durante teste no labirinto em cruz elevado (LCE) após serem submetidos a condição de não estresse (NST) ou estresse crônico variado (ST) associado ao tratamento crônico de salina (SAL) ou L-histidina (LH)	91
Tabela 8 – Peso dos camundongos C57Bl/6 ao longo da exposição ao estresse crônico variado (ST) e após a exposição ao LCE associado ao tratamento crônico de salina (SAL) ou L-histidina (LH). Animais não estressados (NST) foram utilizados como controle da condição estresse.	92

LISTA DE ABREVIações

A	altura
AAA	núcleo da área amígdaloide anterior
AC	adenilil ciclase
Acc	nucleus accumbens
ACTH	hormônio adrenocorticotrófico
Amy	amígdala
AP-1	proteínas ativadoras 1
BLA	núcleo basolateral (da amígdala)
BMA	núcleo basomedial (da amígdala)
C	comprimento
cAMP	monofosfato cíclico de adenosina
CeA	núcleo central (da amígdala)
CeL	divisão centro-lateral (da amígdala central)
CeLc	região capsular da amígdala central
CeM	divisão centro-medial (da amígdala central)
CEUA	Comissão de Ética no Uso de Animais
CgA	córtex cingulado anterior
Cg1	córtex cingulado anterior 1
CoA	núcleo cortical (da amígdala)
CONCEA	Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal
CPF	córtex pré-frontal
CPFm	córtex pré-frontal medial
CRF	fator liberador de corticotrofina
CS	estímulo condicionado
CUS	estresse crônico imprevisível
CVS	<i>chronic variable stress</i>
d	áreas desprotegidas
D	diâmetro
EBA	Frequência de entradas nos braços abertos
EBF	Frequência de entradas nos braços fechados
ECV	estresse crônico variado
EPM	<i>elevated plus maze</i>
EPM	erro padrão da média
Est	Esticadas
FDA	<i>Food and Drug Administration</i>
FST	teste de nado forçado
GABA	ácido γ -aminobutírico
GAD	ácido glutâmico decarboxilase

Gi	proteína G inibitória
Gs	proteína G excitatória
HAB	<i>high anxiety-related behavior</i>
Hipot	hipotálamo
HPA	eixo hipotálamo-hipófise-adrenal
IA	núcleo intercalado (da amígdala)
IL	córtex infralímbico
i.p.	intraperitoneal
L	largura
La	núcleo lateral (da amígdala)
LAB	<i>low anxiety-related behavior</i>
LCE	labirinto em cruz elevado
Lev	Levantadas
LH	L-histidina
ITCm	núcleo intercalado medial
MAO	monoamina oxidase
MEA	núcleo medial (da amígdala)
Merg	mergulhos
MPFc	<i>medial pré-frontal cortex</i>
NLOT	núcleo do trato olfatório lateral
NST	não estressado
NTM	núcleo tuberomamilar
OF	campo aberto
OM	córtex orbito medial
PBS	salina tamponada com fosfato
SAC	sistema de aproximação comportamental
SAL	salina
SCA	sistema cerebral aversivo
SCP	substância cinzenta periaquedutal
SIC	sistema de inibição comportamental
SN	substância negra
SNC	sistema nervoso central
SNH	sistema neural histaminérgico
ST	estressado
Str	striatum
p	áreas protegidas
PA	núcleo posterior da amígdala
PAA	área amígdalohipocámpica
PET	tomografia por emissão de pósitron
PrC	córtex pré-central
PrL	córtex pré-límbico

TBA	Tempo gasto nos braços abertos
TBF	Tempo gasto nos braços fechados
TC	Tempo gasto na plataforma central
TE	Frequência total de entradas
TST	teste de suspensão pela cauda
UFSCar	Universidade Federal de São Carlos
US	estímulo não condicionado
USP	Universidade de São Paulo
%EBA	porcentagem de entradas nos braços abertos
%TBA	porcentagem de tempo gasto nos braços abertos
%TBF	porcentagem de tempo gasto nos braços fechados
%TC	porcentagem de tempo gasto no centro

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO GERAL.....	17
1.1	As emoções: conceito e conexões.....	17
1.2	Breve histórico da pesquisa sobre estresse.....	20
1.3	Neurobiologia do estresse.....	22
1.4	Estresse crônico variado como modelo experimental para o estudo dos transtornos relacionados ao estresse.....	25
	CAPÍTULO 1.....	29
1	INTRODUÇÃO	30
1.1	Depressão	30
1.2	Neurobiologia da depressão.....	31
1.3	Desamparo aprendido como modelo experimental no estudo da depressão...	32
2	OBJETIVOS.....	34
2.1	OBJETIVO GERAL.....	34
2.2	Objetivos específicos.....	34
3	MATERIAL E MÉTODOS	35
3.1	Animais.....	35
3.2	Equipamentos e respectivos procedimentos.....	35
3.2.1	Estresse crônico variado.....	35
3.2.2	Caixa de esquiva ativa.....	38
3.2.3	Caixa de isolamento acústico.....	39
3.2.4	Comportamentos analisados na tarefa de esquiva de duas vias.....	39
3.2.5	Teste de suspensão pela cauda.....	40
3.2.6	Comportamentos analisados no teste de suspensão pela cauda.....	40
3.3	Desenhos experimentais	42
3.3.1	Experimento 1. Análise do paradigma de desamparo aprendido associado ao estresse crônico imprevisível em camundongos Suíços.....	42
3.3.2	Experimento 2. Análise de comportamentos do tipo depressivo em camundongos Suíços submetidos ao teste de suspensão pela cauda.....	42
3.4	ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	43
4	RESULTADOS.....	44
4.1	Experimento 1. Análise dos comportamentos do tipo depressivo em camundongos Suíços submetidos à tarefa de esquiva de duas vias.....	44
4.2	Experimento 2. Avaliação de comportamentos do tipo depressivo em camundongos Suíços submetidos ao teste de suspensão pela cauda.....	47
5	DISCUSSÃO.....	48
6	CONCLUSÕES	50
	CAPÍTULO 2.....	51
1	INTRODUÇÃO	52

1.1	<i>Ansiedade</i>	52
1.2	<i>Substrato neural da ansiedade</i>	53
1.3	<i>Participação do sistema neural histaminérgico nos transtornos emocionais...</i>	56
1.4	<i>Ferramentas comportamental e imunoistoquímica no estudo da ansiedade...</i>	62
2	OBJETIVOS	65
2.1	OBJETIVO GERAL	65
2.2	<i>Objetivos específicos</i>	65
3	MATERIAL E MÉTODOS	66
3.1	<i>Animais</i>	66
3.2	<i>Droga</i>	66
3.3	<i>Anestesia e eutanasia</i>	67
3.4	<i>Equipamentos e procedimentos</i>	67
3.4.1	<i>Estresse crônico variado</i>	67
3.4.2	<i>Labirinto em cruz elevado</i>	68
3.4.3	<i>Comportamentos analisados na exposição ao labirinto em cruz elevado</i>	68
3.4.4	<i>Ensaio imunoistoquímico de Fos</i>	69
3.4.5	<i>Quantificação de células imunorreativas para Fos</i>	71
3.4.6	<i>Desenhos experimentais</i>	71
3.4.6.1	<i>Experimento 1. Análise dos comportamentos do tipo ansioso em camundongos Suíços submetidos ao estresse crônico variado</i>	71
3.4.6.2	<i>Experimento 2. Análise dos comportamentos do tipo ansioso em camundongos C57Bl/6 submetidos ao estresse crônico variado</i>	72
3.4.6.3	<i>Experimento 3. Efeitos do tratamento crônico de L-histidina na ansiedade induzida pelo estresse crônico variado em camundongos C57Bl/6</i>	72
3.4.6.4	<i>Experimento 4. Medida indireta da atividade neural de camundongos C57Bl/6 expostos ao labirinto em cruz elevado após estresse e tratamento crônicos</i>	73
3.5	ANÁLISE ESTATÍSTICA	75
4	RESULTADOS	76
4.1	<i>Experimento 1. Estresse crônico variado interfere em parâmetro biométrico e atividade locomotora, mas não na ansiedade, de camundongos Suíços</i>	76
4.2	<i>Experimento 2. Estresse crônico variado induz comportamentos do tipo ansiogênico em camundongos C57Bl/6</i>	85
4.3	<i>Experimento 3. L-histidina administrada cronicamente não altera comportamentos do tipo ansiogênico induzidos pelo estresse em camundongos C57Bl/6</i>	88
4.4	<i>Experimento 4. Córtex pré-frontal medial apresenta atividade neural reduzida à exposição ao LCE em camundongos C57Bl/6 estressados</i>	93
5	DISCUSSÃO	99

5.1	Experimento 1. <i>Estresse crônico variado interfere em parâmetro biométrico e atividade locomotora, mas não na ansiedade, de camundongos Suíços.....</i>	99
5.2	Experimento 2. <i>Estresse crônico variado induz comportamentos do tipo ansiogênico em camundongos C57Bl/6.....</i>	101
5.3	Experimento 3. <i>L-histidina administrada cronicamente não altera comportamentos do tipo ansiogênico induzidos pelo estresse em camundongos C57Bl/6.....</i>	103
5.4	Experimento 4. <i>Córtex pré-frontal medial apresenta atividade neural reduzida à exposição ao LCE em camundongos C57Bl/6 estressados.....</i>	106
6	CONCLUSÕES	113
	CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS.....	114
	REFERÊNCIAS.....	120
	APÊNDICES.....	132
	ANEXOS.....	135
	Parecer da Comissão de Ética no Uso de Animais	136
	Artigo científico 1 resultante do Estágio de Pesquisa no Exterior (BEPE)	137
	Artigo científico 2 resultante do Estágio de Pesquisa no Exterior (BEPE)	148

INTRODUÇÃO

1 INTRODUÇÃO GERAL

Desejo, satisfação, raiva, medo, e assim por diante... um fenômeno que pode ser conhecido apenas através da introspecção. Quando aplicado a outras... espécies, é meramente um palpite sobre a possível natureza do estado subjetivo do animal. Tinbergen¹ (1951 apud LEDOUX, 2014, tradução nossa)

1.1 As emoções: conceito e conexões

Assim como o desejo, a satisfação, a raiva e o medo mencionados na citação de abertura, a ansiedade, o prazer e a curiosidade são emoções com representação neural no sistema nervoso central (SNC). As emoções influenciam a aprendizagem, modulam a memória, facilitam a tomada de decisão e proporcionam motivação para a ação crítica frente aos estímulos ambientais. São elas um elemento chave nas diferenças entre os indivíduos (DAVIDSON, 2002). E oportunamente, cabe mencionar os múltiplos níveis de causalidade do comportamento sempre enfatizado pelo neurobiólogo e primatólogo norte-americano Robert Sapolsky. Nesse sentido, um comportamento emocional é melhor compreendido quando contextualizado aos processos biológicos ativos desde “um segundo a um milhão de anos antes” dele acontecer.

Fundamentalmente, emoções são respostas transitórias a um estímulo específico no ambiente, no organismo ou, no caso dos seres humanos, na mente (KANDEL et al., 2014). As respostas emocionais envolvem a mobilização de recursos orgânicos, como a ativação de circuitos neurais especializados, de modo a criar um estado global motivacionalmente específico (LEDoux, 2012). Em grupos animais complexos, à experiência consciente dos estados emocionais atribui-se o nome sentimento, e que acontece via sistemas neurais distintos daqueles que eliciam reações corporais (LEDoux, 2013). Quando um estado emocional passa a predominar ao longo do tempo, tornando-se independente das circunstâncias ambientais imediatas, pode-se nomeá-lo de humor (KANDEL et al., 2014). Além da importância do argumento semântico, é através da perspectiva evolutiva que o estudo das

¹Tinbergen, N. The Study of Instinct. New York: Oxford Univ Press, 1951.

emoções se torna relevante para a condição humana.

A marcante similaridade afetiva entre mamíferos, incluindo as populações humanas, ressaltam o caráter homólogo das emoções entre camundongos, ratos e primatas (PANKSEPP, 2011). Tais semelhanças evidenciam processos primários de mecanismos emocionais extremamente conservados, por exemplo, no que se refere às funções da recompensa e punição nas tarefas de aprendizagem. Panksepp (2011) ainda defende que os sistemas emocionais primitivos existem em algumas das regiões mais antigas do encéfalo, sendo geneticamente definidos e refinados através da experiência. Um destes principais sistemas emocionais, e tema do presente estudo, é o sistema do medo/ansiedade.

Dada a sua característica conservativa, a compreensão da expressão emocional no homem depende grandemente do estudo do comportamento emocional em outros animais (BRANDÃO, 2012). Charles Darwin, em seu livro “A expressão das emoções no homem e nos animais” de 1872 (Figura 1), foi enfático ao sugerir que as expressões faciais humanas fazem parte de um pacote coerente de respostas emocionais, e os precursores das ações musculares relacionadas podem ser vistos nos comportamentos expressivos de outros mamíferos (LEWIS; HAVILAND-JONES; BARRETT, 2008). A partir de então foi reconhecido o valor adaptativo das emoções como um fenômeno fundamental para sobrevivência das diferentes espécies animais.

Figura 1 – Charles Darwin selecionou fotos que ilustraram seu livro “A expressão das emoções no homem e nos animais” (1872)

(A) Posturas de submissão e agressão em cães e roedores. (B) Expressões faciais representando "terror" e "horror/agonia". Darwin propôs que a maioria das expressões compartilhadas entre os seres humanos são inatas, sendo evidência de uma ancestralidade comum não apenas das etnias humanas, mas destas e outros animais também. Fonte: University of Cambridge (2011).

Dentre as relações intrincadas entre organismo (ou corpo) e ambiente (ou mundo), moldadas genética e epigeneticamente, o estresse é uma palavra usada para descrever experiências que são desafiadoras emocional e fisiologicamente. O "estresse bom", no jargão popular, geralmente se refere a experiências de duração limitada, as quais o indivíduo domina e resultam em alegria e realização, enquanto que o "estresse ruim" refere-se à sensação de incontrollabilidade das experiências, muitas vezes prolongadas ou recorrentes, e que promovem esgotamento físico e emocional (McEWEN, 2007). Essencialmente, a ativação apropriada do eixo hipotálamo-hipófise-adrenal (HPA) pelo estresse orchestra de modo divergente as emoções (LEHMANN et al., 2013), iniciando processos adaptativos que permitem ao organismo enfrentar ameaças reais ou percebidas (HERMAN, 2013).

1.2 Breve histórico da pesquisa sobre estresse

Historicamente, a pesquisa do estresse teve início em meados do século XIX com a proposição do fisiologista francês Claude Bernard sobre as mudanças fisiológicas compensatórias às alterações das condições externas ao organismo. Em 1928, este conceito foi nomeado *homeostase* por Walter Cannon, fisiologista norte-americano, ao descrever a reação de “luta ou fuga” dos animais frente a estímulos que ameaçavam a constância fisiológica interna (BRANDÃO, 2012). Entretanto, foi o estudo marcante do pesquisador húngaro Hans Selye que há 81 anos inaugurou o cenário da pesquisa moderna sobre o estresse (Figura 2A) (FINK, 2016).

Selye observou manifestações estereotípicas decorrentes da exposição de ratos a estímulos potencialmente nocivos e de natureza distinta, como frio, lesão cirúrgica ou intoxicação, as quais nomeou *Síndrome da Adaptação Geral* (FINK, 2016). Baseado nessa reação geral de alarme, resistência e exaustão, Selye definiu como estresse “uma resposta não-específica do corpo frente a qualquer demanda” (SELYE, 1950; 1975). O autor discutiu a existência de mecanismos biológicos adaptativos através dos quais se atingia um novo estado de estabilidade do meio interno, processo esse nomeado *heterostase* (FINK, 2016).

Foram necessárias quatro décadas para que Selye reconhecesse que nem todas as respostas de estresse são iguais, apesar dos efeitos neuroendócrinos comuns (Figura 2B).

Essas particularidades devem-se, por exemplo, às diferenças na percepção e reação emocional de cada sujeito (SZABO; TACHE; SOMOGYI, 2012). Já nos anos 80, a ideia de *heterostase* foi precursora do conceito de *alostase*, que denota sistemas ativos que alcançam a estabilidade através de variações nos parâmetros fisiológicos dentro de certos limites (FINK, 2016; BRANDÃO, 2012). E, atualmente sabe-se que as respostas fisiológicas e a reatividade dos indivíduos também variam em função do tipo de estressor, duração e frequência da exposição aos estressores, bem como do sexo e fase do desenvolvimento (Figura 2C) (McEWEN et al., 2015). Assim, o conjunto de novas evidências tem promovido uma reinterpretação cada vez menos genérica da palavra estresse (BRANDÃO, 2012), porém ainda apoiada no fundamento de serem alterações adaptativas em resposta aos desafios ambientais.

Figura 2 – Abordagens no estudo do estresse

(A) Hans Selye enquanto descreve a síndrome da adaptação geral (SELYE, 1936) baseada em três fases: alarme, resistência e exaustão. Fonte: Fink (2016). (B) Modelo esquemático sobre a interação de fatores externos ao agente estressor e a resposta estereotípica da adaptação geral (GAS), resultando em síndromes polimórficas. Fonte: Selye (1950). (C) O pesquisador Bruce McEwen discute a resposta ao estresse com base no desenvolvimento da carga alostática. A percepção do estresse é influenciada pelas experiências individuais, fatores genético e comportamental. Quando o encéfalo percebe um estímulo como estressor, respostas fisiológicas e comportamentais são iniciadas, levando à alostase (estabilidade através da mudança) e adaptação. Ao longo do tempo, a carga alostática pode se acumular e a exposição excessiva aos mediadores neural, endócrino e imune do estresse pode ter efeitos adversos em vários sistemas do organismo, causando doenças. Fonte: McEwen (1998).

1.3 Neurobiologia do estresse

Kim e Diamond (2002) discutem uma definição de estresse baseada em três componentes que pode ser amplamente aplicada através das espécies e paradigmas. Primeiramente, o estresse requereria um estado de alarme ou excitabilidade do organismo, evidenciado nos níveis neuroquímicos e na atividade motora, por exemplo. De modo importante, a experiência de estresse deve ser percebida como aversiva, ou seja, o sujeito evitaria ou atenuaria a intensidade do estressor se houvesse possibilidade. Este segundo componente (aversividade) está, por sua vez, relacionado ao terceiro deles: a controlabilidade. O elemento de controle, intimamente ligado ao conceito de previsibilidade, finalmente determinaria a magnitude da experiência estressante e a susceptibilidade do indivíduo a desenvolver más adaptações ao estresse.

O encéfalo é o órgão central do estresse e dos mecanismos adaptativos aos estressores sociais e físicos, uma vez que detecta a ameaça, armazena memórias e regula respostas tanto fisiológicas como comportamentais, protetoras ou danosas (McEWEN et al., 2015). O processo alostático modulado pelo encéfalo acontece via múltiplos mediadores, marcadamente os sistemas autônomo (como a síntese de adrenalina), neuroendócrino (ativação do eixo HPA, por exemplo), metabólico (como a regulação hormonal do metabolismo energético) e imunológico (por exemplo, através dos componentes pró- e anti-inflamatórios) (LUPIEN et al., 2009; McEWEN, 2007).

Embora sejam amplamente reconhecidos os efeitos difusos do estresse, três regiões cerebrais são cruciais para compreensão do comportamento emocional, função cognitiva, ajustes autonômicos e modulação do eixo HPA: amígdala, hipocampo e córtex pré-frontal (CPF). Sendo estimulada pelo evento estressor, a amígdala aciona o eixo HPA causando uma resposta de adaptação ao desafio percebido (LUPIEN et al., 2009). As fibras excitatórias amigdaloides transmitem as informações relacionadas ao estresse, ativando a síntese e a secreção do fator liberador de corticotrofina (CRF) pelo núcleo paraventricular do hipotálamo (Figura 3). O CRF, por sua vez, estimula as células corticotróficas da adeno-hipófise a sintetizar e liberar o hormônio adrenocorticotrófico (ACTH). Através do sistema circulatório, o ACTH chega ao córtex das glândulas adrenais e induz a liberação de glicocorticoides. O principal

glicocorticoide em humanos é o cortisol e em roedores é a corticosterona (KANDEL et al., 2014).

Figura 3 – O eixo hipotálamo-hipófise-adrenal

As fibras excitatórias da amígdala ativam a biossíntese e secreção do fator liberador de corticotrofina (CRF); as fibras inibitórias provem do hipocampo. O CRF é secretado por neurônios parvocelulares do núcleo paraventricular do hipotálamo dentro do sistema porta-hipofisário e estimula as células corticotróficas da adeno-hipófise, causando a liberação de hormônio adrenocorticotrófico (ACTH). O ACTH atinge o córtex adrenal por meio da corrente sanguínea, onde estimula a secreção dos glicocorticóides. Dentre suas diversas funções, os glicocorticóides, incluindo formas sintéticas como a dexametasona, atuam na hipófise e no hipotálamo, reprimindo a síntese e liberação de ACTH e CRF, respectivamente. Fonte: Nestler, Hyman e Malenka (2009).

Uma vez estimulado o eixo HPA, alças de *feedback* são ativadas e regulam os diferentes níveis deste sistema (desde as glândulas adrenais até o hipotálamo, hipocampo e córtex frontal). Finalmente, a modulação central do eixo HPA faz com que o ponto de equilíbrio seja restabelecido no organismo (LUPIEN et al., 2009). O CPF faz parte do circuito corticolímbico estimulado pelo estresse e aparece especialmente vulnerável aos seus efeitos deletérios. Pacientes depressivos, por exemplo, podem apresentar hipoatividade desta área cerebral, além de déficits na função executiva (DAVIDSON et al., 2002). Assim, as experiências de estresse podem ser um risco às funções desempenhadas pelo CPF – controle cognitivo necessário às sequências complexas de comportamento, atenção seletiva, inibição

comportamental, alternância de tarefas, tomada de decisão e memória de trabalho (DALLEY; CARDINAL; ROBBINS, 2004).

O hipocampo foi a primeira região do cérebro, além do hipotálamo, a ser reconhecida como alvo dos glicocorticóides (McEWEN, 2007), e desempenha um papel marcante na inibição da resposta do eixo HPA ao estresse. Sabe-se que o estresse crônico pode levar à redução do volume hipocampal e duas hipóteses vêm sendo investigadas para explicá-la. Experiências aversivas ou estressantes, bem como o excesso de glicocorticoides, inibem a proliferação das células precursoras de neurônios granulares do giro dentado e, portanto, suprimem a taxa natural de neurogênese no hipocampo (KANDEL et al., 2014; KIM e DIAMOND, 2002). Lehmann et al. (2013) demonstrou que a elevação aguda e prolongada de corticosterona pela exposição diária de camundongos ao estresse de defesa social reduz a proliferação de novos neurônios hipocampais. Em contrapartida, antidepressivos capazes de promover a neurogênese (LEHMANN et al., 2013), ou de recrutar novos neurônios para atenuar a ativação de circuitos corticolímbicos durante o estresse crônico (SURGET et al., 2011) revertem esse quadro.

Outra teoria sugere que a atrofia hipocampal seja causada por danos neuronais nesta estrutura. Os níveis de glicocorticoides constantemente elevados tornariam os neurônios do hipocampo mais suscetíveis à excitotoxicidade glutamatérgica (KANDEL et al., 2014). Essas duas proposições podem ser complementares e, primordialmente, têm como consequência comum o prejuízo no controle inibitório da secreção do CRF pelo hipocampo. Assim, a resposta do eixo HPA se torna mais prolongada frente aos estressores psicológicos (McEWEN et al., 2015).

Nos níveis celular e molecular, má adaptações ao estresse envolvem a interação de mediadores da superfície neuronal, citoesqueleto, regulações genética e epigenética (McEWEN, 2007). Sabe-se, por exemplo, que as experiências estressantes promovem um remodelamento estrutural da arquitetura neural (Figura 4). No hipocampo e no CPF, estresse e glicocorticoides causam encolhimento dos dendritos e perda das espinhas dendríticas. Em contrapartida, o núcleo basolateral da amígdala exhibe expansão dos dendritos e aumento da densidade de espinhas dendríticas (McEWEN et al., 2015). Assim, enquanto as respostas ao estresse lidam com desafios urgentes ao organismo, minimizando riscos, deve-se considerar

que o processamento inadequado das informações estressoras pode fazer parte de um processo patológico (HERMAN, 2013).

Figura 4 – Efeitos do estresse agudo e crônico

Os efeitos são mediados em parte por glutamato e glicocorticoides, bem como por outras moléculas (fator liberador de corticotrofina e endocanabinóides, por exemplo). Esses efeitos seguem uma curva na forma de U invertido na dose e no tempo. A linha do tempo mostra como o estresse agudo e crônico e o envelhecimento interagem com a intensidade e duração do estressor. Fonte: McEwen et al. (2015).

1.4 Estresse crônico variado como modelo experimental para o estudo dos transtornos relacionados ao estresse

Modelos animais têm possibilitado estudos neurobiológicos detalhados dos estados emocionais. O estudo comparativo do comportamento emocional de roedores, como ansiedade, traz contribuições sobre os processos neurais subjacentes ao comportamento também de humanos (KANDEL et al., 2014). Outros aspectos relevantes e vantajosos da

utilização de camundongos como modelo animal são a disponibilidade de inúmeras linhagens geneticamente modificadas (transgênicas ou *knockout*, por exemplo) e o custo de manutenção reduzido quando comparado ao de ratos (MONTEIRO et al., 2015). Contudo, a avaliação objetiva das emoções e seus transtornos em animais ainda é um desafio. Os modelos animais têm sido especialmente relevantes para testar os efeitos de fármacos antidepressivos, mas são poucos aqueles validados para identificar os circuitos responsáveis pela manutenção do estado depressivo (CRYAN; MOMBÉREAU, 2004).

Também bastante descrita na literatura científica é a indução de efeitos deletérios através do estresse crônico variado (ECV), defendido por Willner (2005) como um modelo de depressão com validade por similaridade. Esse modelo reforça a proposta teórica de Post (1992), o qual sugere que a exposição contínua a estressores diversos, principalmente os de origem psicossocial, leva ao desenvolvimento de depressão. Nesse sentido, as alterações comportamentais em resposta a eventos estressantes tornam-se cada vez mais intensas, severas e espontâneas enquanto os estressores diminuem em intensidade, até que alterações de humor espontâneas começam a ocorrer, caracterizando o quadro de depressão.

O ECV parece ter como consequência evidente a anedonia (incapacidade de sentir prazer), além da existência de relatos favoráveis ao efeito de antidepressivos revertendo esse estado (WILLNER, 2005). Papp e Moryl (1996) mostraram que ratos treinados ao consumo de sacarose reduziram a ingestão da solução após serem submetidos ao ECV durante nove semanas. A mesma redução no consumo foi observada por Zurita e colaboradores (2000) nos animais estressados por sete dias. Essa subsensibilidade à recompensa aparenta refletir anedonia, um sintoma típico das principais desordens depressivas.

Adicionalmente, animais cronicamente estressados têm aumento do comportamento motivado pelo medo (BOWMAN; BECK; LUINE, 2003). Isgor et al. (2004) mostraram que o ECV em ratos adolescentes reduz o volume hipocampal além de prejuízos na memória espacial avaliada no labirinto aquático de Morris. Alterações comportamentais do tipo ansiedade também são descritas em roedores expostos ao ECV e testados no labirinto em cruz elevado (CAMPOS et al., 2013). Monteiro e colaboradores (2015) compararam os efeitos do protocolo de estresse crônico imprevisível aplicado durante 4 e 8 semanas em camundongos C57Bl/6 (Figura 5). Apenas o regime de estresse crônico imprevisível ao longo

de 8 semanas foi capaz de desencadear consistentemente um espectro de mudanças comportamentais (Figuras 5B, D, F e H) e imunológicas relacionadas ao estresse naqueles animais.

Figura 5 – Impacto de 4 e 8 semanas de estresse crônico imprevisível nos comportamentos ansioso, exploratório e depressivo de camundongos

Oito semanas de estresse crônico imprevisível (CUS) em camundongos C57BL/6 potencializa comportamentos ansioso no (B) labirinto em cruz elevado (EPM), depressivo nos testes de (F) nado forçado (FST) e (H) suspensão pela cauda (TST), além de reduzir o comportamento exploratório no (D) campo aberto (OF). O desempenho dos animais expostos a 4 semanas de CUS no (A) EPM, (E) FST e (G) TST não foi alterado; porém, induziu uma (C) diminuição da atividade exploratória no OF. Barras representam média±EPM de 8 a 10 animais por grupo. *p<0,05. Fonte: Monteiro et al. (2015).

Portanto, utilizamos um protocolo de estresse crônico baseado na variedade de estressores, apresentados aleatoriamente uma vez por dia aos camundongos, de forma intermitente e imprevisível, de modo a mimetizar a variabilidade dos estressores encontrados no cotidiano (validade de constructo). Embora não sejam frequentemente utilizados em camundongos, os protocolos de ECV são amplamente utilizados em ratos e demonstraram ser altamente eficazes na indução de fenótipos relacionados ao estresse (RICON et al., 2012; ZURITA et al., 2000; PAPP; MORYL, 1996).

1. INTRODUÇÃO

1.1 *Depressão*

De acordo com a Organização Mundial da Saúde, 322 milhões de pessoas – 4,4% da população mundial – apresentaram algum transtorno depressivo em 2015. Apesar de a depressão ter uma estimativa de maior prevalência entre as mulheres (5,1%) do que em homens (3,6%), sua forma severa contribui para os índices de morte por suicídio mais predominantes em jovens adultos do sexo masculino. Além disso, a depressão unipolar foi a principal causa de incapacidade em 2015 e sua prevalência crescente ao longo dos anos reflete, particularmente, o aumento e envelhecimento da população global (WHO, 2017). Tais características epidemiológicas dos transtornos mentais comuns são incontestavelmente relevantes às políticas de saúde pública mundiais e à investigação científica dos distúrbios de humor.

Os transtornos depressivos são distúrbios de humor com base genética e/ou ambiental caracterizado por tristeza, vazio ou irritabilidade, acompanhados de alterações somáticas e cognitivas que afetam significativamente o desempenho do indivíduo (APA, 2014). Frequentemente são acompanhados de disforia, anedonia e perda de interesse pelas atividades diárias (KANDEL et al., 2014). Alguns pacientes com depressão também exibem retardo psicomotor ou agitação extrema; em relação aos sintomas fisiológicos, pode ocorrer perda ou ganho de peso. Na classificação padronizada dos transtornos psiquiátricos, a depressão unipolar, episódica, primária, com pelo menos duas semanas de duração, é nomeada como depressão maior (APA, 2014).

Os genes não são os únicos responsáveis pela depressão, podendo interagir com fatores do desenvolvimento e ambientais na manifestação da doença (McEWEN, 2007). Em muitos casos, a depressão resulta de experiências estressantes. Porém, apesar de o estresse crônico e a depressão compartilharem muitas características (como a atividade persistente do eixo HPA) eles não são idênticos (KANDEL et al., 2014).

1.2 Neurobiologia da depressão

A atividade persistente do eixo HPA pode contribuir para os sintomas da depressão maior. Nesse sentido, os níveis de cortisol, CRF e ACTH podem estar elevados em indivíduos deprimidos como resultado do sistema de retroalimentação comprometido dentro daquele eixo, tornando-o resistente à supressão. Porém, estas alterações não são suficientemente sensíveis e específicas como teste diagnóstico para depressão (KANDEL et al., 2014).

Como a depressão maior tem sido caracterizada por altos níveis sustentados de cortisol, a neuroplasticidade estaria prejudicada (PITTENGER; DUMAN, 2008). A remodelação neuronal significativa de regiões cerebrais, como hipocampo, córtex pré-frontal e amígdala, estaria envolvida nas alterações comportamentais do tipo depressivas (McEWEN e MORRISON, 2013). Por exemplo, em amostras de tecido cerebral de indivíduos deprimidos, o córtex frontal e o hipocampo apresentaram perda de células gliais e tamanho reduzido das células neuronais, resultante do encolhimento dendrítico (STOCKMEIER et al., 2004). Pacientes depressivos também podem apresentar prejuízos de memória, possivelmente relacionados à disfunção hipocampal por si só ou em conjunto a alterações nas funções executivas que envolvem o córtex pré-frontal, como déficit nos mecanismos atencionais durante a aprendizagem (KANDEL et al., 2014).

Além do hipocampo, alterações funcionais e anatômicas descritas em estudos de neuroimagem apontam a implicação da amígdala e do córtex cingulado anterior nos transtornos depressivos. A amígdala está intimamente relacionada ao processamento emocional, inclusive o medo. O aumento do volume da amígdala, bem como dos seus níveis basais de atividade, e uma atrofia hipocampal, foram observados em pacientes deprimidos (KANDEL et al., 2014). O giro do córtex cingulado anterior apresenta as subdivisões rostrais e caudais, as quais acredita-se estarem envolvidas nos processos emocionais e autonômicos, pois estabelecem conexões extensas com o hipocampo, amígdala, córtex pré-frontal orbital, ínsula e núcleo acumbens (KANDEL et al., 2014). Através de tomografia por emissão de pósitron, pacientes com depressão crônica apresentam atividade mais baixa nessa área quando comparados aos indivíduos saudáveis ao recordarem eventos tristes (DAMASIO et al., 2000).

Os transtornos do humor e de ansiedade parecem abranger circuitos neurais sobrepostos, como o circuito corticolímbico, além de compartilhar fatores de risco (KANDEL et al., 2014). Essas evidências podem justificar a associação comum entre depressão maior e transtornos de ansiedade, ou ainda os casos nos quais a ansiedade patológica precede o início da depressão (KESSLER et al., 2005; 2011).

1.3 Desamparo aprendido como modelo experimental no estudo da depressão

No condicionamento de esquiva, um animal aprende a executar respostas que evitam com sucesso um choque aversivo, dito estímulo não condicionado (US). A esquiva bem-sucedida do choque reforça a resposta, ou seja, aumenta a probabilidade da resposta se repetir (KANDEL et al., 2014). O comportamento de medo aprendido pode ser frequentemente estabelecido usando uma forma simples de condicionamento pavloviano por meio de pista visual. Neste paradigma de aprendizagem rápida e robusta, o animal aprende a associar um sinal luminoso previamente neutro (estímulo condicionado ou CS) com um estímulo aversivo contingente, como um choque suave nas patas (estímulo incondicionado ou US).

A re-exposição à luz provoca uma reação de imobilidade chamada "congelamento", sendo esta uma medida comportamental da associação aprendida. Nesse sentido, a amígdala conectaria os estímulos externos a que o indivíduo é submetido com suas consequências aversivas ou recompensadoras (McGAUGH, 2004). Acredita-se que a convergência das vias do CS e do US no núcleo lateral seja a base das mudanças sinápticas que medeiam o aprendizado do medo (KANDEL et al., 2014).

O paradigma do desamparo aprendido tem sido amplamente utilizado pela alta sensibilidade aos agentes com propriedades antidepressivas e por induzir sintomas similares àqueles presentes na depressão (CHADMAN; YANG; CRAWLEY, 2009). Nesse modelo, os roedores expostos a situações aversivas incontroláveis, geralmente choques inescapáveis, mostram uma redução da habilidade de escapar de futuras situações aversivas (MURUA; MOLINA, 1992; MURUA et al., 1991).

Joca, Padovan e Guimarães (2003) observaram que, no modelo de desamparo aprendido, a pré-exposição de ratos aos choques inescapáveis nas patas prejudicou o

desempenho de esquiva/fuga após 24 h. Esse efeito foi prevenido pelo tratamento crônico de imipramina e pela zimelidina intra-hipocampo, ambos inibidores da recapitação de serotonina. Um mecanismo que explicaria o prejuízo da resposta de esquiva/fuga estaria ligado às memórias de estresse, que atenuariam o impacto emocional induzido pelo estresse após a sessão de treinos (GUIMARÃES et al., 1993).

Ratos que foram cronicamente estressados durante 7 dias e depois testados na tarefa de esquiva de duas vias apresentaram aumento das falhas na resposta de fuga em relação ao grupo controle e aos animais que sofreram estresse de contenção repetida, efeito esse revertido pelo antidepressivo imipramina (MURUA et al., 1991). Portanto, o fator variabilidade no esquema de ECV pode ser crítico na alteração comportamental observada em experiências aversivas subsequentes.

A aprendizagem de esquiva ativa tem sido utilizada nos estudos de associação entre drogas antidepressivas, desamparo e memória. Mas, suas conclusões ainda são contraditórias. Deste modo, o presente estudo combinou os protocolos de ECV e de esquiva de duas vias, com o objetivo de avaliar os comportamentos indicativos de aprendizagem aversiva em camundongos cronicamente estressados. A fim de examinar se o desempenho dos animais na esquiva ativa afetado pelo ECV seria teste-específico, grupos independentes de camundongos estressados foram analisados no teste de suspensão pela cauda. Nesse contexto, nossa hipótese foi de que o ECV induziria um déficit na aprendizagem de fuga e um aumento da imobilidade nos animais testados, características do desamparo.

2. OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Investigar se o estresse crônico variado induz comportamentos do tipo depressivo em camundongos Suíços.

2.2 Objetivos específicos

- i. Avaliar se o estresse crônico variado é capaz de induzir comportamentos de desamparo em camundongos da linhagem Suíço submetidos à tarefa de esquiva de duas vias;
- ii. Avaliar se o estresse crônico variado é capaz de aumentar significativamente a imobilidade passiva em camundongos Suíços submetidos ao teste de suspensão pela cauda.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Animais

Foram utilizados 69 camundongos *Mus musculus* da linhagem Suíço albino (Figura 1), machos e com 6 semanas de idade durante o início dos protocolos de estresse crônico. Os animais eram provenientes do Biotério Central da Universidade Federal de São Carlos (UFSCar), *campus* São Carlos.

Após sua chegada ao Laboratório de Neurociências, UFSCar, os camundongos foram alojados em grupos de 4-5 indivíduos por gaiola (28×18×11 cm) forrada com cama de maravalha. As gaiolas-moradias contendo os animais foram acomodadas em estante ventilada no biotério experimental do Laboratório de Neurociências por, no mínimo, 3 semanas prévias ao início dos procedimentos. No biotério experimental, os camundongos permaneceram sob condições controladas de temperatura ($24\pm1^{\circ}\text{C}$) e umidade do ar ($55\pm5\%$), além do ciclo claro-escuro de 12/12 h (luzes acesas às 07:00). Água e ração eram disponíveis para livre consumo, exceto durante os períodos de estresse hídrico e alimentar, e de teste.

Os experimentos foram realizados sob aprovação da Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA-UFSCar; protocolo nº 044/13) e conforme as normas especificadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA).

3.2 Equipamentos e respectivos procedimentos

3.2.1 Estresse crônico variado

O protocolo consiste na exposição diária de camundongos a estressores distintos. Para o presente estudo, os estressores utilizados foram previamente descritos em publicações acerca da aplicação bem-sucedida do ECV na indução de alterações comportamentais em ratos (ZURITA et al., 2000) e camundongos (CAMPOS et al., 2013; SANTARELLI et al., 2003), com pequenas adaptações.

Três protocolos de ECV foram testados, denominados protocolos **A**, **B** e **C**, variando na composição, natureza e número de apresentações diárias dos eventos estressores (Tabela 1). As características de cada estressor utilizado estão detalhadas na Tabela 2. Som intermitente, contenção e nado forçado foram aplicados durante a fase clara do ciclo (entre 08:00 e 13:00), enquanto que a remoção da maravalha, maravalha úmida, gaiola inclinada, privações alimentar e hídrica, e isolamento social se estenderam pela fase escura devido à sua duração.

A ordem de apresentação dos estressores foi semi-randômica a fim de garantir o caráter imprevisível do modelo (Figura 6A). Imediatamente após a conclusão de cada sessão de estresse, os animais foram levados em suas gaiolas-moradias ao biotério experimental e ali mantidos até o início da próxima sessão. Os camundongos que não foram submetidos ao ECV permaneceram durante todo o período no biotério experimental. Ao final, os grupos experimentais dos protocolos **A**, **B** e **C** foram nomeados de acordo com a condição e o período de ECV: **NST**, grupo **não estressado** ou controle; **ST7**, grupo **estressado** ao longo de **7 dias**; **ST14**, grupo **estressado** ao longo de **14 dias**; **ST21**, grupo **estressado** ao longo de **21 dias**.

Tabela 1 – Estressores, sua natureza e duração da apresentação utilizados para compor os protocolos **A**, **B** e **C** de estresse crônico variado

	Protocolo A			Protocolo B			Protocolo C		
Dia	Estressor	Natureza	Duração	Estressor	Natureza	Duração	Estressor	Natureza	Duração
1	Remoção da cama de maravalha	Físico	24 h	Contenção	Físico	2 h	Som intermitente	Físico	3 h
				Gaiola inclinada em 45°		16 h			
				Maravalha úmida		12 h			
2	Maravalha úmida	Físico	24 h	Nado forçado à frio (água a 15±1°C)	Físico	10 min	Gaiola inclinada em 45°	Físico	24 h
				Privação de água		24 h			
3	Gaiola inclinada em 45°	Físico	24 h	Isolamento social	Social	24 h	Contenção	Físico	2 h
4	Contenção	Físico	2 h	Privação alimentar	Físico	24 h	Nado forçado à frio (água a 15±1°C)	Físico	10 min
5	Nado forçado (água a 24±1°C)	Físico	10 min	Contenção	Físico	2 h	Privação alimentar	Físico	18 – 24 h
				Remoção da cama de maravalha		12 h			
6	Privação de água	Físico	24 h	Nado forçado à frio	Físico	10 min	Privação de água	Físico	18 – 24 h
				Gaiola inclinada em 45°		16 h			
7	Privação alimentar	Físico	24 h	Isolamento social	Social	24 h	Isolamento social	Social	18 – 24 h

Tabela 2 – Características dos estressores que compuseram os protocolos de estresse crônico variado **A**, **B** e **C** testados

Estressores	Descrição
Remoção da cama de maravalha	Grupos de 4-5 animais alojados por gaiola de 28×18×11 cm sem cama de maravalha
Maravalha úmida	Adição de 350 ml de água na gaiola-moradia forrada com cama de maravalha
Som intermitente	Aparelho com emissão sonora à 22 kHz por 10 s, em intervalos de 5 s
Gaiola inclinada em 45°	Rampa de 30x16 cm com borracha antiderrapante e inclinação de 45°; base de 30x20 cm (C x L)
Contenção	Contensores em acrílico transparente para camundongo de 0-80 g, com 10 furos laterais para passagem de ar
Nado forçado	Tanque em acrílico transparente de 25x17 cm (A x D), 7 l (volume total), 10 cm de profundidade de água à temperatura de 24±1°C (morno) ou 15±1°C (frio)
Privação alimentar	Retirada dos <i>pellets</i> de ração do suporte aramado da gaiola
Privação de água	Retirada dos bebedouros contendo 350 ml de água
Isolamento social	Cada animal alojado separadamente em uma gaiola de 28×18×11 cm

3.2.2 Caixa de esquiva ativa

A caixa de esquiva ativa em acrílico cristal cinza (48×27×30 cm) é composta por dois compartimentos idênticos de 24×13,5×15 cm, ambos com tampa. Uma abertura de 7×7 cm na parede central (27x30 cm) que divide os dois ambientes localiza-se ao nível do piso feito em barras de aço inoxidável (2,5 mm de diâmetro), distanciadas 1 cm entre si. O choque elétrico (10 s de duração e intensidade de 0,4 mA) foi gerado por um estimulador isolado e distribuído pelo piso, sendo precedido pela apresentação de até 20 s de uma luz (10 s anteriores ao choque e até 10 s durante o mesmo).

O acionamento destes estímulos está associado a um software acoplado à caixa de esquiva ativa (Insight 3.9, Ribeirão Preto, Brasil), que possui sensores de infravermelho responsáveis por detectar a passagem do animal de um compartimento ao outro. Cada estímulo luminoso, choque e seu intervalo seguinte foram considerados um treino, sendo o intervalo configurado em esquema de razão variável (45±13,5 segundos).

3.2.3 Caixa de isolamento acústico

A caixa de isolamento acústico (Insight 3.9, Ribeirão Preto, Brasil) utilizada é produzida em madeira (53×65×50 cm), com seu interior forrado em fórmica e placas de isolamento acústico. Apresenta porta frontal com janela de vidro (46,8×34,8 cm) para visualização do seu interior, além de ventilador para exaustão e circulação de ar interno (ruído gerado pelo exaustor ligado: 61db; atenuação de ruído: aproximadamente 22db).

3.2.4 Comportamentos analisados na tarefa de esquiva de duas vias

Os comportamentos dos roedores durante o teste foram registrados pelo software na forma de relatório de dados (Insight 3.9, Esquiva Ativa para ratos e camundongos, Ribeirão Preto, Brasil). Com base na planilha gerada, as medidas comportamentais analisadas foram:

- a. Tipo de resposta:
  - i. Fuga, caracterizada pelo deslocamento do animal para o compartimento oposto durante a apresentação do choque, interrompendo-o.
  - ii. Falha, que é a ausência de fuga, tendo o choque ocorrido em sua integridade.
- b. Latência para emissão da resposta. Para as respostas de fuga e falha, os valores de latência são a soma dos 10 s integrais do estímulo luminoso e a duração do choque aplicado (até o seu desligamento ou tempo total).
- c. Total de transições do animal entre as apresentações do choque.

A redução da latência e do nº de falhas, além do aumento dos cruzamentos, durante a exposição foram consideradas medidas para aprendizagem. O critério para inferir desamparo foram ambos o nº total de falhas exibidas pelo animal ≥ 6 e latência $\geq 14,75$ (CHOURBAJI et al., 2005). Para o critério latência, o valor analisado inclui os 10 s de luz somados aos 4,75 s proposto por Chourbaji e coautores (2005). Finalmente, o total de cruzamentos durante o treino foi considerada medida de atividade locomotora.

3.2.5 *Teste de suspensão pela cauda*

O teste de suspensão pela cauda foi desenvolvido por Steru (1985) para detectar a atividade antidepressiva de diversas classes de fármacos. Cada animal foi suspenso com auxílio de uma fita adesiva isolante [18×0,13 mm (L×E), Imperial 3M] colocada a 1 cm da extremidade da cauda e aderida no perímetro da bancada de experimento (altura de 50 cm em relação ao piso). O camundongo foi posicionado de modo que não pudesse fugir ou agarrar superfícies próximas, com a porção ventral do seu corpo voltada à câmera de registros. O teste teve duração de 6 min e foi filmado por um sistema de gravação (GeoVision GV-600 System), com a câmera posicionada a frente do animal e conectada a um computador adjacente para o armazenamento das imagens.

3.2.6 *Comportamentos analisados no teste de suspensão pela cauda*

Após a análise manual e sistemática dos vídeos, foram quantificadas as seguintes medidas comportamentais:

- a. tempo de imobilidade exibida pelo camundongo em blocos de 2 min;
- b. tempo de imobilidade na duração total do teste;
- c. latência para o primeiro episódio de imobilidade.

A imobilidade foi definida como ausência total dos movimentos do animal – com exceção daqueles necessários para respiração – ou ausência de movimentos bruscos (nesse último caso, o animal apenas moveu breve e levemente a cabeça ou as patas dianteiras). Diminuição da latência e/ou aumento do tempo de imobilidade foram indicativos de comportamento do tipo depressivo.

Figura 6 – Representação esquemática do desenho experimental combinando estresse crônico variado e tarefa de esquiva de duas vias ou teste de suspensão pela cauda

(A) Sequência-exemplo de estressores apresentados diariamente ao longo de uma semana de estresse crônico variado (ECV). Para os protocolos de 14 e 21 dias, os estressores foram semi-randomicamente repetidos conforme o protocolo testado. (B) Desenho experimental referente ao ECV apresentado aos camundongos ST seguido pela tarefa de esquiva de duas vias ou pelo teste de suspensão pela cauda. Grupos controle (NST) permaneceram no biotério experimental e não passaram pelo ECV.

3.3 Desenhos experimentais

Vinte e quatro horas após a última sessão de estresse, os animais foram levados em suas gaiolas-moradia do biotério experimental para a sala de testes, onde permaneceram de 30 a 60 min prévios ao teste para habituação ao local. Os testes comportamentais foram realizados durante a fase clara do ciclo, entre 8:00 e 13:00.

3.3.1 Experimento 1. *Análise do paradigma de desamparo aprendido associado ao estresse crônico imprevisível em camundongos Suíços*

Para todos os testes, a caixa de esQUIVA ativa foi posicionada no interior da caixa de isolamento acústico. Cada camundongo foi gentilmente colocado em um dos compartimentos da caixa de esQUIVA ativa com a face voltada para passagem. Em seguida, choques escapáveis sinalizados por uma luz foram apresentados, e interrompidos quando o animal cruzou em direção ao compartimento oposto aquele em que o choque foi apresentado (Figura 6B). A exposição de cada camundongo ao teste de esQUIVA ativa teve um total de 30 treinos subsequentes. Os seguintes grupos independentes de camundongos foram avaliados:

- Grupo **NST** (n=11)
- Protocolo **A**: grupos **ST7** (n=5) e **ST14** (n=10)
- Protocolo **B**: grupos **ST7** (n=5)
- Protocolo **C**: grupos **ST7** (n=6), **ST14** (n=6) e **ST21** (n=7)

3.3.2 Experimento 2. *Análise de comportamentos do tipo depressivo em camundongos Suíços submetidos ao teste de suspensão pela cauda*

Camundongos sem estresse e estressados foram submetidos ao teste de suspensão pela cauda (Figura 6B). Ao final, dois grupos experimentais foram formados:

- Grupo **NST** (n=9)
- Protocolo **C**: grupos **ST7** (n=10)

3.4 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os dados apresentados nas tabelas e figuras estão expressos em média $\pm$ erro padrão da média (EPM). A distribuição dos dados e a homogeneidade de variância foram analisados através do teste de Levene. Em seguida, comparações entre grupos foram realizadas através do teste t de Student para amostras independentes ou Mann-Whitney U-test (MW). ANOVA de uma ou duas vias sem medidas repetidas foram utilizadas para análise de dados com distribuição normal; teste de Kruskal-Wallis (KW) para dados sem distribuição normal; e, quando necessário, foi efetuada correção de Bonferroni. Após detectadas diferenças, a análise prosseguiu com o teste *post hoc* de comparações múltiplas de Duncan ou teste de Dunn. Todas as análises foram realizadas através do software Statistica 8.0 (StatSoft. Inc., EUA). Os valores de p são bicaudais e considerados significativos quando $p < 0,02$; $p < 0,05$ foi considerado como tendência.

4. RESULTADOS

4.1 Experimento 1. *Análise dos comportamentos do tipo depressivo em camundongos Suíços submetidos à tarefa de esquiava de duas vias*

Para testar se os protocolos de ECV induziriam comportamentos do tipo depressivo, grupos de Suíços foram avaliados na tarefa de esquiava ativa (baseada no paradigma de desamparo aprendido). Os critérios para inferência do desamparo não foram atingidos pelos grupos ST testados após serem submetidos aos diferentes protocolos de ECV e durante períodos distintos (Figura 7A e 7B).

Em relação aos resultados do protocolo A (Figura 7), não foram detectadas diferenças significativas para número de fugas e falhas (KW, $p > 0.05$), tão pouco para travessias [$F(2,22)=1,10$; $p > 0,05$] (Tabela 3) e latência para emissão da resposta [ANOVA, $F(2,23)=0,26$; $p > 0,05$]. Similarmente, alterações significativas foram ausentes na análise do protocolo B para frequência de fugas (MW, $p=0,50$) e falhas (MW, $p=0,82$), travessias [$T(14)=-0,82$; $p=0,61$] (Tabela 3) e latência [$T(14)=0,30$; $p=0,77$] (Figura 7).

De modo inesperado, os grupos ST7, ST14 e ST21 do protocolo C de ECV exibiram uma tendência a aumento significativo da frequência de fugas (KW, $p=0,04$; Figura 7C), redução significativa da latência média para respostas [$F(3,26)=5,18$, $p < 0,01$; Figura 7B] e ausência de diferenças para o número de falhas (KW, $p=0,07$; Figura 7A) em relação ao controle NST. Adicionalmente, o protocolo 3 não alterou o número de travessias [$F(3,26)=1,72$, $p=0,19$] (Tabela 3). Essencialmente, os grupos NST e ST dos 3 protocolos de ECV apresentaram comportamento comparável na análise do desamparo, porém o protocolo 3 induziu um aumento na reatividade dos camundongos ao evento aversivo.

Figura 7 – Análise dos comportamentos de camundongos Suíços exibidos durante a tarefa de esqui de duas vias após diferentes períodos e protocolos de estresse crônico variado (ECV)

(A) Número de falhas, (B) latência para emissão da resposta e (C) frequência de fugas exibidos pelos grupos não estressado (NST; n=11) e estressados (ST) de acordo com: protocolo A (ECV-A) por 7 (ST7; n=5) ou 14 dias (ST14; n=10); protocolo B (ECV-B) por 7 dias (ST7; n=5); protocolo C (ECV-C) por 7 (ST7; n=6), 14 (ST14; n=6) ou 21 dias (ST21; n=7). Valores estão apresentados como média±EPM. *p<0,02 (correção de Bonferroni) comparado ao grupo NST. ^ap<0,05 comparado ao grupo NST.

Tabela 3 – Resultados dos testes de esquiva ativa e suspensão pela cauda de camundongos Suíços após exposição crônica ao estresse de 7 dias

Paradigma comportamental	Medida analisada	NST (n)	Protocolo A		Protocolo B	Protocolo C			Valor de <i>p</i>
			ST7 (n)	ST14 (n)	ST7 (n)	ST7 (n)	ST14 (n)	ST21 (n)	
Tarefa de esquiva de duas vias	Frequência de travessias	3,09±0,86 (11)	1,40±0,75 (5)	3,30±0,99 (10)	3,80±0,58 (5)	3,33±1,38 (6)	5,83±1,72 (6)	2,14±0,55 (7)	>0,05
Teste de suspensão pela cauda	Tempo total de imobilidade	116,67±11,76 (9)	---	---	---	130,10±10,29 (10)	---	---	0,40
	Latência para imobilidade	73,44±6,38 (9)	---	---	---	81,60±17,89 (10)	---	---	0,69

NST, não estressado; ST7, estressado por 7 dias; ST14, estressado por 14 dias; ST21, estressado por 21 dias.

4.2 Experimento 2. Avaliação de comportamentos do tipo depressivo em camundongos Suíços submetidos ao teste de suspensão pela cauda

Para verificar se a tarefa de esquiava ativa não seria sensível às alterações comportamentais induzidas pelo protocolo de ECV, grupos experimentais independentes de Suíços foram avaliados no teste de suspensão pela cauda. Os animais ST7 não apresentaram diferenças significativas em comparação ao grupo NST para as medidas de tempo total de imobilidade [$T(17)=-0,86$; $p=0,40$]; latência para o primeiro episódio de imobilidade [$T(17)=-0,41$; $p=0,69$] (Tabela 3) e tempo de imobilidade em blocos de 2 min [blocos: $F(2,34)=57,15$; $p<0,01$; condição: $F(1,17)=0,75$; $p=0,40$; interação: $F(2,34)=0,23$; $p=0,80$] (Figura 8). Na análise em blocos de tempo, tanto o grupo NST como o ST7 exibem movimentos ativos equivalentes durante os primeiros 2 min, os quais diminuem crescente e significativamente nos blocos seguintes até que imobilidade passiva predomine.

Figura 8 – Análise dos comportamentos de camundongos Suíços exibidos durante o teste de suspensão pela cauda após serem submetidos ao **protocolo C** de estresse crônico variado

Tempos nos quais os animais permaneceram imóveis foram registrados em blocos de 2 min durante o teste para os grupos não estressado (NST; $n=9$) e estressado por 7 dias (ST7; $n=10$). Valores estão apresentados como média±EPM. [†] $p<0,05$ comparado ao bloco 0-2 min; [#] $p<0,05$ comparado ao bloco 2-4 min.

5. DISCUSSÃO

O estresse é um estado de alarme frente a um evento aversivo no qual a percepção do sujeito sobre sua habilidade de controlar a presença ou intensidade do estímulo é crucial para a magnitude dessa experiência, e para as consequências fisiológicas e comportamentais (KIM; DIAMOND, 2002). É importante destacar que os modelos de depressão aqui descritos estão fundamentados no componente de controlabilidade. Além da incontrolabilidade e imprevisibilidade do ECV, os camundongos foram expostos à situação aversiva inescapável no teste de suspensão pela cauda, enquanto que na tarefa de esquiva de duas vias os indivíduos poderiam controlar a presença do choque. Contudo, os protocolos de ECV testados em 7, 14 e 21 dias não foram suficientes para induzir déficits na aprendizagem da fuga (aumento na frequência de falhas e na latência para emissão da resposta defensiva). De modo surpreendente, os camundongos estressados apresentaram desempenho facilitado na tarefa de esquiva de duas vias do que os animais sem estresse.

Animais que foram estressados através do protocolo C de ECV foram hiper-responsivos na exposição à esquiva de duas vias, de modo que a opção de 7 dias deste protocolo foi estabelecida como padrão para os demais experimentos. Em termos de susceptibilidade, tal resultado pode estar relacionado à resiliência da linhagem. Porém, indivíduos resilientes também podem exibir más adaptações comportamentais uma vez que suas reações defensivas exacerbadas aumentam a demanda física e psicológica (RUSSO et al., 2012). Consequências opostas também foram descritas por Schweizer, Henniger e Sillaber (2009) no estudo sobre o efeito ansiolítico do ECV em camundongos DBA/20la, discutido como atípico e em resposta à novidade.

O desamparo aprendido é um paradigma utilizado em estudos de depressão validado para ratos (JOCA; PADOVAN; GUIMARÃES, 2003; SELIGMAN; BEAGLEY, 1975) e camundongos (WANG et al., 2014; CHOURBAJI et al., 2005). Nele, animais pré-expostos a choques inescapáveis nas patas desenvolvem inabilidade de esquiva e fuga em situações aversivas controláveis futuras. Murua e colaboradores (1991) propuseram a combinação de um procedimento de ECV com duração de 7 dias (que substitui a pré-exposição do modelo de desamparo aprendido) e subsequente exposição dos ratos ao teste de esquiva ativa de duas

vias. No presente estudo, entretanto, a associação dos dois modelos não foi bem sucedida em promover déficit na resposta de fuga dos Suíços testados na tarefa de esquiva ativa.

Sob condições ecologicamente normais, o controle do comportamento motor (função muscular esquelética) passará rapidamente entre o sistema de esquiva comportamental (fulga/luta/congelamento) e o sistema de inibição comportamental dependendo da direção a qual o organismo está se movendo. Em certos paradigmas específicos, como a esquiva ativa de duas vias, ambos os sistemas podem ser ativados simultaneamente. Deste modo, os fármacos ansiolíticos podem facilitar a esquiva ativa por suprimir o componente competitivo de evitação (ou esquiva passiva) (McNAUGHTON; CORR, 2004). Porém, a hiperreatividade apresentada pelos camundongos Suíços na tarefa de esquiva de duas vias representaria um comportamento do tipo ansioso facilitado pelo ECV prévio.

O teste de suspensão pela cauda é um modelo experimental de depressão com importante validade preditiva. A fim de verificar se a tarefa de esquiva de duas vias seria pouco sensível aos efeitos deletérios do ECV, grupos independentes de camundongos Suíços submetidos ao ECV e não estressados passaram pelo teste de suspensão pela cauda. Porém, a imobilidade passiva dos animais nas duas condições mencionadas foi comparável. Em contrapartida, Yoon et al. (2014) demonstraram que camundongos C57BL/6N machos expostos ao ECV durante 3 semanas, composto por estressores apenas físicos, apresentaram aumento da imobilidade no teste de suspensão pela cauda. Os mesmos autores também descreveram uma redução no ganho de peso por aqueles animais durante o período de estresse.

A suspensão pela cauda também foi aplicada para a linhagem de camundongo C57Bl/6, com o objetivo de avaliar se camundongos Suíços seriam mais resilientes do que a outra linhagem testada (APÊNDICE A). Assim como os camundongos Suíços, os animais C57Bl/6 estressados não apresentaram aumento significativo do comportamento passivo de imobilidade em comparação ao controle sem estresse. Além da suspensão pela cauda, outro teste com princípio semelhante e considerado modelo de desespero comportamental é o teste do nado forçado. Similarmente aos resultados apresentados, Schweizer, Henniger e Sillaber (2009) descreveram que 4 semanas de ECV não foram capazes induzir aumento no tempo de imobilidade durante o nado forçado pelos C57Bl/6J.

É importante entender os papéis relativos dos fatores de genéticos e ambientais, uma vez que estes últimos podem ser modificados. Contudo, as interações entre ambos os fatores dificultam a tarefa de isolar os fatores de risco (KANDEL et al., 2014). Assim, a ausência de alterações comportamentais do tipo desamparo investigadas no presente estudo pode ser consequência de (1) resiliência da linhagem Suíço, (2) duração do estresse crônico para indução específica de comportamentos do tipo depressivo.

6. CONCLUSÕES

- Os três protocolos de ECV testados não foram capazes de induzir desamparo em camundongos testados na tarefa de esquiva de duas vias.
- O protocolo de ECV composto por estressores físicos e social não causou desamparo em camundongos submetidos ao teste de suspensão pela cauda.
- O protocolo de ECV composto por estressores físicos e social induziu uma hiperresponsividade dos camundongos testados na tarefa de esquiva de duas vias.
- Sugerimos que o desempenho facilitado dos camundongos estressados na tarefa de esquiva de duas vias esteja relacionado ao comportamento do tipo ansioso.

1. INTRODUÇÃO

1.1 *Ansiedade*

A prevalência estimada dos transtornos de ansiedade desencadeados ao longo da vida é de 28,8% (KESSLER et al., 2005). Entre 2005 e 2015, a prevalência mundial dos distúrbios de ansiedade – transtorno de ansiedade generalizada, pânico, estresse pós-traumático e obsessivo-compulsivo (de acordo com o DSM-IV) – cresceu 14,9%. Cerca de 260 milhões de pessoas – 3,6% da população em todo o mundo – foram afetadas por transtornos de ansiedade em 2015; a ansiedade patológica também foi a sexta maior causa de incapacidade naquele ano (FRIEDRICH, 2017). A prevalência destes transtornos neuropsiquiátricos é particularmente alta nas Américas, sendo estimada em 9,3% no Brasil (WHO, 2017). Dado o caráter debilitante dos distúrbios de ansiedade, com substanciais consequências pessoais e econômicas, é preocupante reconhecer que uma parcela considerável dos indivíduos patologicamente ansiosos não recebe tratamento adequado.

Pouca inovação farmacoterapêutica para o tratamento dos distúrbios de ansiedade foi desenvolvida desde a década de 1940. Comparando-se a taxa de aprovação pela *Food and Drug Administration* (FDA) norte-americana de medicamentos ansiolíticos àqueles com indicação para hipertensão, nota-se um crescimento lento das aprovações de ansiolíticos, além de um número menor de novos alvos identificados para o tratamento da ansiedade patológica (KINCH et al., 2014; CALHOON; TYE, 2015). A escassez relativa de estratégias farmacológicas ansiolíticas e a eficácia relativa das drogas utilizadas na clínica revela a necessidade da compreensão mais completa dos substratos neurais da ansiedade (CALHOON; TYE, 2015).

A ansiedade é um estado emocional caracterizado tanto por experiências subjetivas, como tensão e pensamentos de preocupação, como por alterações fisiológicas do tipo suor, tontura e aumento da pressão sanguínea e ritmo cardíaco (CALHOON; TYE, 2015). Enquanto o medo é um estado emocional que ocorre agudamente frente a uma ameaça iminente real e percebida (BLANCHARD et al., 2008), a ansiedade é desencadeada por estímulos que não representam perigo imediato ou que podem ser internamente gerados (CALHOON; TYE, 2015). Embora indivíduos saudáveis apresentem episódios esporádicos de

ansiedade, a ansiedade persistente, debilitante e desproporcional em resposta a uma ameaça imediata é considerada patológica (CALHOON; TYE, 2015).

1.2 *Substrato neural da ansiedade*

A noção fundamental de que a ansiedade, ou a resposta ansiolítica, envolveria o sistema septo-hipocampal foi inicialmente sugerida por Jeffrey Gray há mais de 40 anos. A extensiva similaridade entre os efeitos comportamentais provocados por lesão hipocampal e drogas ansiolíticas clássicas deu origem ao conceito de “sistema de inibição comportamental” (SIC) (GRAY; McNAUGHTON, 2000).

De acordo com a definição de distância defensiva, a ansiedade está relacionada à uma condição de ameaça distante ou antecipada. Quando em uma situação de conflito entre aproximação e esquiva, a ansiedade tem a função de mobilizar o indivíduo em direção à fonte de perigo (BLANCHARD et al., 2008; McNAUGHTON; CORR, 2004). Nela ocorre a supressão pelo SIC de comportamentos de aproximação e esquiva defensivas, aumento da avaliação de risco e alerta, manifestações estas sensíveis a drogas ansiolíticas.

Na presença de uma fonte de perigo explícita, o “sistema cerebral aversivo” (SAC) é o substrato neural responsável pelas respostas de fuga, luta e congelamento, representativas da experiência emocional de medo. Estas reações defensivas são acompanhadas de reações neurovegetativas como aumento da pressão arterial, frequência cardíaca e respiração, micção, defecação e exoftalmia (BRANDÃO, 2012; DEAKIN; GRAEFF, 1991). Os mecanismos subjacentes ao conjunto de respostas defensivas inatas frente a estímulos aversivos são representados pelo hipotálamo medial, substância cinzenta periaquedutal (SCP) e amígdala (BRANDÃO, 2012). Este sistema é relativamente resistente à ação ansiolítica dos benzodiazepínicos, mas sensível a drogas panicolíticas (CORR, 2013; BRANDÃO, 2012).

Ameaças à sobrevivência não são as únicas fontes de aversão e esquiva; a omissão de recompensas esperadas também pode ser fonte de aversão e estresse. Tal recompensa poderia ser uma consequência de valência positiva a ser obtida. Deste modo, a aproximação defensiva não apresenta apenas o componente aversivo, mas também o apetitivo operado pelo “sistema de aproximação comportamental” (SAC). Este sistema é

ativado por estímulos apetitivos – como alimento e parceiros sexuais – (CORR, 2013), e seu substrato neuroanatômico é composto pela área tegmental ventral, estriado ventral, núcleo acumbens e córtex pré-frontal (CPF) (McNAUGHTON; CORR, 2004).

O substrato neural da ansiedade envolve, portanto, a ativação equivalente e concorrente do SCA e do SAC. Simultaneamente, há a detecção do conflito pelo SIC (Figura 9), que favorecerá o mecanismo de decisão suprimindo a aproximação (se a ameaça se provar maior que a inicialmente percebida) ou evitação (se a ameaça se provar menor) (McNAUGHTON; CORR, 2004). Finalmente, a resolução dos conflitos pelo SIC pode produzir três efeitos distintos: inibe tanto aproximação como esquiva; aumenta a tendência da esquiva em detrimento da aproximação; elicia comportamentos de avaliação de risco, aumento da vigilância e facilitação dos mecanismos atencionais (JANAK; TYE, 2015).

Figura 9 – Relação entre os sistemas de Fuga/Luta/Congelamento, de Aproximação Comportamental e de Inibição Comportamental

Os meios mais simples de acionar o BIS é a ativação simultânea do FFS e do BAS, ou seja, durante um conflito de esquiva e aproximação. Contudo, conflitos do tipo aproximação-aproximação e evitação-evitação (como na tarefa de esquiva de duas vias) também ativarão o BIS. FFS, sistemas de Fuga/Luta/Congelamento; BAS, sistema de Aproximação Comportamental; BIS, sistema de Inibição Comportamental. Fonte: McNaughton e Corr (2004).

O hipocampo atua como conferidor, comparando as informações sensoriais recebidas do córtex entorrinal com previsões geradas por estruturas límbicas que, por sua vez, integra informações de áreas cerebrais responsáveis pela elaboração de planos e programas de ação (CPF, por exemplo). Quando a comparação entre o evento ambiental

presente e a memória emocional é coerente, a resposta comportamental é exibida. Contudo, o hipocampo assume a função de controle caso haja incompatibilidade (conflito) durante o processo comparativo. Como consequência, as reações referidas ao SIC descritas anteriormente são desencadeadas, concomitante à codificação dessas informações por mecanismos mnemônicos (BRANDÃO, 2012).

A amígdala consiste de vários núcleos distintos funcional e anatomicamente (EHLISH et al., 2009). A classificação de Swanson e Petrovich (1998) para o complexo amigdalóide baseia-se na localização anatômica, origem ontogenética e arquitetura do circuito local, segregando-o em *divisão cortical*: núcleo cortical (CoA), núcleo basolateral (BLA), núcleo basomedial (BMA) e núcleo lateral (La); *divisão estriatal*: núcleo medial (MEA) e núcleo central (CeA). A descrição de outros subgrupos específicos - núcleo posterior (PA), núcleo da área amigdalóide anterior (AAA), área amigdalopiriforme (PAA), núcleo intercalado (IA) e núcleo do trato olfatório lateral (NLOT) – também é encontrada na literatura (SWANSON, 1992).

O BLA é ativado frente a experiências emocionais interpretadas como ansiedade, medo, estresse, raiva e prazer, via projeções aferentes corticais e subcorticais (KANDEL et al., 2003; ROGAN; LEDOUX, 1996). Aproximadamente 80% do BLA é composto por neurônios piramidais que contém glutamato. Esses neurônios formam sinapses com outros neurônios do BLA e formam a maioria das conexões extrínsecas, como com o CeA e o hipocampo. Os restantes 20% consistem de interneurônios GABAérgicos, que compõe a maior parte dos circuitos intrínsecos à BLA (SAH et al., 2003).

O CeA é composto pela divisão centro-lateral (CeL), centro-medial (CeM) e região capsular da amígdala central (CELC). O núcleo central é primordialmente composto de interneurônios GABAérgicos conectados aos neurônios da região estriadopalidal ventral e dorsal do cérebro. Os neurônios do CeA enviam extensas projeções para estruturas extrínsecas ao complexo amigdalóide, tais como hipotálamo e matéria cinzenta periaquedutal (DAVIS; RAINNIE; CASSELL, 1994; SAH et al., 2003).

A amígdala não só recebe informações sobre eventos “positivos” e “negativos”, mas também representa um *output* "emocional" importante para ambos. Sabe-se que, para eventos aversivos, a amígdala registra o estímulo de ameaça recebido (transmitido pelo tálamo, por exemplo) e, em seguida, ativa eferências motora e autonômica. De acordo com McNaughton e Corr (2004), a intensidade de ativação da amígdala estaria relacionada à

excitação psicofisiológica do indivíduo. Finalmente, a amígdala mantém importantes conexões anatômicas com o hipocampo – por conseguinte com o SIC – e com a substância cinzenta periaquedutal dorsal – com a qual integra o SCA. Assim, ela pode atuar como interface entre o SCA e o SIC, acionados em situações de perigo iminente e de conflito, respectivamente (BRANDÃO, 2012).

O córtex pré-frontal e a circuitaria a ele associada estão implicados nos processos atencionais, flexibilidade comportamental, tomada de decisão, organização temporal de comportamentos e, de especial interesse, na regulação da expressão e inibição dos comportamentos emocionais (COURTIN et al., 2013; DALLEY; CARDINAL; ROBBINS, 2004). Em roedores, a divisão medial do córtex pré-frontal pode ser subdividida em região dorsal, que inclui os córtices pré-central (PrC) e cingulado anterior (CgA), e região ventral composta pelos córtices pré-límbico (PrL), infralímbico (IL) e orbitomedial (OM) (DALLEY; CARDINAL; ROBBINS, 2004).

O CPF recebe aferências talâmicas e estabelece extensas conexões cortico-corticais, bem como apresenta projeções recíprocas para estruturas subcorticais, como a área tegmental ventral, amígdala, hipotálamo e hipocampo (COURTIN et al., 2013; SWANSON; PETROVICH, 1998). Adicionalmente, o córtex pré-frontal medial (CPFm) contém importante conectividade intrínseca ipsilateral: a sub-região PrL envia projeções para o CgA, enquanto que o córtex IL conecta-se tanto ao PrL como ao CgA (COURTIN et al., 2013).

1.3 Participação do sistema neural histaminérgico nos transtornos emocionais

A histamina é um mediador intercelular presente no SNC de diversos grupos de vertebrados (HAAS; PANULA, 2003). A presença do sistema neural histaminérgico (SNH) foi relatada pela primeira vez por Watanabe e colaboradores em 1983. Em 1984, o mesmo grupo de pesquisa demonstrou a precisa localização dos corpos celulares dos neurônios histaminérgicos no núcleo tuberomamilar (NTM) do hipotálamo posterior de ratos. E assim como outros sistemas aminérgicos, os neurônios histaminérgicos enviam seus axônios para essencialmente todo o SNC em mamíferos, como humanos (Figura 10A) e roedores (Figura 10B) (WATANABE et al., 1984).

Uma via ascendente de fibras histaminérgicas parte do NTM pela superfície ventral do hipotálamo em direção ao septo e bulbo olfatório, enquanto a via ascendente dorsal segue ao longo do terceiro ventrículo em direção ao tálamo, núcleos da base e amígdala. Tanto a projeção ventral como a dorsal têm como alvo hipocampo e córtex cerebral. Adicionalmente, a eferência descendente associa-se ao fascículo longitudinal medial e inerva tronco encefálico e medula espinal (WATANABE et al., 1984; SCHWARTZ et al., 1991). De especial interesse ao presente estudo, o complexo amigdalóide e o córtex cerebral recebem de moderadas a densas aferências histaminérgicas (HAAS; PANULA, 2003).

Figura 10 – O sistema neural histaminérgico e ratos: origem e projeções

(A) Neurônios histaminérgicos em humanos, cujos corpos celulares estão localizados no núcleo tuberomamilar do hipotálamo, inervam as principais áreas do sistema nervoso central, como córtex cerebral, cerebelo e medula espinhal. Fonte: Haas e Panula (2003). (B) Principais projeções histaminérgicas e distribuição de receptores de histamina no cérebro de ratos. As formas marcam os principais locais onde cada subtipo de receptor está localizado. Em áreas que têm mais de um subtipo de receptor, a forma com o maior tamanho indica o que é predominante. Acc: nucleus accumbens; Amy: amígdala, Hipot: hipotálamo, Str: estriado, SN: substância negra. Fonte: Köhler et al. (2011).

As projeções dos neurônios histaminérgicos a partir do NTM está em concordância com a ampla distribuição dos quatro subtipos de receptores metabotrópicos para histamina no SNC: H₁, H₂, H₃ e H₄ (CONNELLY et al., 2009; STRAKHOVA et al., 2009; HAAS et al., 2008). Os receptores pós-sinápticos H₁ e H₂ estão acoplados às, respectivamente, proteínas G_{q/11} e fosfolipase C, e proteínas G_s e quinase A, resultando em excitação neural ou potenciação de *inputs* excitatórios. Já o autorreceptor pré-sináptico H₃ está acoplado à

proteína $G_{i/o}$ e a canais de Ca^{2+} voltagem-dependentes, promovendo um *feedback* negativo a fim de inibir a síntese e liberação de histamina. Os receptores H_3 também estão localizados em outros neurônios como heteroreceptores que regulam a liberação de noradrenalina, acetilcolina, dopamina, glutamato e GABA (ácido γ -aminobutírico) (YANAI; TASHIRO, 2007). Finalmente, o receptor H_4 é acoplado à proteína $G_{i/o}$ e exibe similaridades molecular e farmacológica em relação ao H_3 (HAAS; SERGEEVA; SELBACH, 2008).

Figura 11 – Os neurônios histaminérgicos tuberomamilares e seus alvos

(A) Transporte e metabolismo da histamina neuronal. (B) Os autorreceptores H_3 são encontrados nos corpos celulares e axônios do neurônio tuberomamilar, bem como nas terminações axônicas de outros tipos de neurônios (em azul). Os receptores H_1 e H_2 estão localizados nos corpos celulares em todo o sistema nervoso central. H, receptor de histamina. Fonte: Haas e Panula (2003).

O aminoácido L-histidina é o precursor da histamina central. A L-histidina é internalizada através do transportador de L-aminoácidos presente na membrana plasmática de neurônios (Figura 11); já no meio intracelular, ela é convertida em histamina pela enzima L-histidina descarboxilase (SCHWARTZ et al., 1991). A histamina é, então, levada para o interior de vesículas pelo transportador de monoamina vesicular VMAT-2 (HAAS; PANULA, 2003). Na presença de um sistema de recaptção de alta afinidade, a histamina exocitada é recaptada pelo neurônio pré-sináptico (Figura 12). Alternativamente, a histamina pode ser metilada pela histamina metiltransferase (localizada pós-sinápticamente e na glia), transformada no metabólito tele-metil-histamina e inativada (HAAS; PANULA, 2003).

O nível de histamina no tecido cerebral é um pouco menor do que o de outras aminas biogênicas, mas seu *turnover* é consideravelmente rápido (na ordem de minutos) e

varia com o estado funcional (HAAS; SERGEEVA; SELBACH, 2008). Sua meia-vida – em geral, de aproximadamente 30 minutos – também varia de acordo com a atividade neuronal. Por exemplo, ratos submetidos a situações de estresse, como contenção forçada ou choque nas patas, apresentam aumento do *turnover* de histamina (SCHWARTZ et al., 1991).

Figura 12 – Modelo de uma sinapse histaminérgica

Os componentes moleculares pré- e pós-sinápticos envolvidos na síntese, liberação, sinalização e recaptação de histamina estão representados. A histamina pode ser metabolizada pela MAO (mostrada intracelularmente), bem como pela histamina metiltransferase e diamina oxidase (não mostrada). G_i e G_s, proteínas G inibitória e excitatória, respectivamente; MAO, monoamina oxidase; AC, adenilil ciclase; cAMP, monofosfato cíclico de adenosina. Fonte: Nestler, Hyman e Malenka (2009).

A histamina neural atua como neurotransmissor/neuromodulador envolvido nos comportamentos referentes ao medo, aprendizagem e memória influenciada pelas emoções. Existem também evidências de que a neurotransmissão histaminérgica aparece afetada em distúrbios de humor e da ansiedade (Figura 13). Enquanto neuromodulador, a histamina central influencia a transmissão sináptica tanto inibitória como excitatória. Seus receptores são bastante expressos no sistema límbico, de modo a regular as respostas adaptativas de defesa (BROWN; STEVENS; HAAS, 2001).

Figura 13 – Comparação de imagens cerebrais a partir da tomografia por emissão de pósitron (PET) de voluntários saudáveis e pacientes depressivos

Ensaio de ligação ao receptor H_1 (distribuição de $[^{11}C]$ -doxepina radioativa). Cérebros de indivíduos controle de (A) 23 anos e (C) 54 anos de idade. Cérebros de pacientes depressivos de (B) 26 anos e (D) 53 anos de idade. As imagens individuais de PET são mostradas em níveis talâmicos semelhantes. Uma diminuição significativa da ligação ao receptor H_1 foi observada em pacientes deprimidos ou de maneira idade-dependente em voluntários saudáveis nas regiões cerebro-corticais como córtices frontal, pré-frontal e giro cingulado. Fonte: Kano et al. (2004).

Evidências revelaram que a ansiedade avaliada em modelo de claro/escuro para camundongos, induzida por injeção intraperitoneal (i.p.) de tioperamida (antagonista- H_3) combinada com injeção central de mepiramina (antagonista- H_1), pode ser mediada pelo receptor H_1 (YUZURIHARA et al., 2000). Moghaddam e colaboradores (2008) mostraram o efeito ansiogênico da HA nas doses de 0,1 e 0,5 μ g microinfundida na BLA, verificado em modelo de labirinto em cruz elevado (LCE). Esse efeito ansiogênico pode ser revertido pela ação do antagonista H_1 , pirilamina, mas não pelo antagonista H_2 , cimetidina (ZARRINDAST et al., 2005). Esses estudos em LCE indicam a atuação do receptor H_1 na modulação da ansiedade.

A atividade de monoaminas e aminoácidos em estruturas encefálicas envolvidas na aprendizagem e memória são influenciados pelo estresse (BOWMAN; BECK; LUINE, 2003). Além de modular comportamentos relacionados à ansiedade e ao medo, a liberação de HA seria um indicador sensível de estresse (DERE et al., 2010). Ela pode induzir a secreção rápida de corticosterona via, principalmente, receptores H_1 (TSUJIMOTO et al., 1999) além de regular respostas adaptativas de defesa.

A falta ou excesso dos níveis plasmáticos de corticosterona prejudicam a formação da memória (LUPIEN et al., 2009). Como a depressão maior tem sido caracterizada por altos níveis sustentados desse glicocorticóide, a neuroplasticidade estaria prejudicada (PITTENGER; DUMAN, 2008). Sabe-se que a HA induz a secreção rápida de corticosterona via, principalmente, receptores H_1 (TSUJIMOTO et al., 1999), e a atividade de monoaminas e aminoácidos em estruturas encefálicas envolvidas na aprendizagem e memória tem influência do estresse (BOWMAN; BECK; LUINE, 2003).

Perez-García e colaboradores (1998) mostraram que a tioperamida, um antagonista dos receptores H_3 , tem efeito antidepressivo em ratos avaliados no teste de nado forçado. Assim, novos resultados acerca da neurotransmissão histaminérgica subjacente aos transtornos de humor e ansiedade patológica podem ser promissores na compreensão da neurobiologia do estresse. Nesse contexto, nossa hipótese é de que o SNH participaria desses processos revertendo os efeitos negativos do estresse. Assim, o estudo se fundamenta no efeito da LH, cuja administração eleva os níveis da histamina endógena, sobre a ansiedade de camundongos submetidos ao ECV.

1.4 Ferramentas comportamental e imunoistoquímica no estudo da ansiedade

Para os estudos sobre as bases biológicas da ansiedade em roedores, um modelo experimental amplamente utilizado é o labirinto em cruz elevado (RODGERS et al., 1996). O teste se fundamenta no conflito entre a preferência dos animais pelas áreas protegidas do aparelho – denominadas braços fechado – e sua motivação inata em explorar ambientes novos (CAROBREZ; BERTOGLIO, 2005; ESPEJO, 1997). De modo importante, o LCE tem apresentado resultados relevantes no *screening* de drogas com ação ansiolítica que reduzem o conflito entre a esquia dos espaços abertos e a exploração do novo ambiente (BRANDÃO, 2012).

Sinais tigmotáticos e visuais inatos são importantes para detecção de ameaças em roedores expostos a áreas desprotegidas. Neles, ameaças incondicionadas são transmitidas à amígdala a partir de regiões somatossensoriais e visuais do tálamo e do córtex cerebral. A amígdala retransmite esses sinais para o hipotálamo ventromedial, que se conecta com o núcleo hipotalâmico pré-mamilar. Ambos controlam as respostas autonômicas e a

secreção de hormônios do estresse pelo eixo HPA, respectivamente. E finalmente, as conexões do hipotálamo com a região dorsal da matéria cinzenta periaquedutal controlam as respostas comportamentais de medo/ansiedade.

Diversos grupos de fatores de transcrição são mediadores importantes da plasticidade neural e comportamental. Dentre eles estão as proteínas ativadoras 1 (AP-1), um grupo heterogêneo de proteínas diméricas indispensável à regulação da expressão gênica neural em resposta a estímulos extracelulares. Compõe este grupo uma família de fatores de transcrição chamada Fos, cujo membro mais amplamente caracterizado é a proteína nuclear Fos (NESTLER; HYMAN; MALENKA, 2009).

Figura 14 – Mudanças na composição dos fatores transcripcionais da família de proteínas ativadoras 1 (AP-1) ao longo do tempo

Várias ondas de proteínas Fos são induzidas por estímulos agudos nos neurônios. Fos, cuja expressão a partir do gene c-Fos é induzida mais rapidamente, degrada-se dentro de algumas horas; FosB, Δ FosB, FRA1 e FRA2, são induzidos um mais tardiamente e persistem mais do que a c-Fos. Parte do Δ FosB induzido agudamente estabiliza-se através de fosforilação, o que permite a persistência da proteína no encéfalo. Fonte: Nestler, Hyman e Malenka (2009).

A síntese da proteína Fos acontece a partir do gene de expressão imediata c-Fos, e seu produto é utilizado como marcador celular da ativação neural devido a sua indução rápida em resposta à despolarização neuronal e a múltiplos segundos mensageiros intracelulares (SAGAR; SHARP; CURRAN, 1988; CRUZ et al., 2013). Os níveis basais de RNAm e proteína Fos são baixos ou mesmo indetectáveis, porém elevam-se marcadamente a partir de estímulos específicos (Figura 14), por exemplo, ativação de receptores por neurotransmissores (MORGAN; CURRAN, 1991; SHENG; GREENBERG, 1990). Além disso, apresenta meia-vida breve, exercendo seus efeitos de modo transiente sobre a expressão de

genes alvo *downstream* que codificam proteínas do citoesqueleto, receptores e enzimas das vias neurotransmissoras (Figura 15) (CRUZ et al., 2013; NESTLER; HYMAN; MALENKA, 2009).

Figura 15 – Vias intracelulares subjacentes à regulação da expressão gênica

A estimulação de receptores por neurotransmissores, hormônios ou fatores neurotróficos ativa vias específicas de segundos mensageiros e fosforilação de proteínas, com efeitos sobre a função neuronal. Quando fatores de transcrição constitutivamente expressos, como CREB, são fosforilados por proteínas quinases, sua atividade transcricional é alterada e provoca mudanças na expressão de genes alvo específicos. Entre os genes alvo estão aqueles que codificam outros fatores da transcrição, como as proteínas da família Fos. Uma vez induzidos, esses fatores de transcrição alteram ainda a expressão de outros genes alvo. Fonte: Nestler, Hyman e Malenka (2009).

A expressão de Fos em áreas encefálicas induzida por estímulos ambientais vem sendo explorada há décadas para mapear a atividade neural. Silveira, Sandner e Graeff demonstraram em 1993 que a exposição de ratos ao LCE foi capaz de induzir e mesmo elevar o número de células Fos⁺ em núcleos talâmicos, hipotalâmicos, amigdalóides (BLA, MEA e CoA) e da SCP (dorsocentral) em comparação ao controle. Devido às possíveis implicações clínicas das disfunções neuropsiquiátricas, inúmeros estudos em animais têm sido realizados nas últimas décadas a fim de esclarecer o papel preciso de regiões encefálicas na modulação do comportamento de ansiedade/medo.

2. OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Investigar se o Sistema Neural Histaminérgico está envolvido no processamento de comportamentos emocionais de camundongos susceptíveis ao estresse crônico variado.

2.2 Objetivos específicos

- i. Avaliar se o estresse crônico variado é capaz de induzir comportamentos do tipo ansioso em duas linhagens distintas de camundongos: Suíços e C57Bl/6.
- ii. Comparar o desempenho das duas linhagens de camundongos testadas, optando pela mais susceptível ao estresse crônico variado.
- iii. Analisar se a injeção sistêmica do precursor histaminérgico, L-histidina, reverte o efeito ansiogênico induzido pelo estresse crônico imprevisível.
- iv. Identificar o substrato neural envolvido no processamento da ansiedade induzida pelo estresse crônico variado.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Animais

Foram utilizadas 2 linhagens distintas de camundongos *Mus musculus*, todos machos, conforme descrição a seguir:

- a. camundongos Suíço-albinos (Figura 1A), com idade de 5, 8 ou 11 semanas durante o início do protocolo de estresse crônico e fornecidos pelo Biotério Central da Universidade Federal de São Carlos (UFSCar), *campus* São Carlos
- b. camundongos C57Bl/6 (Figura 1B), com 8 semanas de idade durante o início do protocolo de estresse crônico e provenientes do Biotério Central da Universidade de São Paulo (USP), *campus* Ribeirão Preto

Figura 16 – Exemplos das linhagens de Suíço e C57Bl/6

(A) Indivíduos das linhagens *outbred* (ou não-consanguíneo) de Suíços e (B) *inbred* (ou consanguíneo) C57Bl/6. Fonte da imagem do camundongo C57Bl/6: Boguski (2002).

Os camundongos foram alojados no biotério experimental do Laboratório de Neurociências por, no mínimo, 3 semanas prévias ao início dos procedimentos. As condições de alojamento destes animais seguem as mesmas descritas no item 3.1 do Capítulo 1. Os experimentos foram realizados sob aprovação da Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA-UFSCar; protocolo nº 044/13) (ANEXO) e conforme as normas especificadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA).

3.2 Droga

Para o tratamento farmacológico crônico, monoclórato de L-histidina monohidratado (Sigma-Aldrich) – aminoácido precursor da síntese de histamina – foi diluído

em solução salina estéril 0,9% (SAL) para obtenção da dose de 500 mg/kg (DAHER; MATTIOLI, 2015; CANTO-DE-SOUZA et al., 2015; SERAFIM et al., 2010). As injeções em volume de 2 ml por kg/massa corpórea do animal foram administradas intraperitonealmente (i.p.). Grupos controle para o tratamento farmacológico receberam injeção de SAL (veículo) no volume mencionado.

3.3 Anestesia e eutanásia

Para o procedimento anestésico, cloridrato de xilasina (Anasedan® injetável) e cloridrato de ketamina (Dopalen® injetável) nas doses de 5 mg/kg e 50 mg/kg (NASEHI et al., 2011), respectivamente, foram diluídos em SAL 0,9%. As injeções i.p. foram realizadas em volume de 10 ml por kg/massa corpórea do animal.

Quando aplicável, os camundongos foram profundamente anestesiados com sobredose de solução anestésica (aproximadamente o dobro da dose recomendada: 10 mg/kg de xilasina e 100 mg/kg de ketamina). Em seguida, os animais foram submetidos à eutanásia por perfusão transcardíaca com fixador histológico.

3.4 Equipamentos e procedimentos

3.4.1 Estresse crônico variado

Uma vez que o protocolo **C** foi eficiente em induzir alterações comportamentais descritas no estudo de padronização do ECV – seção 3.3.1 do Capítulo 1 – este protocolo foi utilizado para os experimentos a seguir. Brevemente, o ECV consistiu na exposição diária dos camundongos a estressores distintos do protocolo **C** (**Tabela 1**, Capítulo 1), de modo semi-randômico, entre 08:00 e 13:00 (com exceção da gaiola inclinada, privações hídrica e alimentar, e isolamento social, que se estenderam pela fase escura). Os camundongos que não foram submetidos ao ECV permaneceram durante todo o período no biotério experimental.

Ao final, os grupos experimentais foram nomeados de acordo com a condição e o período de ECV: **NST**, grupo **não estressado** ou controle; **ST7**, grupo **estressado** ao longo

de **7 dias**; **ST14**, grupo **estressado** ao longo de **14 dias**. Como parâmetro biométrico para os efeitos do estresse crônico, os pesos dos animais foram registrados semanalmente.

3.4.2 *Labirinto em cruz elevado*

O labirinto em cruz elevado (LCE) é um modelo experimental amplamente utilizado em estudos de ansiedade em roedores (LISTER, 1987). Constituído de acrílico cinza claro, o aparato consiste em dois braços abertos (30×5×0,25 cm) e dois braços fechados com paredes opacas (30×5×15,5 cm), todos eles unidos a uma plataforma central (5×5 cm), e elevado a uma altura de 38,5 cm do solo por um suporte. Ao longo de todo o perímetro dos braços abertos existe uma fina borda na espessura de 0,25 cm. A luminosidade presente no centro do LCE foi de 120 lux.

Os camundongos foram gentilmente posicionados sobre a plataforma central do LCE com a face voltada para o braço aberto e tiveram 5 min de livre exploração no aparato. Após o teste, o animal foi colocado na gaiola moradia e levado ao biotério experimental. Entre as exposições dos diferentes animais foi efetuada a limpeza do LCE com algodão umedecido em álcool a 5% e, em seguida, seco com papel toalha. Os testes foram registrados por um sistema de gravação (GeoVision GV-600 System), através de uma câmera posicionada sobre o equipamento e conectada a um computador adjacente para armazenamento das imagens.

3.4.3 *Comportamentos analisados na exposição ao labirinto em cruz elevado*

Os registros comportamentais foram identificados por um experimentador treinado e quantificados através do software X-Plot-Rat 1.1.0 (GARCIA et al, 2005). De acordo com as categorias descritas por Rodgers e Johnson (1995), as medidas convencionais analisadas foram:

- a. Frequência de entradas nos braços abertos (EBA) e fechados (EBF)
- b. Tempo gasto nos braços abertos (TBA) e fechados (TBF)
- c. Tempo gasto na plataforma central (TC)
- d. Frequência total de entradas (TE).

As entradas foram consideradas quando o animal teve suas quatro patas no braço ou na plataforma central do LCE (LISTER, 1987). Os valores absolutos das medidas anteriormente citadas foram utilizados para o cálculo das porcentagens de:

- a. Entradas nos braços abertos [%EBA = (entradas nos braços abertos/ TE) × 100]
- b. Tempo gasto nos braços abertos, fechados e centro [%TBA, %TBF ou %TC = (tempo nos braços abertos, fechados ou centro/ 300) × 100].

Quanto às medidas complementares (RODGERS; JOHNSON, 1995), foram quantificadas as frequências de:

- a. Esticadas (Est), que se refere à postura exploratória de alongação do corpo do animal para frente seguida por retração à posição original
- b. Mergulhos (Merg), caracterizado por movimento exploratório da cabeça e ombros do roedor sobre as laterais do LCE e em direção ao solo
- c. Levantar (Lev), quando o animal exibe uma postura ereta iniciada pelo movimento vertical das patas anteriores amparadas contra a parede da área cercada

Tendo em vista a importância das pistas tigmotáticas para os padrões de exploração no LCE, mergulhos e esticadas foram diferenciados de acordo com a área do labirinto em que eles foram exibidos. Os braços fechados e a plataforma central, juntos, foram considerados áreas protegidas (p) – aquelas que oferecem relativa segurança ao roedor – enquanto que os braços abertos foram designados áreas desprotegidas (d). Com base nos estudos de Rodgers e Johnson (1995), e Walf e Frye (2007), a diminuição das atividades nos braços abertos caracterizou o estado ansiogênico dos camundongos, enquanto que as EBF e o TE foram medidas da atividade locomotora geral.

3.4.4 Ensaio imunoistoquímico de Fos

Entre 90 a 120 min após o teste comportamental (SILVEIRA; SANDNER; GRAEFF, 1993), os camundongos foram profundamente anestesiados com sobredose de xilasina e ketamina, e passaram por perfusão transcardíaca com solução salina tamponada com fosfato (PBS), seguida por paraformaldeído 4%. Os encéfalos removidos foram pós-fixados em paraformaldeído 4% por 2 h e transferidos para solução de sacarose 30% em PBS

a 4°C. Após 2 dias, os encéfalos foram congelados em gelo seco em pó durante 1 h e depois armazenados em *freezer* a -80°C até o momento da secção.

Foram feitas fatias coronais de 35 µm de espessura em micrótomo-criostato (Leica CM1860). As secções foram coletadas em triplicata e continham as seguintes regiões encefálicas de interesse: córtex pré-frontal medial, hipocampo dorsal, complexo amigdalóide e matéria cinzenta periaquedutal. Secções encefálicas de camundongos submetidos a convulsão induzida por injeção i.p. de pentilenotetrazol (10 mg/kg) foram utilizados como controle positivo. Secções de todos os grupos experimentais e controle foram simultaneamente ensaiadas utilizando as mesmas soluções reagentes.

As fatias foram lavadas 3 vezes (10 min/lavagem) em PBS e incubadas em solução bloqueadora (soro de cabra 3% e Triton X-100 0,25% dissolvidos em PBS) durante 1 h à temperatura ambiente. Após o bloqueio, as secções foram incubadas com anticorpo anti-Fos (diluição 1:2000; Cell Signaling Technology, Danvers, MA, EUA; produzido em coelho) em solução bloqueadora à 4°C e sob agitação durante 24 h. Em seguida, as secções foram lavadas com PBS por 3 vezes (10 min cada lavagem) e incubadas com anticorpo secundário biotilado anti-coelho (diluição 1:400; Vector Laboratories, Burlingame, CA, EUA) em PBS-Tx (Triton X-100 0,25%) e soro de cabra 3%, à temperatura ambiente e sob agitação por 2 h. Em seguida, as fatias foram lavadas com PBS por 3 vezes (10 min/lavagem) e incubadas sob agitação por 1 h em solução de avidina-biotina-peroxidase (ABC Elite kit, PK-6100; Vector Laboratories, Burlingame, CA, EUA), Triton X-100 0,5% e PBS. Na sequência, as fatias foram lavadas 3 vezes (10 min cada lavagem) e incubadas, sob agitação, em solução contendo o cromógeno 3,3'-diaminobenzidina (DAB) por aproximadamente 8 min. Este procedimento produziu, em geral, baixa coloração inespecífica; as células consideradas marcadas para Fos (positivas ou Fos⁺) apresentaram núcleo mais escuro que o plano de fundo, em intensidades baixas a altas de marrom.

Finalmente, as amostras foram lavadas 4 vezes (5 min cada lavagem), transferidas para solução de PBS e montadas sobre lâminas gelatinizadas. Após a secagem, as lâminas foram hidratadas em água destilada e, em seguida, desidratadas em gradiente seriado de titulações crescentes de etanol (30%, 60%, 90%, 95% e 100%) e clarificadas em xilol (LabSynth, São Paulo, Brasil). Por fim, as secções foram cobertas com Permount (Sigma-Aldrich, St. Louis, MA, EUA) e lamínulas.

3.4.5 Quantificação de células imunorreativas para Fos

As fotomicrografias de secções anatomicamente correspondentes entre os diferentes grupos experimentais foram capturadas através de uma câmera acoplada ao microscópio de luz (Zeiss Axioskop 2, Jena, Alemanha) a um aumento de 100×. O software ImageJ 1.51j8 (National Institutes of Health, EUA) foi utilizado para configuração dos limiares de seleção e contagem das células com núcleos imunopositivos para Fos presentes nos sítios de interesse. Os limites das áreas histológicas alvo de quantificação foram definidos de acordo com o atlas de Paxinos e Franklin (2001). Quatro a 5 secções por sítio de interesse por animal foram quantificadas e as secções eram espaçadas entre si em 70 µm (1 fatia examinada a cada 3 subsequentes). As contagens uni ou bilaterais das 4-5 secções foram normalizadas a uma área de 0,1 mm² (ALBRECHET-SOUZA; BORELLI; BRANDÃO, 2008) e tiveram seu valor médio calculado para cada animal. O número de Fos⁺/0,1 mm² da respectiva área histológica definida representa a média±EPM de 4-6 animais por grupo experimental. Os níveis e tamanhos aproximados das áreas analisadas ao longo do eixo anteroposterior tiveram como referência o bregma (em mm) do atlas de Paxinos e Franklin (2001).

3.4.6 Desenhos experimentais

Após a última sessão de estresse, os animais foram levados em suas gaiolas-moradia do biotério experimental para a sala de testes, onde permaneceram de 30 a 60 min prévios ao teste para habituação ao local. Os testes comportamentais foram realizados durante a fase clara do ciclo, entre 8:00 e 13:00.

3.4.6.1 Experimento 1. *Análise dos comportamentos do tipo ansioso em camundongos Suíços submetidos ao estresse crônico variado*

Grupos independentes de camundongos Suíços foram avaliados quanto à idade e período de ECV. Tanto animais não estressados como estressados foram expostos ao LCE. Ao final, 8 grupos experimentais foram formados:

- Grupo **ST7** (n=9) com 5 semanas de idade durante o início de ECV (dia pós-natal 35 ou P35) e respectivo grupo **NST** (n=8).
- Grupos **ST7** (n=14) e **ST14** (n=9) com 8 semanas de idade durante o início de ECV (P56) e respectivos grupos **NST** (n=14; n=8).
- Grupo **ST7** (n=12) com 11 semanas de idade durante o início de ECV (P77) e respectivo grupo **NST** (n=10).

3.4.6.2 Experimento 2. *Análise dos comportamentos do tipo ansioso em camundongos C57Bl/6 submetidos ao estresse crônico variado*

Tendo em vista os resultados do Experimento 1 e o efeito ansiogênico provocado pelo ECV relatado por Campos et al. (2013), o Experimento 2 foi realizado testando apenas uma idade de camundongos C57Bl/6 e estressados por 14 dias. Os camundongos não estressados e estressados foram, então, expostos ao LCE. Assim, os seguintes grupos independentes de animais foram avaliados:

- Grupo **NST** (n=12)
- Grupo **ST14** (n=12) com 8 semanas de idade durante o início de ECV

3.4.6.3 Experimento 3. *Efeitos do tratamento crônico de L-histidina na ansiedade induzida pelo estresse crônico variado em camundongos C57Bl/6*

Neste experimento, camundongos C57Bl/6 receberam injeções i.p. diárias de SAL ou LH 2 h depois de finalizada a sessão de estresse (entre 12:00 e 14:00). No caso dos grupos não estressados, o tratamento foi pareado ao momento de injeção dos animais ST. No décimo quinto dia do período experimental, animais não estressados e estressados foram submetidos ao LCE (Figura 17). Finalmente, 4 grupos foram formados de acordo com a condição e tratamento crônico:

- Grupo **NST-SAL** (n=10)
- Grupo **NST-LH** (n=9)
- Grupo **ST14-SAL** (n=10)
- Grupo **ST14-LH** (n=9)

Imediatamente após o teste comportamental, os animais foram levados ao biotério experimental e permaneceram nas suas gaiolas-moradia até o procedimento de anestesia e perfusão transcárdica.

3.4.6.4 Experimento 4. *Medida indireta da atividade neural de camundongos C57Bl/6 expostos ao labirinto em cruz elevado após estresse e tratamento crônicos*

Os camundongos C57Bl/6 provenientes dos 4 grupos testados no Experimento 3 foram anestesiados, perfundidos e tiveram seus encéfalos processados para análise imunoistoquímica de Fos (Figura 17). Cada grupo do presente experimento apresenta n=4-6.

Figura 17 – Desenho experimental sobre os efeitos do estresse e/ou L-histidina crônicos na ansiedade e expressão de Fos

3.5 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Todos os dados apresentados nas tabelas e figuras estão expressos em média $\pm$ erro padrão da média (EPM). *Outliers* estatisticamente significativos foram determinados pelo teste de Grubbs. A distribuição dos dados e a homogeneidade de variância foram analisados através do teste de Levene.

- *Experimento 1:* As comparações entre grupos foram realizadas através do teste t de Student ou Teste U de Mann-Whitney para grupos independentes. ANOVA de duas vias com medidas repetidas para a análise do peso [fatores condição (não estresse $\times$ estresse) e dia do registro do peso (dia 1 $\times$ dia 8 $\times$ dia 15)].
- *Experimento 2:* As comparações entre grupos foram realizadas através do teste t de Student para grupos independentes. ANOVA de duas vias com medidas repetidas para a análise do peso [fatores condição (não estresse $\times$ estresse) e dia do registro do peso (dia 1 $\times$ dia 8 $\times$ dia 15)].
- *Experimento 3:* ANOVA fatorial de duas vias [fator condição (não estresse $\times$ estresse) e fator tratamento (SAL $\times$ LH)] foram utilizadas para análise de dados com distribuição normal; teste de Kruskal-Wallis para dados sem distribuição normal. ANOVA de três vias com medidas repetidas para a análise do peso [fatores condição, tratamento e dia do registro do peso (dia 1 $\times$ dia 8 $\times$ dia 15)].
- *Experimento 4:* ANOVA fatorial de duas vias [fator condição (não estresse $\times$ estresse) e fator tratamento (SAL $\times$ LH)]; teste de Kruskal-Wallis para dados sem distribuição normal.

Após detectadas diferenças, a análise prosseguiu com o teste *post-hoc* de comparações múltiplas de Duncan ou teste de Dunn. Todas as análises foram realizadas através do software Statistica 8.0 (StatSoft. Inc., EUA). Os valores de p são bicaudais e considerados significativos quando $p \leq 0,05$.

4 RESULTADOS

4.1 Experimento 1. *Estresse crônico variado interfere em parâmetro biométrico e atividade locomotora, mas não na ansiedade, de camundongos Suíços*

A hiper-reatividade dos camundongos Suíços, interpretada a partir do seu desempenho na tarefa de esquiva de duas vias (Capítulo 1), foi investigada como possível resposta de ansiedade. Para testar a hipótese de que a exposição crônica a estressores diversos causa alterações nas reações características de ansiedade, grupos independentes de camundongos da linhagem Suíço passaram pelo ECV e tiveram seus comportamentos avaliados no LCE. Uma vez que a fase do desenvolvimento na qual se aplica o estresse é crucial para o aparecimento de respostas emocionais atípicas (RICON et al., 2012), camundongos Suíços em P35, P56 e P77 (5, 8 e 11 semanas de idade, respectivamente) no início de ECV foram analisados no presente experimento.

Na análise comparativa entre os grupos de camundongos Suíços cronicamente estressados a partir de P35 e respectivo controle, a medida convencional EBF (Figura 18B) aumentou significativamente nos animais ST em relação aos NST [teste de Mann-Whitney; $U(15)=12,50$; $p=0,03$]. Semelhante aumento estatisticamente significativo foi também detectado no TE e exibido pelo grupo ST em relação ao controle [teste t de Student; $T(15)=-3,46$; $p<0,01$]. Esses resultados sugerem uma hiperlocomoção dos camundongos adolescentes ST induzida pelo estresse crônico variado ao longo de 7 dias.

O teste t de Student não revelou diferenças significativas na comparação entre os grupos NST e ST para os parâmetros relativos ao comportamento ansioso: %EBA [$T(15)=-0,25$; $p=0,80$]; %TBA [$T(15)=-1,11$; $p=0,28$] e TBA [$T(15)=-1,11$; $p=0,28$] (Figura 18A). Apesar da tendência à diferença significativa na análise de EBA [$T(15)=-1,84$; $p=0,08$], o relativo aumento da frequência de entradas nos braços abertos pelo grupo ST seria resultante da hiperatividade induzida pelo ECV. Assim, a exploração das áreas desprotegidas do LCE (%EBA, %TBA e TBA) foi comparável entre os animais controle e estressados, sugerindo que o ECV testado não altera as respostas de ansiedade eliciadas no labirinto.

De maneira complementar aos resultados anteriores, a %TBF não foi afetada pela condição ECV [$T(15)=-1,76$; $p=0,10$] (Tabela 4); contudo, uma redução significativa da %TC

foi apontada para os camundongos ST em relação ao grupo NST [$T(15)=2,94$; $p=0,01$]. Na análise fatorial de Rodgers e Johnson (1995), a medida espaço-temporal %TC indica o nível de conflito entre aproximação e esquiva, relacionado à tomada de decisão exibida pelo roedor na plataforma central. No presente estudo, a %TC diminuída acompanhada da %TBF inalterada nos sujeitos ST sugere que estes animais exploram o LCE influenciados majoritariamente pela hiperlocomção e, em menor grau, pela ameaça potencial ambígua do modelo.

Adicionalmente, as medidas complementares foram analisadas através do teste t de Student ou do teste de Mann-Whitney (Tabela 5). A frequência total de levantar, referente à atividade vertical dos roedores, foi significativamente maior no grupo ST do que no controle NST [$T(15)=-2,81$; $p=0,01$]. Esse resultado corrobora a interpretação de que o ECV testado interfere na hiperatividade motora geral de camundongos adolescentes ST. Não houve diferenças significativas na comparação entre os grupos experimentais de P35 para os parâmetros comportamentais de %pMerg [$T(15)=0,39$; $p=0,70$]; total de Merg [$T(15)=-0,63$; $p=0,53$]; %pEst [$U(15)=18,00$; $p=0,09$] e total de Est [$T(15)=0,28$; $p=0,78$].

O peso dos roedores pode ser um parâmetro biométrico sensível aos efeitos deletérios do estresse prolongado. Nesse sentido, os pesos dos camundongos submetidos ao ECV a partir de P35 e seu respectivo controle foram analisados pela ANOVA de duas. De acordo com o teste estatístico, foram considerados significativamente diferentes os fatores: dia no qual os animais foram pesados [$F(1,15)=41,30$; $p<0,01$] e condição a que foram expostos [$F(1,15)=4,81$; $p=0,04$], bem como a interação entre eles [$F(1,15)=35,61$; $p<0,01$]. Na comparação entre os dias 1 e 8, o grupo NST ganhou peso ao longo do período experimental (teste de Duncan; $p<0,01$), ao contrário do grupo ST ($p=0,75$) (Tabela 6). Além disso, o peso médio dos animais ST foi menor do que o registrado para o NST ao final de ECV (dia 8; $p<0,01$). Esses resultados sugerem que o protocolo de ECV testado interfere no ganho de peso dos camundongos estressados durante a adolescência.

Figura 18 – Análise comportamental da ansiedade de camundongos Suíços em P35, P56 e P77 no início do regime de estresse crônico variável de 7 dias

Porcentagens de entradas (%EBA) e de tempo nos braços abertos (%TBA) do labirinto em cruz elevado, bem como entradas nos braços fechados (EBF), foram analisados para os grupos não estressado (NST) e estressado por 7 dias (ST7). Os painéis representam as medidas quantificadas dos camundongos Suíços em (A, B) P35; (C, D) P56 e (E, F) P77 no início de ECV. Barras estão apresentadas como média±EPM. * $p \leq 0,05$ comparado ao grupo NST.

Para os camundongos Suíços cronicamente estressados a partir de P56 (ST) e respectivo controle (NST), o teste t de Student não indicou diferenças significativas entre os grupos experimentais nas análises de EBF [T(26)=-0,62; p=0,54] e TE [T(26)=-0,18; p=0,86] (Figura 18D). O mesmo teste estatístico ainda revelou ausência de diferenças significativas para as porcentagens de EBA [T(26)=0,87; p=0,39] e TBA [T(26)=0,94; p=0,35] (Figura 18C). Semelhante ausência de efeito do ECV foi apontado nas frequências de EBA [T(26)=0,72; p=0,48] e TBA [T(26)=0,94; p=0,35]. Esses resultados sugerem que, no LCE, tanto a atividade locomotora como os comportamentos relativos à ansiedade dos animais ST não foram alterados pelo protocolo de ECV testado.

Adicionalmente, o estresse crônico não influenciou as demais medidas convencionais analisadas através do teste t de Student (Tabela 4): %TBF [T(26)=-1,25; p=0,22] e %TC [T(26)=1,12; p=0,27]. Não houve diferenças significativas para os parâmetros complementares (Tabela 5): pMerg [T(26)=-1,32; p=0,20]; total de Merg [T(26)=-0,84; p=0,40]; pEst [T(26)=1,50; p=0,14]; %pEst [T(26)=-0,57; p=0,57] e total de Lev [T(26)=-0,58; p=0,57]. Contudo, o grupo ST aumentou significativamente sua %pMerg quando comparado à condição NST pelo teste de Mann-Whitney [U(26)=46,50; p=0,02], sugerindo um efeito do tipo ansiogênico apenas para esta medida. O mesmo grupo ST tendeu à redução do total de Est [T(26)=1,84; p=0,08] em relação ao controle NST, considerado um comportamento de avaliação de risco. Apesar da ausência de diferenças entre grupos para as medidas convencionais, o total de Est e, particularmente, a %pMerg dos camundongos jovens adultos foram sensíveis ao ECV.

Diferenças estatisticamente significativas na análise dos pesos dos camundongos submetidos ou não ao ECV em P56 foram identificadas pela ANOVA. Para o fator dia [F(1,26)=21,87; p<0,01], apenas o grupo NST apresentou ganho de peso ao longo do período experimental (dia 1 × dia 8; p<0,01) (Tabela 6). Para o fator condição F(1,26)=4,25; p=0,05], o grupo ST teve peso reduzido quando comparado ao grupo NST no dia 8 (p=0,02). A ANOVA de duas vias ainda indicou interação entre os fatores significativamente diferente [F(1,26)=9,51; p<0,01], sugerindo que a condição estresse interfere no ganho de peso dos camundongos ao longo dos 7 dias de protocolo crônico.

A análise estatística dos comportamentos exibidos pelos Suíços em P77 expostos ao LCE foi realizada através do teste t de Student. Não houve diferença

estatisticamente significativa na comparação entre os grupos NST e ST para os resultados da medida convencional EBF [T(20)=-0,97; p=0,35] e TE [T(20)=-0,55; p=0,58] (Figura 18F). Essa ausência de diferença sugere ausência de alteração na atividade locomotora dos sujeitos experimentais nas duas condições avaliadas. Também não foram registradas diferenças significativas para as medidas convencionais de %EBA [T(20)=0,45; p=0,66]; %TBA [T(20)=1,00; p=0,33] (Figura 18E); EBA [T(20)=0,41; p=0,68] e TBA [T(20)=1,00; p=0,33] (Tabela 4). Com base nestes dados, o estado de ansiedade dos camundongos adultos ST não foi alterado pelo regime de ECV.

Não houve diferenças significativas na comparação entre grupos para as demais medidas convencionais e complementares analisadas: %TBF [T(20)=-1,70; p=0,10]; %TC [T(20)=1,64; p=0,12] (Tabela 4); %pMerg [T(20)=1,33; p=0,20]; total de Merg [T(20)=0,47; p=0,64]; %pEst [T(20)=-1,40; p=0,18]; total de Est [T(20)=0,38; p=0,71] e total de Lev [T(20)=-0,47; p=0,64] (Tabela 5). A ausência de diferença significativa para esses parâmetros corrobora a interpretação de que o estresse prolongado testado não afeta os comportamentos dos camundongos Suíços adultos avaliados no LCE.

Entretanto, o peso médio dos animais adultos registrado no início e fim do período de ECV foi diferente de acordo com o teste ANOVA [fator dia F(1,20)=8,70; p<0,01]. Houve redução do peso no grupo ST entre os dias 1 e 8 do período experimental (teste de Duncan; p<0,01), enquanto que o peso médio do grupo NST se manteve estável (p=0,83) (Tabela 6). De modo importante, a condição estresse × não estresse em conjunto à interação significativa entre os fatores [F(1,20)=6,97; p=0,02] influenciaram no ganho de peso dos animais [F(1,20)=5,17; p=0,03]. Assim, o grupo ST registrou peso menor do que o controle NST ao final de ECV (dia 8; p=0,02).

A fim de investigar se a extensão do protocolo de ECV induziria mudanças no perfil ansioso dos camundongos Suíços, indivíduos desta linhagem em P56 foram submetidos ao estresse crônico durante 14 dias e posteriormente expostos ao LCE. Os resultados desse experimento foram analisados através do teste t de Student, que não detectou diferenças significativas entre os grupos NST e ST para as seguintes medidas convencionais: EBF [T(15)=0,82; p=0,43]; TE [T(15)=0,24; p=0,81]; %EBA [T(15)=-1,87; p=0,08]; %TBA [T(15)=0,42; p=0,53] (Figura 19); EBA [T(15)=-0,94; p=0,36]; TBA [T(15)=-1,33; p=0,20]; %TBF [T(15)=1,15; p=0,27]; e %TC [T(15)=-0,78; p=0,45] (Tabela 4). Também não foram identificadas diferenças

estatisticamente significativas para os parâmetros complementares de %pMerg [T(15)=0,10; $p=0,92$]; total de Merg [T(15)=-0,73; $p=0,47$]; %pEst [T(15)=0,58; $p=0,57$]; total de Est [T(15)=0,70; $p=0,50$] e total de Lev [T(15)=0,66; $p=0,52$] (Tabela 5). Assim, os resultados apresentados sugerem que a apresentação diária de estressores diversos durante duas semanas aos camundongos jovens adultos Suíços não afeta a atividade locomotora e comportamentos do tipo ansioso eliciados no LCE.

Figura 19 – Análise comportamental da ansiedade de camundongos Suíços e C57Bl/6 em P56 no início do regime de estresse crônico variável de 14 dias

Porcentagens de entradas (%EBA) e de tempo nos braços abertos (%TBA) do labirinto em cruz elevado, bem como entradas nos braços fechados (EBF), foram analisados para os grupos não estressado (NST) e estressado por 14 dias (ST14). Os painéis representam as medidas quantificadas de camundongos da linhagem de (A, B) Suíços e de (C, D) C57Bl/6. Barras estão apresentadas como média±EPM. * $p \leq 0,05$ comparado ao grupo NST.

Contudo, as medidas de peso destes animais foram sensíveis ao ECV prolongado conforme apontado pela ANOVA (Tabela 6). O fator dia foi significativamente diferente [$F(1,15)=328,01$; $p<0,01$] na comparação entre os pesos registrados no início e final de ECV. Tanto o grupo NST como ST tiveram aumento de peso registrado no dia 8 em relação ao dia 1 (teste de Duncan; $p<0,01$). Além disso, a interação entre os fatores dia e condição foi diferente entre os grupos NST e ST [$F(1,15)=125,42$; $p<0,01$]. Deste modo, o peso médio registrado para os animais NST e ST no dia 1 não difere, porém passa a ser menor para o grupo ST do que para camundongos NST no dia 8 (teste de Duncan; $p=0,03$). Esses resultados indicam que o ECV interfere no ganho de peso dos camundongos jovens adultos ao longo dos 14 dias, mas não o impede ou induz perda. Finalmente, o fator condição não foi significativamente diferente [$F(1,15)=0,57$; $p=0,46$].

Para todos os grupos de Suíços na condição não estresse (NST) testados, a observação dos dados brutos referentes às atividades nos braços abertos indicou a presença de indivíduos que naturalmente não exploram as áreas desprotegidas do LCE. Vinte e cinco por cento dos camundongos NST com início do período experimental em P35 não apresentaram atividade exploratória nos braços abertos. Além destes, aproximadamente 36%, 42% e 50% dos animais naive com início do período experimental em P56, P77 e P56 (ECV de 14 dias), respectivamente, não entraram nos braços abertos do labirinto. Esses camundongos foram incluídos nas análises finais. Assim, a distribuição intragrupo de NST baseada nos dados de EBA, TBA e suas porcentagens sugere um perfil comportamental especialmente heterogêneo da linhagem estudada. Tal característica da população exigiria um tamanho amostral maior para se atingir um subgrupo suficiente de indivíduos com níveis basais esperados de exploração do LCE.

Tabela 4 – Comportamentos exibidos por camundongos durante a exploração do labirinto em cruz elevado (LCE), variando em idade durante o início do estresse crônico variado (ECV), período do ECV e linhagem

Linhagem	Idade no início do ECV (dia pós-natal)	Período de ECV (dias)	Medidas convencionais	NST (n)	ST (n)	Valor de p^a
Suíço	P35	07	TE (#)	8,13±1,17 (8)	12,44±0,56 (9)	<0,01
			EBA (#)	1,38±0,38	2,56±0,50	n.s.
			TBA (s)	15,30±4,26	23,05±5,37	
			%TBF	67,59±4,20	76,37±2,86	
			%TC	27,31±3,24	15,95±2,24	0,01
Suíço	P56	07	TE (#)	8,21±1,03 (14)	8,43±0,58 (14)	n.s.
			EBA (#)	1,50±0,42	1,14±0,27	
			TBA (s)	15,98±4,91	10,69±2,70	
			%TBF	72,79±3,61	77,69±1,55	
			%TC	21,88±2,57	18,75±1,12	
Suíço	P77	07	TE (#)	8,83±1,01 (12)	9,70±1,21 (10)	n.s.
			EBA (#)	1,58±0,53	1,30±0,40	
			TBA (s)	18,28±6,30	10,60±3,68	
			%TBF	67,61±4,86	77,43±2,42	
			%TC	26,30±3,69	19,03±1,92	
Suíço	P56	14	TE (#)	11,00±1,40 (8)	10,56±1,19 (9)	n.s.
			EBA (#)	1,12±0,61	1,78±0,36	
			TBA (s)	9,50±4,50	17,56±4,09	
			%TBF	75,69±3,09	70,30±3,43	
			%TC	21,14±2,47	23,85±2,42	
C57Bl/6	P56	14	TE (#)	15,75±1,34 (12)	12,58±1,41 (12)	n.s.
			EBA (#)	5,25±0,92	2,67±0,53	0,02
			TBA (s)	48,35±8,96	24,02±5,28	0,03
			%TBF	55,55±10,88	72,93±3,76	<0,01
			%TC	28,33±1,93	19,07±2,65	<0,01

EBA, frequência de entradas nos braços abertos; TBA, tempo gasto nos braços abertos; TE, total de entradas; %TBF, porcentagem de tempo gasto nos braços fechados; %TC, porcentagem de tempo gasto na plataforma central. ^a Resultado estatístico obtido através do Teste t de Student. n.t., não testado. n.s., não significativo.

Tabela 5 – Comportamentos exibidos por camundongos durante a exploração do labirinto em cruz elevado (LCE), variando em idade durante o início do estresse crônico variado (ECV), período do ECV e linhagem

Linhagem	Idade no início do ECV (dia pós-natal)	Período de ECV (dias)	Medidas complementares	NST (n)	ST (n)	Valor de p^a
Suíço	P35	07	pEst (%)	90,42±3,64 (8)	72,22±8,22 (9)	n.s.
			pMerg (%)	75,00±16,37	66,67±13,89	
			Total de Merg (#)	2,13±0,52	3,00±1,21	
			Total de Est (#)	4,88±0,83	4,56±0,78	
			Frequência de levantar (#)	3,88±1,13	8,89±1,35	
Suíço	P56	07	pEst (%)	87,84±4,60 (14)	91,67±4,86 (14)	n.s.
			pMerg (%)	52,55±11,99	92,06±7,13	0,02
			Total de Merg (#)	1,86±0,55	2,57±0,64	n.s.
			Total de Est (#)	6,64±0,68	4,86±0,69	0,08
			Frequência de levantar (#)	3,79±1,09	4,57±0,82	n.s.
Suíço	P77	07	pEst (%)	95,48±2,40 (12)	99,29±0,71 (10)	n.s.
			pMerg (%)	85,32±8,86	63,33±14,66	
			Total de Merg (#)	2,50±0,53	2,10±0,69	
			Total de Est (#)	5,25±1,18	4,60±1,20	
			Frequência de levantar (#)	5,58±0,95	6,20±0,87	
Suíço	P56	14	pEst (%)	92,50±5,26 (8)	89,11±2,99 (9)	n.s.
			pMerg (%)	70,00±16,04	67,78±13,92	
			Total de Merg (#)	2,63±0,78	3,56±0,97	
			Total de Est (#)	6,75±0,73	6,00±0,78	
			Frequência de levantar (#)	5,50±1,09	4,44±1,16	
C57Bl/6	P56	14	pEst (%)	68,57±9,47 (12)	80,83±8,92 (12)	n.s.
			pMerg (%)	35,19±11,26	50,00±15,08	
			Total de Merg (#)	2,17±0,75	0,92±0,31	
			Total de Est (#)	4,67±0,61	3,75±0,63	
			Frequência de levantar (#)	7,83±0,98	5,17±0,93	0,06

pMerg e pEst (%), porcentagem de mergulhos e esticadas protegidas, respectivamente; Merg e Est, frequência de mergulhos e esticadas, respectivamente.

^a Resultado estatístico obtido através do Teste t de Student ou Teste U de Mann-Whitney. n.t., não testado. n.s., não significativo.

4.2 Experimento 2. *Estresse crônico variado induz comportamentos do tipo ansiogênico em camundongos C57Bl/6*

Para testar se a linhagem de camundongos C57Bl/6 apresenta susceptibilidade diferenciada aos efeitos deletérios do ECV em relação aos Suíços, animais submetidos ao estresse crônico durante 14 dias foram expostos ao LCE. As opções pela linhagem C57Bl/6 e do ECV apresentado durante duas semanas foram baseadas na descrição do efeito ansiogênico exibido no labirinto provocado pelo modelo de ECV (CAMPOS et al., 2013), na variabilidade comportamental reduzida desta linhagem isogênica.

Após 14 dias de estresse crônico, as medidas de EBF [T(22)=0,47; p=0,64] e TE [T(22)=1,62; p=0,12] permaneceram comparáveis entre os grupos experimentais, sugerindo ausência de alteração na atividade locomotora geral dos camundongos testados no LCE (Figura 19D). O grupo ST apresentou uma redução estatisticamente significativa da %EBA [T(22)=2,79; p=0,01] e da %TBA [T(22)=2,34; p=0,03] em relação ao controle NST (Figura 19C). De modo similar, animais ST exibiram uma diminuição significativa de EBA [T(22)=2,43; p=0,02] e TBA [T(22)=2,34; p=0,03] quando comparados aos animais NST (Tabela 4). A diminuição da atividade nas áreas desprotegidas do labirinto, portanto, indica um efeito ansiogênico durante a exposição ao LCE induzido pelo ECV.

O efeito seletivo do protocolo de ECV sobre as medidas relacionadas à ansiedade foi acompanhado de aumento significativo da %TBF [T(22)=-3,55; p<0,01] e redução da %TC [T(22)=2,83; p<0,01] para o grupo ST comparado ao grupo NST (Tabela 4). Estes resultados fortalecem a interpretação de facilitação da esquia dos espaços abertos pelos camundongos ST, uma vez que o componente aversivo do conflito aproximação-evitação estaria predominante na tomada de decisão destes indivíduos.

De modo complementar aos resultados descritos, as frequências de pMerg, pEst em porcentagens, frequências totais de Merg, Est e Lev, bem como o peso médio dos camundongos registrado ao longo do ECV foram analisados e estão descritos na Tabelas 5. O grupo ST exibiu uma tendência a diminuição do total de Lev comparado ao controle NST [T(22)=1,98; p=0,06], indicando que o ECV parece afetar o componente exploratório da atividade vertical destes camundongos. Entretanto, o teste t de Student não revelou diferenças na comparação entre os grupos NST e ST para os parâmetros %pMerg [T(22)=-0,79;

$p=0,44$]; %pEst $[T(22)=-0,94$; $p=0,36$]; total de Merg $[T(22)=1,54$; $p=0,14$] e total de Est $[T(22)=1,05$; $p=0,31$].

O teste ANOVA não apontou diferenças significativas para o peso dos camundongos testados (Tabela 6), um parâmetro biométrico para possíveis efeitos do estresse crônico. Os fatores dia no qual foi registrado o peso $[F(2,44)=0,49$; $p=0,62$], condição $[F(1,22)=3,74$; $p=0,07$], e interação $[F(2,44)=1,80$; $p=0,18$] não tiveram influência sobre o peso dos animais ao longo da apresentação do estresse crônico.

É importante mencionar que não foram notados camundongos C57Bl/6 do grupo NST sem exploração dos braços abertos durante a exposição ao LCE. Adicionalmente, a dispersão dos dados individuais para %EBA e %TBA se apresenta sem aparente subdivisão intragrupo, o que torna a linhagem C57Bl/6 um modelo animal com resultados consistentes para o desenho experimental proposto.

Tabela 6 – Peso dos camundongos ao longo da exposição ao estresse crônico variado (ST), variando em idade durante o início do estresse, período de estresse e linhagem. Animais não estressados (NST) foram utilizados como controle

Linhagem	Idade no início do ECV (dia pós-natal)	Período de ECV (dias)	Grupo experimental (n)	Peso (g)			Valor de p^a (fator da ANOVA)
				Dia 1	Dia 8	Dia 15	
Suíço	P35	07	NST (8)	31,50±0,71	34,50±0,73*	n.t.	0,04 (condição) <0,01 (dia) <0,01 (interação)
			ST (9)	30,56±0,85	30,67±0,82 [#]		
Suíço	P56	07	NST (14)	43,93±1,59	46,71±1,66	n.t.	0,05 (condição) <0,01 (dia) <0,01 (interação)
			ST (14)	40,64±1,38	41,21±1,47		
Suíço	P77	07	NST (12)	48,50±1,28	48,42±1,55	n.t.	0,03 (condição) <0,01 (dia) 0,02 (interação)
			ST (10)	43,70±2,04	42,20±2,08		
Suíço	P56	14	NST (8)	40,25±1,10	n.t.	46,38±1,00	<0,01 (dia) <0,01 (interação)
			ST (9)	41,56±0,80		43,00±1,03	
C57Bl/6	P56	14	NST (12)	21,83±1,58	21,25±0,60	21,42±0,53	n.s.
			ST (12)	18,83±0,51	19,92±0,48	20,33±0,43	

^a Resultado estatístico obtido através da ANOVA de duas vias com medidas repetidas com fatores condição (não estresse × estresse) e dia de registro do peso ao longo do ECV (dia 1 × dia 8 × dia 15).

* Diferente do respectivo grupo NST pelo teste *post-hoc* de Duncan.

[#] Diferente do grupo NST no dia 8 pelo teste *post-hoc* de Duncan

n.t., não testado.

4.3 Experimento 3. *L-histidina administrada cronicamente não altera comportamentos do tipo ansiogênico induzidos pelo estresse em camundongos C57BL/6*

A fim de examinar se a histamina neural interfere na resposta de ansiedade induzida pelo ECV, camundongos C57BL/6 receberam injeção i.p. crônica de LH associadas ao período de ECV. Após os 14 dias de estresse e tratamento farmacológico, as medidas de EBF (Figura 20C) e TE quantificadas durante a exposição dos quatro grupos ao LCE não apresentaram diferenças significativas de acordo com a ANOVA de duas vias [EBF fator condição: $F(1,34)=0,10$; $p=0,76$; fator tratamento $F(1,34)=1,31$; $p=0,26$; interação $F(1,34)=0,06$; $p=0,81$; TE fator condição: $F(1,34)=1,24$; $p=0,27$; fator tratamento $F(1,34)=0,49$; $p=0,49$; interação $F(1,34)=0,01$; $p=0,90$]. Esses resultados sugerem que tanto a condição não estresse $\times$ estresse como o tratamento SAL $\times$ LH não comprometeram a atividade locomotora dos camundongos testados.

Contudo, a %EBA [$F(1,34)=6,42$; $p=0,02$] e a %TBA [$F(1,34)=6,61$; $p=0,01$] apresentaram diferença significativa para o fator condição de acordo com a ANOVA (Figuras 20A e B). O grupo ST-LH reduziu significativamente a %EBA (Figura 20A) em relação ao grupo NST-SAL (teste de Duncan; $p=0,01$), enquanto que uma tendência a diminuição desta medida foi detectada para o grupo ST-SAL *versus* o controle NST-SAL ($p=0,09$). A %EBA também tendeu à redução nos animais ST-LH em relação ao grupo NST-LH ($p=0,09$).

A %TBA (Figura 20B) foi detectada como significativamente reduzida nos camundongos ST-SAL ($p=0,04$) e ST-LH ($p=0,04$) quando comparados ao controle NST-SAL. Tanto a %EBA como a %TBA não apresentaram diferenças estatisticamente significativas para o fator tratamento [$F(1,34)=1,94$; $p=0,17$; $F(1,34)=0,31$; $p=0,58$; respectivamente] e interação entre os fatores [$F(1,34)<0,01$; $p=1,00$; $F(1,34)=0,44$; $p=0,51$; respectivamente] (Figura 20). Em conjunto, os resultados sugerem uma resposta ansiogênica consistente induzida pelo ECV nos camundongos ST. A partir das tendências observadas, é possível inferir que o tratamento farmacológico crônico causou, isoladamente, um efeito ansiogênico tênue no grupo NST-LH e potencializou tal efeito no grupo estressado ST-LH durante a exposição no LCE.

A frequência de EBA e o TBA apresentaram resultados similares aos descritos para suas respectivas porcentagens (Tabela 7). O fator condição foi significativamente diferente na análise de EBA pela ANOVA [$F(1,34)=5,53$; $p=0,02$], detectado como uma

tendência à redução desta medida nos camundongos ST-SAL (teste de Duncan; $p=0,09$) e ST-LH ($p=0,06$) quando comparados aos animais NST-SAL. Adicionalmente, o fator condição foi significativamente diferente na análise de TBA [ANOVA $F(1,34)=6,61$; $p=0,01$], apontada pelo teste de Duncan como uma diminuição significativa desta medida nos grupos ST-SAL ($p=0,04$) e ST-LH ($p=0,04$) em relação ao controle NST-SAL. Novamente, o fator tratamento e a interação entre fatores não foram estatisticamente diferentes para as medidas de EBA [$F(1,34)=0,43$; $p=0,51$; $F(1,34)=0,05$; $p=0,83$; respectivamente] e TBA [$F(1,34)=0,31$; $p=0,58$; $F(1,34)=0,44$; $p=0,51$; respectivamente].

De modo a complementar os resultados anteriores, foi realizada a análise da %TBF e %TC (Tabela 7) através da ANOVA de duas vias e diferenças para o fator condição foram detectados [$F(1,34)=21,74$; $p<0,01$; $F(1,34)=24,79$; $p<0,01$; respectivamente]. Ambos os grupos estressados, ST-SAL (teste de Duncan; $p<0,01$) e ST-LH ($p<0,01$), apresentam a %TBF significativamente elevada em relação tanto ao grupo NST-SAL como ao grupo NST-LH. Além disso, os mesmos grupos ST-SAL ($p<0,01$) e ST-LH ($p<0,01$) exibem uma diminuição significativa da %TC em comparação a ambos os grupos não estressados, NST-SAL e NST-LH. Finalmente, o fator tratamento e a interação entre fatores não apresentaram diferenças significativas pelo teste ANOVA na análise da %TBF [$F(1,34)<0,01$; $p=0,94$; $F(1,34)=0,12$; $p=0,73$; respectivamente] e da %TC [$F(1,34)=0,16$; $p=0,69$; $F(1,34)<0,01$; $p=0,93$; respectivamente]. Assim, o aumento da esquivas dos espaços abertos, acompanhada de menor permanência na plataforma central e maior permanência nos braços fechados, reflete a inibição de comportamentos exploratórios como característica ansiogênica dos camundongos estressados e/ou, como tendência, injetados com LH.

Adicionalmente, as medidas complementares analisadas listadas como frequências de pMerg, pEst em porcentagens; frequências totais de Merg, Est e Lev; bem como o peso médio dos camundongos registrado ao longo do ECV estão descritos na Tabela 7. O teste ANOVA não indicou diferenças significativas na análise da %pMerg [condição $F(1,34)=0,04$; $p=0,83$; tratamento $F(1,34)=0,04$; $p=0,83$; interação $F(1,34)=2,18$; $p=0,15$]; %pEst [condição $F(1,34)<0,01$; $p=0,95$; tratamento $F(1,34)<0,01$; $p=0,16$; interação $F(1,34)=1,02$; $p=0,32$]; total de Merg [condição $F(1,34)=3,03$; $p=0,09$; tratamento $F(1,34)=1,82$; $p=0,19$; interação $F(1,34)=2,42$; $p=0,13$]; e total de Est [condição $F(1,34)=0,33$; $p=0,57$; tratamento $F(1,34)=0,13$; $p=0,72$; interação $F(1,34)=0,19$; $p=0,66$]. Contudo, o total de

Lev (Tabela 7) foi significativamente diferente de acordo com a ANOVA para o fator condição [$F(1,34)=13,26$; $p<0,01$] e interação condição*tratamento [$F(1,34)=7,34$; $p=0,01$]. O fator tratamento não teve efeito significativo no total de Lev [$F(1,34)=2,07$; $p=0,16$]. Os resultados apresentados sugerem que o ECV combinado às injeções crônicas de LH influenciam a atividade vertical dos camundongos, sem alterar os comportamentos de avaliação de risco.

Na análise do peso dos animais, o fator dia apresentou diferença significativa [$F(2,68)=21,48$; $p<0,01$], identificada nos quatro grupos testados pelo teste de Duncan (Tabela 8). Os camundongos NST-SAL ($p<0,01$), NST-LH ($p=0,03$), ST-SAL ($p<0,01$) e ST-LH ($p=0,03$) aumentaram seu peso ao longo do tempo experimental, embora não de modo marcante como indicado pelas médias de peso na Tabela 8. Não houveram diferenças significativas para os fatores condição [$F(1,34)=1,92$; $p=0,17$], tratamento [$F(1,34)=0,02$; $p=0,38$] e interações entre os fatores ($p>0,20$).

Figura 20 – Efeitos do tratamento crônico de L-histidina (LH), precursor histaminérgico, sobre a ansiedade de camundongos C57Bl/6 estressados ou não por 14 dias

Porcentagens de (A) entradas e (B) tempo nos braços abertos do LCE, bem como (C) entradas nos braços fechados, foram analisadas para os grupos não estressado e estressado injetados i.p. com salina (SAL) ou LH. As barras representam média $\pm$ erro padrão da média. * $p\leq 0,05$ comparado aos grupos NST.

Tabela 7 – Comportamentos exibidos por camundongos C57Bl/6 durante teste no labirinto em cruz elevado (LCE) após serem submetidos a condição de não estresse (NST) ou estresse crônico variado (ST) associado ao tratamento crônico de salina (SAL) ou L-histidina (LH)

Comportamento analisado	NST-SAL (n=10)	NST-LH (n=9)	ST-SAL (n=10)	ST-LH (n=9)	Valor de p^a (fator da ANOVA)
Medidas convencionais					
Frequência de entradas nos braços abertos (#)	4,10±0,74	3,56±0,47	2,50±0,48	2,22±0,74	0,02
Tempo gasto nos braços abertos (s)	46,46±11,14	37,11±5,13	21,66±5,12*	22,53±6,95*	0,01
Total de entradas (#)	13,60±0,96	15,00±1,75	11,90±1,55	12,89±2,44	n.s.
Porcentagem de tempo gasto nos braços fechados (%)	58,31±5,46	60,09±4,19	79,76±2,67**	78,61±4,30**	<0,01
Porcentagem de tempo gasto na plataforma central (%)	26,20±2,99	27,54±3,43	13,03±1,86**	13,88±2,29**	<0,01
Medidas complementares					
Porcentagem de esticadas protegidas (%)	85,19±5,56	75,92±10,66	75,83±10,57	84,26±7,14	n.s.
Porcentagem de mergulhos protegidos (%)	33,33±14,91	53,33±15,07	60,00±16,33	33,33±16,67	n.s.
Frequência total de mergulhos (#)	1,10±0,62	2,67±0,62	1,00±0,30	0,89±0,56	n.s.
Frequência total de esticadas (#)	4,50±0,86	4,44±1,03	3,70±0,62	4,33±0,58	n.s.
Frequência total de levantar (#)	6,00±0,83	9,56±0,94	5,20±0,70	4,11±0,96	<0,01 (condição) 0,01 (interação)

^aResultado estatístico obtido através da ANOVA de duas vias para os fatores condição (não estresse × estresse) e tratamento (salina × L-histidina). *Diferente do grupo NST-SAL pelo teste *post-hoc* de Duncan. ** Diferente dos grupos NST-SAL e NST-LH pelo teste *post-hoc* de Duncan. n.s., não significativo.

Tabela 8 – Peso dos camundongos C57Bl/6 ao longo da exposição ao estresse crônico variado (ST) e após a exposição ao LCE associado ao tratamento crônico de salina (SAL) ou L-histidina (LH). Animais não estressados (NST) foram utilizados como controle da condição estresse.

Grupo experimental (n)	Peso (g)			Valor de p^a (fator da ANOVA)
	Dia 1	Dia 8	Dia 15	
NST-SAL (10)	22,50±0,54	23,40±0,58*	23,40±0,52*	<0,01 (dia)
NST-LH (9)	22,33±0,47	22,89±0,48	23,00±0,41*	
ST-SAL (10)	21,40±0,31	22,30±0,37*	22,50±0,22*	
ST-LH (9)	22,22±0,49	22,56±0,50	22,89±0,56*	

^a Resultado estatístico obtido através da ANOVA de três vias com medidas repetidas com fatores condição (não estresse × estresse), tratamento (salina × L-histidina) e dia do ECV (dia 1 × dia 8 × dia 15).

* Diferente do respectivo dia 1 do grupo pelo teste *post-hoc* de Duncan.

4.4 Experimento 4. *Córtex pré-frontal medial apresenta atividade neural reduzida à exposição ao LCE em camundongos C57Bl/6 estressados*

Para investigar se o CPFm e o complexo amigdalóide seriam recrutados distintamente pela exposição ao LCE após o regime crônico de estresse associado ou não à LH, a expressão do marcador de atividade neural Fos foi analisada nestas áreas-chave envolvidas no estresse e ansiedade. A síntese de Fos induzida pela exposição ao LCE foi descrita em estudos anteriores para camundongos e ratos submetidos ao modelo (MUIGG et al., 2009; DUNCAN; KNAPP; BREESE, 1996; SILVEIRA; SANDNER; GRAEFF, 1993). Neles, a imunorreatividade à Fos apresentou-se significativamente aumentada em comparação aos níveis basais dos animais que permaneceram nas gaiolas moradia (não expostos ao LCE).

Os núcleos celulares imunomarcados para Fos foram quantificados em três sub-regiões do CPF medial [cingulado anterior 1 (Cg1), áreas pré-límbica (PrL) e infralímbica (IL)]. O teste de Kruskal-Wallis revelou uma diferença estatisticamente significativa para o número de núcleos Fos⁺ quantificados no Cg1 [$H(3,21)=14,33$; $p<0,01$] (Figura 21). Em seguida, as comparações múltiplas dos diferentes grupos experimentais apontou que ambos os grupos estressados, ST-SAL e ST-LH apresentaram reduções significativas de células Fos⁺ no Cg1 em relação aos animais tratados NST-LH (Kruskal-Wallis; $p=0,02$ e $p<0,01$, respectivamente). Embora não tenha havido diferença estatisticamente significativa, ou tendência, entre os grupos NST-LH e controle NST-SAL (Kruskal-Wallis; $p>0,10$), a representação gráfica sugere um aumento de células Fos⁺ no Cg1 dos animais injetados com LH (Figura 21). Considerando ainda que a indução da transcrição do gene c-Fos ocorre apenas em neurônios fortemente ativados, mas não em neurônios fracamente ou não ativados, é possível que o tratamento farmacológico tenha elevado o nível de ativação do Cg1 isoladamente (Figura 22A).

A análise estatística para o PrL indicou diferença significativa para o fator condição [ANOVA $F(1,17)=70,30$; $p<0,01$]. Como observado na Figura 21, o número de células neurais Fos-imunorreativas é significativamente menor nos grupos ST-SAL e ST-LH do que nos grupos NST-SAL e NST-LH (Teste de Duncan; $p<0,01$). Entretanto, não foram detectados efeitos significativos do fator tratamento [$F(1,17)=1,84$; $p=0,19$], tão pouco da interação entre fatores [$F(1,17)=1,61$; $p=0,22$].

Figura 21 – Quantificação de células positivas para imunomarcação da proteína Fos nas sub-regiões cingulada, pré-límbica e infralímbica do CPFm

De modo semelhante, os dados da expressão de Fos no IL foram analisados pela ANOVA de duas vias, que apontou diferença significativa para o fator condição [$F(1,17)=29,14$; $p<0,01$] (Figura 21), e ausência de significância estatística para o fator tratamento [$F(1,17)=1,16$; $p=0,30$] e interação entre os dois fatores [$F(1,17)=0,49$; $p=0,49$]. Assim como descrito para o PrL, os camundongos cronicamente estressados dos grupos ST-SAL e ST-LH apresentaram um número reduzido de núcleos Fos⁺ quando comparados a ambos os grupos NST-SAL e NST-LH (Teste de Duncan, $p<0,01$) (Figura 21). Em conjunto, os resultados apresentados sugerem que a condição de estresse crônico induz uma redução marcante do número de células Fos⁺ das regiões pré- e infralímbica recrutadas na exposição ao LCE (Figura 22B). Entretanto, o tratamento crônico com LH não teve efeito sobre a ativação neural destas duas áreas do CPFm.

Figura 22 – Fotomicrografias do CPFm das secções cerebrais de camundongos quantificadas

Linha tracejada separa as sub-regiões (painel A) cingulada 1 (abaixo da linha) e (painel B) pré-límbica (acima da linha) e infralímbica (abaixo da linha) do córtex pré-frontal medial de camundongos C57Bl/6 submetidos (ST) ou não (NST) ao estresse crônico variável, tratados com salina (SAL) ou L-histidina (LH), e expostos ao labirinto em cruz elevado. Secções ao nível do bregma 1.98 (referência: atlas de Paxinos e Franklin (2001). Barra = 100 μ m.

Na análise dos subnúcleos do complexo amigdalóide, a ANOVA de duas vias não indicou diferenças significativas para o número de células Fos+ por 0,1 mm². No subnúcleo LA não foram registrados efeitos significativos dos fatores condição [$F(1,18)=0,04$; $p=0,84$], tratamento [$F(1,18)=2,05$; $p=0,17$] e interação entre eles [$F(1,18)=0,40$; $p=0,54$] (Figura 23). A mesma ausência de diferenças foi observada nas análises estatísticas da BLA [fatores condição $F(1,18)=0,28$; $p=0,60$; tratamento $F(1,18)=1,29$; $p=0,27$; e interação [$F(1,18)=2,86$; $p=0,11$] e CeA [fatores condição $F(1,18)=0,82$; $p=0,38$; tratamento $F(1,18)=0,08$; $p=0,78$; e interação [$F(1,18)=1,57$; $p=0,23$] quantificadas (Figura 23). Assim, o ECV prévio associado ou não ao tratamento farmacológico com LH não alterou o número de núcleos Fos-imunorreativos nas subregiões analisadas da amígdala (Figura 24).

Figura 23 – Quantificação de células positivas para imunomarcação da proteína Fos nos subnúcleos lateral, basolateral e central do complexo amigdalóide

Figura 24 – Fotomicrografias do complexo amigdalóide das secções cerebrais de camundongos quantificadas

Linha tracejada separa os subnúcleos lateral (acima da linha à esquerda), basolateral (abaixo das duas linhas) e central (acima da linha à direita) do complexo amigdalóide de camundongos C57Bl/6 submetidos (ST) ou não (NST) ao estresse crônico variável, tratados com salina (SAL) ou L-histidina (LH), e expostos ao labirinto em cruz elevado. Secções ao nível do bregma -1.70 (referência: atlas de Paxinos e Franklin, 2001). Barra = 100 μ m.

5. DISCUSSÃO

5.1 Experimento 1. *Estresse crônico variado interfere em parâmetro biométrico e atividade locomotora, mas não na ansiedade, de camundongos Suíços*

Através do experimento 1 foi demonstrado que camundongos da linhagem Suíço em três diferentes fases do desenvolvimento pós-natal apresentam o peso como parâmetro biométrico sensível ao protocolo de ECV. Em contrapartida, apenas os animais em P35 no início do ECV desenvolveram hiperatividade motora no LCE em resposta ao estresse crônico de 7 dias. Adicionalmente, tanto o ECV de 7 dias apresentado aos animais a partir de P35, P56 e P77 como o ECV de 14 dias aplicado aos camundongos a partir de P56 não foram capazes de induzir alterações no comportamento do tipo ansioso durante a exposição ao LCE. Em conjunto, os resultados descritos implicam na susceptibilidade motora (idade dependente) e do peso corporal dos animais Suíço, além de uma resiliência emocional, de camundongos da linhagem Suíço ao estresse crônico de uma ou duas semanas.

Evidências têm relacionado o estresse crônico a transtornos neuropsiquiátricos e alterações neurobiológicas correlatas. O estresse crônico pode, por exemplo, precipitar distúrbios de ansiedade que refletem o conflito clássico de aproximação e esquiva (McNAUGHTON; CORR, 2004). Como discutido por Monteiro et al. (2015), a ausência de alterações comportamentais observada nos grupos expostos ao ECV poderia refletir a dinâmica temporal da resposta ao estresse. O estresse afetou o ganho de massa corporal nos grupos ST, o que sugeriria um efeitos deletério inicial do protocolo de ECV testado. Já a ausência de mudanças comportamentais consistentes relativas à ansiedade poderia estar ligada à fase de resistência do que Hans Selye denominou "síndrome de adaptação geral" (SELYE, 1950). Nela, os processos adaptativos reinstalam a homeostase durante o estresse, incluindo a normalização da secreção de glucocorticoides.

Uma vez que o conflito é detectado, no sentido de um equilíbrio entre objetivos concorrentes, ocorre uma potencialização seletiva da função cognitiva sobre a percepção do estímulo como aversivo e das suas consequências de valência negativa. Finalmente, com a prevenção da aproximação, a evitação é favorecida (McNAUGHTON; CORR, 2004). Considerando esse aspecto fundamental da ansiedade, o LCE é um modelo comportamental

que elicia nos roedores o conflito entre a esquivas das zonas desprotegidas e a exploração do novo ambiente. Assim, a exposição crônica prévia a eventos estressores facilitaria a evitação dos braços abertos (dado o seu carácter aversivo) em detrimento da “curiosidade” desencadeada pela novidade. Entretanto, os camundongos da linhagem Suíço submetidos ao ECV a partir de idades distintas não apresentaram comportamentos do tipo ansiogênico durante a exposição ao LCE.

A idade dos indivíduos foi uma variável controlada uma vez que a vulnerabilidade e resiliência estão intimamente relacionadas à fase do desenvolvimento na qual o estresse ocorre. De acordo com Ricon et al. (2012), ratos expostos a 60 dias de ECV na fase juvenil apresentam facilitação da retenção da memória testada na *shuttle-box* quando comparados a ratos submetidos aos mesmos estressores durante a idade adulta, sugerindo uma facilitação da resiliência cognitiva pelos indivíduos jovens. No presente estudo, os animais mais jovens (P35) e cronicamente estressados exibiram aumento de EBF, TE e total de Lev, sugerindo uma hiperatividade locomotora. Esses dados sugerem que o ECV facilita a locomoção geral analisada no LCE em animais jovens adultos.

As características genéticas são também preponderantes na regulação das respostas comportamentais frente aos eventos estressores. No presente experimento, a presença de indivíduos sem atividade exploratória das áreas abertas do LCE foi identificada nos quatro diferentes grupos controle nomeados NST. Essa variabilidade fenotípica interindividual da linhagem de Suíços aparenta ser dependente do *background* genético, já que esses animais foram submetidos a condições semelhantes de não estresse. Deste modo, a heterogeneidade da população amostral para um dado carácter (no caso, a susceptibilidade à ansiedade) exige um n maior para compor a amostra ou uma pré-seleção desses roedores para a característica de interesse.

A variação genética pode, por exemplo, alterar a inibição comportamental modificando a sensibilidade de receptores dentro do próprio sistema septo-hipocampal (CRESTANI et al., 1999). Porém, é crucial lembrar que influências genéticas sobre sistemas defensivos e moduladores podem estar subjacentes ao fator ambiental. A variabilidade nas interações entre fatores genético e ambiental seria, então, similar à variabilidade comportamental desencadeada por desafios externos. No presente estudo, esta variação

fenotípica interindividual dos Suíços os torna um modelo animal pouco eficiente para o desenho experimental que associa o ECV de 7 e 14 dias ao LCE.

Diferenças individuais quanto a experiências prévias, posição na hierarquia social e estresse psicossocial – como as relações de dominância e subordinação entre camundongos machos – exercem uma influência significativa nas respostas eliciadas no LCE (FERRARI et al., 1997) e em modelos comportamentais para depressão. Strekalova et al. (2014) realizou a triagem dos camundongos previamente ao ECV no teste residente-intruso e concluiu que indivíduos submissos na hierarquia social são mais susceptíveis a desenvolver anedonia.

McNaughton e Corr (2004) tratam, conceitualmente, as diferenças individuais em termos da distância defensiva, distância esta internamente percebida em relação à ameaça externa. Nesse sentido, as diferenças individuais poderiam ocupar o nível da distância defensiva em relação a distância real fixa da fonte de perigo. A distância defensiva, por sua vez, seria um reflexo da dimensão genética subjacente à sensibilidade à punição. Assim, os indivíduos apresentariam diferenças na distância percebida da ameaça, seguida por diferenças na sensibilidade ao conflito, tendo como produto final os diferentes traços de ansiedade. Por fim, o traço de ansiedade representaria um fator de risco específico para um transtorno de ansiedade.

5.2 Experimento 2. *Estresse crônico variado induz comportamentos do tipo ansiogênico em camundongos C57Bl/6*

Em contrapartida ao que foi demonstrado para os camundongos da linhagem Suíço, os resultados descritos para a linhagem C57Bl/6 indicam que o ECV com duração de 14 dias induz uma resposta ansiogênica consistente avaliada no LCE. Também ao contrário do que foi relatado para os Suíços, a medida de peso registrada no início, meio e final do período experimental para os camundongos C57Bl/6 estressados não foi alterada pelo ECV; tampouco a atividade locomotora destes animais foi alterada. Em conjunto, esses resultados sugerem que camundongos jovens adultos C57Bl/6 apresentam vulnerabilidade comportamental às más adaptações emocionais induzidas pelo ECV, sem alterações significativas na função motora ou ganho de massa corporal.

Há uma considerável sobreposição funcional entre a expressão do medo e da ansiedade. Em particular, a ansiedade pode envolver a modulação de um medo pré-existente. Além disso, em situações naturais, existe uma forte correlação entre a incerteza da ameaça e a necessidade de aproximação da fonte de perigo potencial (McNAUGHTON; CORR, 2004).

No presente estudo, o ECV proposto foi eficaz em promover a redução das medidas de EBA, TBA e respectivas porcentagens, além de provocar uma diminuição menos marcante da frequência de levantamentos nos animais estressados expostos ao LCE. Tal redução da atividade exploratória nas áreas consideradas desprotegidas do LCE corrobora o estudo de Campos et al. (2013). Naquele trabalho científico, 14 dias de ECV foram suficientes para induzir efeito ansiogênico nos grupos estressados de camundongos C57Bl/6 com idade inicial de 8 semanas.

As medidas complementares se mostraram valiosas na identificação de drogas com ação ansiolítica não detectadas pelos parâmetros convencionais do LCE (COLE; RODGERS, 1995). Embora os comportamentos complementares não tenham sido sensíveis ao estresse crônico no presente estudo, os parâmetros convencionais foram bastante consistentes ao revelar a preferência dos camundongos ST pelas áreas protegidas em detrimento das áreas abertas.

Camundongos C57Bl/6 constituem uma linhagem consanguínea (*inbred*) e compõem comumente o *background* genético de camundongos transgênicos em pesquisa. Em termos comparativos, camundongos C57Bl/6 apresentam níveis basais de exploração dos braços abertos do LCE mais altos do que aqueles observados nos grupos NST da linhagem Suíço. De acordo com Augustsson et al. (2004), camundongos C57Bl/6 se utilizam de uma estratégia ofensiva caracterizada por reduzida avaliação de risco e esquiva, e elevados níveis exploratórios de novos ambientes. Conforme demonstrado através dos comportamentos relativos à ansiedade, função motora e parâmetro biométrico de peso, os resultados sugerem diferenças genótipo-dependentes quanto à sensibilidade ao ECV entre as duas linhagens de camundongos testadas.

5.3 Experimento 3. *L-histidina administrada cronicamente não altera comportamentos do tipo ansiogênico induzidos pelo estresse em camundongos C57Bl/6*

A comparação de diferentes classes de drogas pode ser usada para examinar partes distintas dos sistemas de esquiva e aproximação defensivas, que atuam de modo paralelo e interconectado (McNAUGHTON; CORR, 2004). Nesse sentido, a HA neural foi investigada como possível modulador da resposta ansiogênica observada em camundongos jovens adultos C57Bl/6. Os resultados apresentados sugerem que o tratamento crônico com o precursor histaminérgico LH não reverte a resposta ansiogênica do grupo estresse eliciada durante a exposição ao LCE. Embora de modo tênue, a manutenção dos níveis endógenos aumentados de histamina durante 14 dias tende a causar, isoladamente, efeito ansiogênico, e mesmo potencializá-lo nos animais cronicamente estressados.

O tratamento farmacológico foi uma variável nova associada ao protocolo de ECV, de modo que a administração crônica de SAL ou LH enquanto estressor repetido poderia interferir nos comportamentos relativos à ansiedade. Contudo, as injeções i.p. diárias não alteraram o estado ansioso basal dos camundongos controle NST-SAL, uma vez que os grupos NST (experimento 3) e NST-SAL (experimento 4) apresentam níveis exploratórios do LCE comparáveis. Adicionalmente, a resposta ansiogênica do grupo ST demonstrado no experimento 3 foi reproduzida no grupo ST-SAL do presente experimento.

No presente estudo, a LH foi o agente farmacológico utilizado para ativar o SNH. A taxa de síntese de histamina, em contraste com a de outras aminas biogênicas, é determinada pela biodisponibilidade do seu precursor (HAAS; SERGEEVA; SELBACH, 2008). Desta forma, a administração sistêmica de LH aumenta o nível intracerebroventricular do precursor, que por sua vez resulta em aumento dos níveis de histamina central. Contudo, não se pode excluir que mudanças compensatórias na atividade das enzimas histidina descarboxilase e histamina-N-metiltransferase possam acompanhar a maior síntese de histamina.

A regulação das reações defensivas pela histamina neural pode ocorrer via interação com os receptores H₁, H₂ e H₃ expressos no substrato neuroanatômico implicado, particularmente, na ansiedade. Além da inervação e *turnover* histaminérgicos proeminentes, a amígdala e o córtex pré-frontal apresentam o H₂ como receptor predominante (KÖHLER et

al., 2011), envolvido na modulação da ansiedade, medo inato e aprendido, além da aprendizagem e memória (HAAS; SERGEEVA; SELBACH, 2008). Adicionalmente, existem densidades altas de receptores excitatórios do subtipo H₁ no hipotálamo, por exemplo, no núcleo paraventricular – que promove a liberação de uma variedade de hormônios envolvidos nas respostas neuroendócrinas e autonômicas do medo e do estresse (HAAS; SERGEEVA; SELBACH, 2008).

Os estudos disponíveis na literatura científica indicam efeitos controversos decorrentes da manipulação farmacológica do SNH. De acordo com Yoshikawa et al. (2014), a síntese insuficiente de histamina – provocada pela baixa ingestão do aminoácido LH na dieta – causa efeito ansiogênico em camundongos C57Bl/6 expostos aos testes de campo aberto e caixa claro-escuro. Nessa mesma direção, outro estudo revelou que a LH administrada i.p. agudamente em camundongos Suíços resulta em efeito ansiolítico no LCE, revertido pela microinjeção intra-hipocampal do antagonista-H₁ clorfeniramina (CANTO-DE-SOUZA et al., 2015). Ainda sobre o efeito ansiolítico da histamina, Daher e Mattioli (2015) relataram um aumento do tempo gasto nos braços abertos por camundongos Suíços expostos ao LCE decorrente da administração intra-amígdala de histamina.

Em contrapartida, outros estudos farmacológicos em roedores indicam que a histamina pode ser um sinalizador da resposta ao perigo, promovendo a ansiedade. A administração periférica de LH em camundongos Suíços diminuiu, de forma dose-dependente, as atividades nos braços abertos; tal efeito ansiogênico foi significativamente atenuado pelo pré-tratamento com pirilamina, um antagonista do receptor H₁ (KUMAR; KRISHNA; PALIT, 2007). As ações ansiogênicas da histamina também estão de acordo com os efeitos excitatórios de áreas cerebrais límbicas. Quando injetada unilateralmente intra-BLA ou bilateralmente intra-CeA, a histamina diminuiu a %TBA e a %EBA em ratos expostos ao LCE, sugerindo que a histamina induz comportamentos do tipo ansiogênico, enquanto que a microinjeção de pirilamina nos mesmos sítios promoveu efeito ansiolítico (ZARRINDAST et al., 2005; MOGHADDAM et al., 2008). Já a coadministração intra-septo lateral de pirilamina ou de ranitidina (um antagonista H₂) e de histamina reverteu o efeito ansiogênico induzido pelo agonista (ZARRINDAST et al., 2008).

Além do efeito dual das drogas histaminérgicas sobre a resposta de ansiedade, a ausência de efeitos sobre o comportamento do tipo ansioso também foi relatada na

literatura pertinente. A injeção aguda via intraperitoneal de LH não alterou as medidas convencionais relacionadas à ansiedade de camundongos Suíços testados no LCE (SERAFIM et al., 2010; GIANLORENÇO; CANTO-DE-SOUZA; MATTIOLI, 2010). Além das diferenças nas condições experimentais, pode-se especular que outros modelos além do LCE seriam mais sensíveis a alterações específicas da ansiedade.

No presente estudo, a administração i.p. diária de LH por duas semanas não foi capaz de reverter a resposta ansiogênica induzida pelo ECV. Esse resultado é indicado pela exploração reduzida das áreas abertas do LCE em nos grupos estressados ST-SAL e ST-LH, independentemente do tratamento e em comparação aos animais NST. Contudo, o tratamento crônico de LH tende, de maneira isolada e tênue, a facilitar a reação ansiogênica dos camundongos NST-LH durante a exposição ao LCE. Tal tendência a efeito ansiogênico pode ser inferida a partir da Figura 20, na qual se nota uma diminuição da %EBA e %TBA pelo grupo NST-LH em relação ao grupo NST-SAL.

Ainda em termos de tendência, os resultados representados na Figura 20 para o grupo ST-LH sugerem uma tênue potencialização dos efeitos do estresse crônico sobre a medida de %EBA pela administração repetida de LH; semelhante efeito potencializado não poderia ser observado na %TBA uma vez que o nível mais baixo possível, induzido pelo ECV, já tenha sido atingido pelos camundongos ST-LH. Assim, o tratamento farmacológico crônico de LH mimetizaria um estímulo aversivo ou potencializaria a experiência aversiva dos roedores na situação de conflito do LCE.

Em apoio a essa interpretação, existem evidências sobre a ativação do eixo HPA pela interação da histamina com outros mediadores intercelulares (HAAS; SERGEEVA; SELBACH, 2008). A liberação de histamina também é um indicador sensível do estresse. A exposição a diversos eventos estressores, como a contenção, o frio e o choque nas patas, aumentam o *turnover* da histamina no diencéfalo, núcleo acumbens e estriado de roedores (TAYLOR; SYNDER, 1971 *apud* Ito, 2000; YOSHITOMI et al., 1986). Sabe-se também que subgrupos distintos de neurônios histaminérgicos do NTM são diferencialmente ativados após o estresse de contenção, choque nas patas, hipoglicemia ou desidratação, sugerindo uma heterogeneidade funcional estressor-específica (MIKLÓS; KOVÁCS, 2003).

Dentro do conceito de sistema defensivo bidimensional proposto por Gray e McNaughton (2000), aferências serotoninérgicas e noradrenérgicas se difundem através dos

diferentes níveis neuroanatômicos hierárquicos modulando a resposta de medo e ansiedade. Como sugerido anteriormente, a histamina central também regularia a expressão emocional em uma situação de conflito, porém favorecendo a esquiva mediada pelo SCA em resposta a estímulos aversivos fortes (DAHER; MATTIOLI, 2015). Considerando como estímulo estressor os níveis elevados e sustentados de histamina, o tratamento farmacológico crônico conduzido no presente estudo facilitaria o comportamento de evitação em camundongos através do SIC e/ou do SCA.

Um dos possíveis mecanismos subjacentes à resposta ansiogênica dos roedores seria a interação entre os sistemas histaminérgico e GABAérgico. Além da histamina, os neurônios do NTM contêm outros neurotransmissores e neuromoduladores. A enzima ácido glutâmico decarboxilase (GAD), responsável pela síntese de GABA, e o próprio GABA são encontrados na maioria dos neurônios NTM. Essa coexistência teria um significado funcional, uma vez que os neurônios do NTM têm projeções extensas pelo SNC e mediarão sua inibição geral (HAAS; PANULA, 2003). Xu et al. (2004) relataram que as fibras histaminérgicas ativam os neurônios GABAérgicos do sistema septo-hipocampal de ratos. Assim, a estimulação do SIC pela histamina resultaria na inibição do comportamento exploratório em situações de conflito.

Como descrito nas referências anteriores, a maior parte dos estudos sobre agonistas e antagonistas histaminérgicos relatam efeitos comportamentais resultantes de tratamentos agudos. Entretanto, pouco se sabe sobre os desdobramentos da manipulação farmacológica crônica do SNH sobre o comportamento emocional de roedores. Nesse contexto, o presente experimento é relevante ao demonstrar (1) respostas ansiogênicas consistentes decorrentes do ECV e que corroboram a literatura pertinente; (2) a modulação sutil das respostas adaptativas de defesa pelo aumento sustentado da HA neural.

5.4 Experimento 4. *Córtex pré-frontal medial apresenta atividade neural reduzida à exposição ao LCE em camundongos C57Bl/6 estressados*

A marcação de reguladores de atividade neural geneticamente codificados e expressos em neurônios, atividade esta evocada por estímulos ambientais, é uma ferramenta importante para testar a relevância funcional de populações celulares específicas na

codificação de representações complexas (CRUZ et al., 2013). No presente estudo, a atividade neural de sub-regiões do CPFm e de subnúcleos amigdaloides de camundongos foi detectada após a exposição ao LCE através da expressão de Fos por células neurais recrutadas durante o teste. Conforme será discutido mais adiante, essas regiões cerebrais ativadas pelo modelo de conflito aproximação-esquiva estão anatomicamente conectadas e envolvidas nos circuitos relacionados à ansiedade.

As sub-regiões do CPFm investigadas foram diferencialmente sensíveis aos efeitos do ECV e do tratamento farmacológico. Enquanto uma marcante redução da imunorreatividade à Fos induzida pelo ECV foi demonstrada nos córtices PrL e IL, um aumento tênue da ativação neural promovida pela LH crônica foi observado na área 1 do cíngulo anterior (Figura 21). Assim, sugere-se que a reação ansiogênica causada pelo ECV e, em menor grau, pelos níveis elevados sustentados de histamina aparentam não compartilhar o mesmo substrato neural. Recentemente, Croteau, Schulkin e Shepard (2017) demonstram diferenças regionais claras quanto aos efeitos comportamentais provocados pela corticosterona cronicamente elevada no CPFm de ratos. O aumento sustentado do glicocorticóide nos córtices PrL e IL, mas não no CgA, reduziu a exploração dos braços abertos durante a exposição ao LCE.

Após os treinos e testes comportamentais, a detecção de Fos em áreas encefálicas indica onde e quando os neurônios foram ativados durante a aprendizagem (CRUZ et al., 2013). Além disso, lesões e inativação farmacológica são também ferramentas utilizadas para avaliar o papel destas áreas, como o CPFm, na aquisição e extinção do medo condicionado em roedores. O PrL inativado antes ou depois da aquisição do medo condicionado ao som reduziu consistentemente a expressão do medo sem alterar a memória de extinção. Em contrapartida, a pré ou pós-inativação específica do IL não altera a expressão, mas prejudica o processo de extinção do medo (SIERRA-MERCADO et al., 2011). Assim, acredita-se que o CgA desempenha um papel fundamental na formação de memórias aversivas, o PrL medeia a expressão do medo condicionado e o IL está envolvido na consolidação da extinção das memórias de medo (COURTIN et al., 2013).

Existem também outras linhas de evidência sugerindo que o padrão específico de expressão da Fos evocado por drogas ansiogênicas está associado ao estado de ansiedade que essas substâncias produzem (SINGEWALD; SALCHNER; SHARP, 2003). De acordo com os

resultados descritos no presente estudo, o estresse e o tratamento farmacológico crônicos evocariam estados ansiosos distintos.

Como a disfunção do CPF caracteriza diversos distúrbios relacionados ao estresse, o presente estudo analisou o impacto do estresse crônico no CgA de camundongos expostos ao LCE. Sabe-se que o Cg1 desempenha um papel crucial na iniciação, na motivação e nos comportamentos orientados por objetivos (DEVINSKY; MORRELL; VOGT, 1995), de modo que esta sub-região cortical possa ser crucial na organização das reações exibidas no LCE. Ratos naive tratados com midazolam exibiram uma diminuição significativa do número de células Fos⁺ no Cg1, indicando que este córtex pode desempenhar um papel importante no efeito ansiolítico do benzodiazepínico durante o teste no LCE (ALBRECHET-SOUZA; BORELLI; BRANDÃO, 2009).

Singewald, Salchner e Sharp (2003) demonstraram que drogas ansiogênicas farmacologicamente diversas (FG-7142, yohimbina, mCPP e cafeína) ativam áreas prosencefálicas semelhantes. Porém, apenas a mCPP não foi capaz de alterar a atividade neural do CgA. Assim, é possível que os agentes testados no presente estudo – a HA central elevada e o ECV – facilitem o estado ansioso dos camundongos sem que haja a sobreposição completa das áreas ativadas investigadas.

Como discutido anteriormente, a neurotransmissão histaminérgica no cérebro de roedores apresenta-se aumentada na presença de estressores, enquanto o bloqueio desta neurotransmissão resulta em efeitos ansiolíticos. De acordo com a Figura 21, grupo NST-LH tem um aumento tênue no número de núcleos imunorreativos à Fos no Cg1 em relação ao controle NST-SAL. Como especulação, sugere-se que a tendência à resposta ansiogênica exibida pelos camundongos não estressados e tratados com LH seja mediada pela também tênue hiperatividade do Cg1.

Foi demonstrado que a ativação de neurônios histaminérgicos pela tioperamida, um antagonista do receptor H₃, aumenta a síntese de RNAm e de produtos protéicos Fos em neurônios magnocelulares dos núcleos supraóptico e paraventricular de ratos via receptores do subtipo H₁ (VIZUETE et al., 1995). Apesar da histamina apresentar maior afinidade pelos subtipos H₃ e H₄ (LIM et al., 2005), é possível que o aumento sustentado da histamina endógena pela administração crônica de LH promova maior interação do agonista com seus receptores H₁ e H₂.

Embora existam evidências consistentes de que a ativação de diferentes partes do sistemas defensivos provoca pânico e ansiedade em modelos animais, não é possível afirmar se o aumento tênue na expressão de Fos induzido pelo precursor histaminérgico reflete circuitos que provoquem ou que adaptam-se ao estado ansiedade (SINGEWALD; SALCHNER; SHARP, 2003). Por exemplo, os efeitos no Cg1 podem estar relacionados a ativação de vias inibidoras da ansiedade para contrapor os mecanismos ansiogênicos. Esses resultados ressaltam a importância das vias histaminérgicas no desenvolvimento de psicopatologias relacionadas ao estresse e à ansiedade, de grande relevância para futuras abordagens farmacológicas.

A expressão elevada de Fos no CPFm, incluindo PrL e IL, foi observada em ratos expostos ao LCE (DUNCAN; KNAPP; BREESE, 1996), considerado um estresse agudo. Contudo, no presente estudo, as sub-regiões PrL e IL dos camundongos estressados apresentaram uma redução marcante de núcleos Fos⁺ em relação aos grupos NST. Nesse sentido, estudos prévios descreveram que o estresse crônico ou glicocorticóides promovem reconfigurações importantes nos dendritos apicais de neurônios piramidais do CPF, resultando em atrofia dos ramos dendríticos distais e perda de espinhas dendríticas (McEWEN et al., 2015; CERQUEIRA et al., 2007).

Ainda dentro do CPF, a desarborização e o encolhimento dendríticos induzidos pelo estresse crônico associam-se, por exemplo, à rigidez cognitiva (McEWEN et al., 2015) e hipoatividade. Dias-Ferreira et al. (2009) demonstraram que o estresse crônico variado de 3 semanas resulta na atrofia seletiva das camadas externas das sub-regiões PrL e IL de ratos adultos. Neste mesmo estudo, a reconfiguração da via corticoestriatal associativa prejudicou a habilidade dos animais estressados em realizar tarefas com base em suas conseqüências (estratégias direcionadas a objetivos). Este comprometimento da excitação cortical, tipicamente observado em animais submetidos a várias semanas de estresse, é provavelmente resultante da condição aversiva prolongada.

Estudos comportamentais apontam o envolvimento do PrL e IL nas funções cognitiva e afetiva, porém em aspectos distintos destes processos. Por exemplo, demonstrou-se que lesões eletrolíticas do CPFm pré-límbico ou infralímbico induziu respostas ansiogênicas em ratos Wistar submetidos aos testes de campo aberto e LCE (JINKS; MCGREGOR, 1997). No presente estudo, PrL e IL foram similarmente sensíveis aos estressores variados apresentados

durante duas semanas. Como a indução de comportamentos do tipo ansioso em camundongos C57Bl/6 é uma resposta consistente do protocolo de ECV testado, é hipotetizado que a expressão reduzida de Fos em sub-regiões cortico-mediais resulta do estado ansioso facilitado pelo estresse. No entanto, os efeitos indiretos do estresse crônico através de suas ações nas aferências das sub-regiões corticais hipoativas também são prováveis. Também não se pode descartar que a hipoatividade pré-límbica e infralímbica esteja relacionada à ativação autonômica característica dos estados de ansiedade.

O CPFm pode modular as reações autonômicas durante o estresse e a ansiedade (JINKS; MCGREGOR, 1997). As amplas projeções do CPFm para regiões como amígdala e tronco encefálico (p. ex., núcleo do trato solitário) constituem um importante substrato na regulação do equilíbrio autonômico e neuroendócrino, com influências sobre a atividade parassimpática e hipotalamo-hipofisária adrenal (McEWEN; MORRISON, 2013; GROENEWEGEN; UYLINGS, 2000). Ao final, esses sistemas efetores mobilizam recursos corporais para facilitar estratégias de *coping*, como as reações de "luta ou fuga".

A amígdala desempenha um papel fundamental no processamento da ansiedade e do medo. A ativação desta estrutura, por exemplo, resulta em respostas comportamentais e fisiológicas relacionadas à ansiedade e ao pânico, enquanto que lesões da amígdala reduzem tais efeitos (JANAK; TYE, 2015). Como existe hiperexcitabilidade nos circuitos do medo e da ansiedade, particularmente na amígdala, acredita-se que esta seja uma característica comum aos transtornos de ansiedade (ROSEN; SCHULKIN, 1998). No presente estudo foi observado que camundongos NST e ST, independentemente do tratamento farmacológico, apresentam ativação comparável dos subnúcleos La, BLA e Ce provocado pela exposição ao LCE. De modo interessante, o efeito ansiogênico tênue das injeções de LH no nível comportamental não hiperativou a amígdala dos animais nas duas condições testadas.

Alterações plásticas estruturais na amígdala implicadas em transtornos de ansiedade e no TEPT (McEWEN, 2007), por exemplo, foram demonstradas em estudos pré-clínicos. Estressores agudos causam aumento na densidade de espinhas dendríticas em neurônios da BLA. O estresse crônico de contenção leva à expansão dos dendritos naquele mesmo subnúcleo amigdalóide, enquanto induz a perda de espinhas e encolhimentos dendríticos nos neurônios do núcleo medial (LAU et al., 2016; McEWEN; MORRISON, 2013; BENNUR et al., 2007).

A expressão de Fos aumentada em subnúcleos do complexo amigdalóide acompanha o comportamento ansioso exibido por ratos testados no LCE. Em 1993, Silveira, Sandner e Graeff demonstraram que a exposição de ratos Long-Evans ao LCE induziu a ativação de várias estruturas ao longo do eixo rostro-caudal, dentre elas os núcleos cortical e medial da amígdala. No presente estudo, apenas os subnúcleos La, BLA e Ce da amígdala foram analisados, porém sua ativação pelo conflito aproximação-esquiva do LCE não foi alterada pelo estresse e/ou tratamento prévios.

Existem amplas conexões recíprocas entre amígdala e CPF, particularmente as divisões medial e orbital do CPF (GROENEWEGEN; UYLINGS, 2000). A maioria dos neurônios de projeção cortical (células piramidais) tem o glutamato como neurotransmissor, e a expressão peptídica aparece concentrada nos interneurônios (SWANSON; PETROVICH, 1998). As eferências glutamatérgicas do CPF estabelecem sinapses com neurônios GABAérgicos (QUIRK; MUELLER, 2008), caracterizando um *input* inibitório importante para a amígdala. De acordo com este modelo, as eferências excitatórias do IL ativam um núcleo localizado entre a BLA e o Ce, denominado núcleo intercalado medial (ITCm). O ITCm é composto por uma população de células GABAérgicas que, ativas, inibem subsequentemente a divisão medial do Ce (COURTIN et al., 2009).

Ratos com lesão no CPFm exibem um prejuízo da extinção da resposta aversiva aprendida (MORGAN; ROMANSKI; LeDOUX, 1993). Essa descoberta é consistente com presença da via descendente inibitória entre o CPFm e a amígdala, sendo crucial no processo de extinção do medo condicionado. Na ausência desta aferência inibitória ativa, a amígdala não é modulada e permanece estimulada (DAVIDSON, 2002). Nesse contexto, esperava-se que a hipoativação do IL demonstrada no presente estudo resultasse em hiperativação dos neurônios eferentes do CeA.

Em contraste com o papel inibitório do IL, o PrL tem sido implicado na expressão do medo através da ativação de neurônios da BLA que, por sua vez, conectam-se com o Ce (PAPE; PARE, 2010). De acordo com esta hipótese, um estudo de Knapska et al. (2012) indicou que, durante a recuperação da memória de extinção, os neurônios ativos no LA eram estimulados por aferências infralímbicas, enquanto que a renovação da memória do medo estava associada aos neurônios com expressão de Fos ativados pelo PrL e hipocampo

ventral. Assim, o PrL regula indiretamente a atividade neuronal no BLA, embora também seja possível uma modulação do hipocampo através de projeções diretas (VERTES, 2006).

Embora esta abordagem seja amplamente aceita e validada na pesquisa neurocientífica, ainda não está esclarecido se todos os tipos neuronais e estruturas do SNC decodificam produtos dos genes de expressão imediata (por exemplo, c-Fos, zif-268), se algumas regiões do encéfalo apresentam expressão constitutiva destes genes e se a ausência de sua expressão necessariamente exclui o envolvimento de um subconjunto de neurônios em um circuito funcional particular (COURTIN et al., 2013).

De acordo com o modelo bidimensional de defesa defendido por McNaughton e Corr (2004), a ansiedade apresenta maior representação neural nos níveis hierárquicos mais rostrais dos sistemas defensivos. Fundamentado nesse modelo, nosso grupo de pesquisa tem sugerido que projeções histaminérgicas do *vermis* cerebelar estão envolvidas na modulação da memória de ansiedade e do medo distintamente: a microinjeção de histamina inibiu a consolidação da memória aversiva em camundongos reexpostos ao LCE, enquanto facilitou a retenção da tarefa de esquiva inibitória (GIANLORENÇO; CANTO-DE-SOUZA; MATTIOLI, 2011, 2013). Embora exista um conjunto de áreas prosencefálicas comumente importantes para os estados ansiosos evocados através de manipulações farmacológicas e ambientais, os estudos apresentados sugerem que os efeitos ansiogênicos descritos têm distinções quanto ao substrato e ativação neural relacionada.

Em conjunto, as evidências apoiam os esforços na pesquisa *in vivo* para o desenvolvimento de modelos animais – como camundongos geneticamente modificados ou bidireccionalmente selecionados – que exibam má adaptações comportamentais e neurobiológicas (CRYAN; HOLMES, 2005). Nesse sentido, o CPFm tem um papel fundamental nas respostas má adaptativas ao estresse, identificando esta região cerebral como alvo de intervenção nos transtornos relacionados ao estresse e a ansiedade.

6. CONCLUSÕES

- O ECV apresentado por uma e duas semanas não afetou os comportamentos do tipo ansioso de camundongos Suíços submetidos ao LCE, sugerindo um papel importante dos mecanismos resilientes nesta linhagem.
- O ECV de duas semanas induz uma resposta ansiogênica em camundongos da linhagem C57Bl/6 expostos ao LCE.
- O tratamento crônico com LH não foi capaz de reverter ou potencializar as alterações comportamentais e neuroanatômico-funcionais causadas pelo ECV. Contudo, tende a induzir um efeito ansiogênico quando administrada isoladamente.
- O ECV de duas semanas induz hipoativação das subáreas pré-límbica e infralímbica do córtex pré-frontal medial de camundongos expostos ao LCE.

CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS

CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS

A resiliência refere-se à capacidade de um indivíduo em evitar consequências sociais, psicológicas e biológicas deletérias do estresse que, de outra forma, comprometeriam seu bem-estar psicológico ou físico. Estudos recentes indicam que a resiliência em seres humanos representa um processo adaptativo ativo, e não simplesmente a ausência de respostas patológicas características de indivíduos mais suscetíveis (RUSSO et al., 2012). A resiliência ao desamparo, à ansiedade e à hipersociabilidade são características cruciais na análise dos resultados apresentados.

A partir dos dados obtidos depreende-se que estudos experimentais de ansiedade, depressão e interação social não podem prescindir da avaliação da resiliência da espécie, linhagem e do sexo. De acordo com a bibliografia levantada sobre desamparo aprendido, ratos seriam um modelo animal mais susceptível aos déficits na aprendizagem de esquiva induzidos pelo ECV. Dada a heterogeneidade comportamental da linhagem de Suíços, propõe-se nos próximos estudos uma pré-seleção dos indivíduos para a característica de interesse através de um paradigma de conflito aproximação-esquiva, por exemplo. No que se refere ao fenótipo hipersocial mais proeminente em fêmeas com *knockout* parcial da PSD-95 (ver artigos científicos na seção ANEXO), estudos sobre os mecanismos subjacentes às diferenças de sexo nas respostas ao estresse podem nos fornecer informações únicas sobre seus mecanismos biológicos.

Em linhas gerais, os resultados do presente estudo sugerem que as linhagens de camundongos Suíço e C57Bl/6 machos respondem aos desafios ambientais com estratégias de *coping* distintas. Suíços cronicamente estressados desenvolvem hiper-reatividade durante a tarefa de esquiva ativa e não apresentam uma hiperansiedade consistente. Animais C57Bl/6 submetidos ao mesmo regime de estresse que os Suíços exibem um perfil ansioso robusto persistente 24 h após o término do ECV. Adicionalmente, os modelos experimentais utilizados discriminaram as alterações comportamentais do tipo depressiva e ansiosa após o regime de ECV com duração de 14 dias. Nesse sentido, o presente estudo corrobora o trabalho científico de Strekalova e colaboradores (2014), que descreve o efeito ansiogênico em camundongos C57Bl/6J causado pelo ECV independentemente da anedonia, um sintoma depressivo.

Dentro da classificação psiquiátrica, ansiedade e depressão estão separadas como síndromes clínicas distintas, associadas apenas na condição de comorbidade (TYRER, 2001). De acordo com Shorter e Tyrer (2003), essa divisão indicada a partir da 3ª edição do Manual Estatístico e Diagnóstico dos Transtornos Mentais (DSM) é cada vez mais reconhecida como inadequada. Nessa concepção, a maioria dos transtornos de humor se apresentariam como uma combinação de ansiedade e depressão, e os tratamentos tenderiam a ser para sintomas e não para doenças. Os mesmos autores ainda discutem que a indústria farmacêutica privilegiaria o diagnóstico preconizado pelo DSM a qualquer abordagem dimensional da definição da doença, já que categorias mutuamente exclusivas representariam mais nichos de mercado.

Semelhanças consideráveis nos sintomas, substratos fisiopatológicos e resposta a intervenções terapêuticas também embasam uma hipótese alternativa à dissociação das duas síndromes, segundo a qual existiria um *continuum* temporal ansiedade-depressão. Sufka et al. (2006) modelaram esta hipótese ao demonstrar um padrão de vocalizações de “angústia” em galos isolados de seus coespecíficos. Segundo os autores, os chamados exibidos sequencialmente ao longo do teste caracterizam uma resposta de estresse em três etapas distintas: estado do tipo ansioso, fase de transição e estado do tipo depressivo, com validação farmacológica através da administração de clordiazepóxido (ansiolítico benzodiazepínico) e de imipramina (antidepressivo tricíclico). Assim, é possível que o tempo de exposição ao estresse seja uma medida para especificar os estados ansioso e depressivo.

No presente estudo, o paradigma de ECV em camundongos desempenharia uma seleção dual: alterações comportamentais relacionadas à ansiedade seriam reveladas após 2 semanas de estresse, enquanto que comportamentos do tipo depressivo (como o desamparo) seriam detectáveis a partir de 4 semanas do início do ECV. Essa especulação poderia ser comprovada após (1) a instalação da fase de depressão após 28 dias do protocolo de ECV em camundongos C57Bl/6 e (2) a caracterização farmacológica por drogas de atividade ansiolítica ou antidepressiva. No que se refere as bases neurais, especula-se também que os comportamentos relativos à depressão dependeriam dos sistemas neurais que medeiam a ansiedade, porém envolveriam alterações neurais adicionais não observadas nos estados ansiosos.

A exposição ao LCE envolve ativação comportamental, uma vez que se baseia na exploração de um ambiente novo e potencialmente perigoso pelos roedores. Assim, um provável viés da técnica imunoistoquímica utilizada seja a dificuldade em diferenciar a expressão de Fos devido aos aspectos aversivos do teste ou à excitação comportamental generalizada e função motora. A aplicação de outros testes ou paradigmas comportamentais aos camundongos ST, como a caixa claro-escuro e a supressão alimentar pela novidade, poderia fornecer evidências adicionais de que a expressão de Fos em regiões encefálicas alvo deve-se à experiência de ansiedade. No entanto, considerando a vasta literatura científica a respeito do substrato neuroanatômico das reações defensivas (GROSS; CANTERAS, 2012; LeDOUX, 2012; MCNAUGHTON; CORR, 2004), sugere-se uma relação robusta entre o perfil comportamental ansioso e a hipoativação cerebro-cortical apontadas no presente estudo.

Na pesquisa em humanos, uma região cerebral diferencialmente ativa em indivíduos ansiosos é o CPF medial. Um padrão diferencial de ativação do CPFm também é evidente nos casos de depressão unipolar (DAVIDSON et al., 2002), que se sobrepõe consideravelmente à ansiedade patológica na clínica. Adicionalmente, há uma concordância entre estudos com humanos e roedores, fortalecendo a hipótese de que a caracterização neurobiológica da ansiedade em modelos animais pode ser relevante para a psiquiatria (DUNCAN et al., 1996). Dentre as áreas corticais e subcorticais ativadas em resposta à exposição ao LCE descritas por Duncan et al. (1996), o córtex cingulado e o núcleo medial da amígdala apresentaram um aumento marcante de células imunorreativas à Fos.

Distinções no comportamento ansioso de camundongos estão acompanhados da ativação também diferencial de áreas encefálicas durante o estresse. Camundongos HAB (do inglês *high anxiety-related behavior*) apresentaram ansiedade elevada mediada pela hiperativação de núcleos amigdaloides e da substância cinzenta periaquedutal, além de hipoativação do córtex cingulado e giro denteado, quando comparados aos coespecíficos LAB (*low anxiety-related behavior*, ou comportamento hipoansioso) durante a exposição aos braços abertos do LCE. Estas linhagens são resultantes de cruzamento seletivo e bidirecional de camundongos CD1, de modo que tanto o fenótipo comportamental da ansiedade como o componente genético refletiriam na atividade neural desses animais. Assim, estas sub-regiões compõem circuitos neurais fundamentais relacionados à experiência de estresse e ansiedade.

A amígdala não está necessariamente envolvida no controle de respostas a todos os possíveis tipos de ameaças. Por exemplo, quando as experiências aversivas são aprendidas com êxito, a amígdala não está envolvida no controle das respostas (PONNUSAMY et al., 2007). Quando as ameaças são imprevisíveis, o circuito chave deste processamento envolve o núcleo leito da estria terminal ao invés da amígdala (DAVIS et al., 2010). E mesmo quando a amígdala está envolvida, existem vários tipos diferentes de circuitos para diferentes tipos de ameaças (LeDOUX, 2012).

Os medicamentos disponíveis não aliviam os transtornos de ansiedade com sucesso em todos os pacientes, e os efeitos colaterais reduzem a disposição ao tratamento entre aqueles para quem são eficazes (CALHOON; TYE, 2015). A inovação farmacoterapêutica para ansiedade patológica desenvolve-se lentamente desde a década de 1940, marcada pela escassez na descoberta de alvos farmacologicamente distintos ao longo de 75 anos (KINCH et al., 2014). Para melhorar as estratégias de tratamento da ansiedade, é necessária uma compreensão mais ampla dos circuitos neurais que regem este estado emocional nas condições saudável e doente (CALHOON; TYE, 2015). Assim, estudos sobre os efeitos de drogas ansiolíticas de classes farmacológicas diferentes na indução de Fos em modelos animais pode ajudar a esclarecer quais as regiões cerebrais envolvidas na ansiedade e, em contrapartida, diferenciá-las de outras manifestações neurobiológicas do estresse (DUNCAN et al., 1996).

Conforme discutido anteriormente, a estimulação crônica do sistema neural histaminérgico através da administração diária de LH aparenta por si só facilitar, tenuamente, o comportamento ansioso dos camundongos naive. Uma relação pode ser sugerida entre a ansiedade aumentada e a hiperativação do Cg1 detectada pelo ensaio imunoistoquímico de Fos. Assim, os produtos de genes de expressão imediata também representam uma ferramenta *in vivo* interessante para examinar os substratos neurais e a ação de agentes com propriedades ansiogênicas e ansiolíticas. Como produto final, compreensão das bases neuroanatômicas e dos sistemas neuroquímicos associados aos modelos comportamentais preditivos pode sugerir novas estratégias terapêuticas para os transtornos de humor e ansiedade.

Em conclusão,

1. O modelo de ECV causa hiperreatividade comportamental em camundongos Suíços testados na tarefa de esquiva de duas vias e respostas do tipo ansiosas em animais da linhagem C57Bl/6.
2. A administração crônica de L-histidina não tem efeito reversível ou potencializador nos comportamentos do tipo ansioso em camundongos C57Bl/6.
3. A ansiedade induzida pelo modelo de ECV pode estar relacionada à hipoativação das subregiões pré-límbica e infralímbica do CPFm.
4. A síntese diferencial de Fos em camundongos expostos a um modelo de conflito aproximação-esquiva fornece um mapa funcional de áreas cerebrais sensíveis ao estresse prévio.
5. Diferenças nas respostas comportamentais ao ECV podem estar relacionadas à resiliência variável entre indivíduos e linhagens, sugerindo que a seleção prévia dos camundongos submetidos ao estresse possa facilitar a investigação neurocientífica com modelos animais de ansiedade e depressão.

REFERÊNCIAS

REFERÊNCIAS

- ALBRECHET-SOUZA, L.; BORELLI, K. G.; BRANDÃO, M. L. Activity of the medial prefrontal cortex and amygdala underlies one-trial tolerance of rats in the elevated plus-maze. **J Neurosci Methods**, v. 169, p. 109–118, 2008.
- AMERICAN PSYCHIATRIC ASSOCIATION. **Manual diagnóstico e estatístico de transtornos mentais** (DSM-5). Tradução Maria Inês Corrêa Nascimento et al. 5 ed. Porto Alegre: Artmed, 2014.
- AUGUSTSSON, H. et al. Exploration and risk assessment: a comparative study of male house mice (*Mus musculus musculus*) and two laboratory strains. **Physiol Behav**, v. 81, n. 4, p. 685–698, 2004.
- BENNUR, S. et al. Stress-induced spine loss in the medial amygdala is mediated by tissue plasminogen activator. **Neuroscience**, v. 144, p. 8–16, 2007.
- BLANCHARD, R. J. et al. **Introduction to the handbook on fear and anxiety**. Handbook of Behavioral Neuroscience, v. 17, p. 3–7, 2008.
- BOWMAN, R. E.; BECK, K. D.; LUINE, V. N. Chronic stress effects on memory: sex differences in performance and monoaminergic activity. **Horm Behav**, v. 43, p. 48–59, 2003.
- BRANDÃO, M.L. **Psicofisiologia**. 3 ed. São Paulo: Atheneu, 2012.
- BROWN, R. E.; STEVENS, D. R.; HAAS, H. L. The physiology of brain histamine. **Prog Neurobiol**, v. 63, p. 637–672, 2001.
- CALHOON, G. G.; TYE, K. M. Resolving the neural circuits of anxiety. **Nat Neurosci**, v. 18, n. 10, 2015.
- CAMPOS, A. C. et al. The anxiolytic effect of cannabidiol on chronically stressed mice depends on hippocampal neurogenesis: involvement of the endocannabinoid system. **Int J Neuropsychopharmacol**, v. 16, p. 1407–1419, 2013.
- CANTO-DE-SOUZA, L. et al. Dorsal hippocampal microinjection of chlorpheniramine reverses the anxiolytic-like effects of l-histidine and impairs emotional memory in mice. **Neurosci Lett**, v. 587, p. 11–16, 2015.
- CAROBREZ, A. P.; BERTOGLIO, L. J. Ethological and temporal analyses of anxiety-like behavior: The elevated plus-maze model 20 years. **Neurosci Biobehav Rev**, v. 29, p. 1193–1205, 2005.
- CERQUEIRA, J. J. et al. Prefrontal cortex as a key target of the maladaptive response to stress. **J Neurosci**, v. 27, n. 11, p. 2781–2787, 2007.
- CHADMAN, K. K.; YANG, M.; CRAWLEY, J. N. Criteria for validating mouse models of psychiatric diseases. **Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet**, v. 150B, n. 1, p. 1–11, 2009.

CHOURBAJI, S. et al. Learned helplessness: validity and reliability of depressive-like states in mice. **Brain Res Protoc**, v. 16, p. 70 – 78, 2005.

COLE, J.C.; RODGERS, R.J. Ethological comparison of the effects of diazepam and acute/chronic imipramine on the behaviour of mice in the elevated plus-maze. **Pharmacol Biochem Behav**, v. 52, n. 3, p. 473-478, 1995.

CONNELLY, W. M. et al. The histamine H4 receptor is functionally expressed on neurons in the mammalian CNS. **Br J Pharmacol**, v. 157, p. 55–63, 2009.

CORR, P. J. Approach and Avoidance Behaviour: Multiple Systems and their Interactions. **Emotion Rev**, v. 5, n. 3, 2013.

COURTIN, J. et al. Medial prefrontal cortex neuronal circuits in fear behavior. **Neuroscience**, v. 240, p. 219-42, 2013.

CRESTANI, F. et al. Decreased GABA_A receptor clustering results in enhanced anxiety and a bias for threat cues. **Nat Neurosci**, v. 2, p. 833–9, 1999.

CROTEAU, J. D.; SCHULKIN, J.; SHEPARD, J. D. Behavioral effects of chronically elevated corticosterone in subregions of the medial prefrontal cortex. **Behav Brain Res**, v. 316, p. 82–86, 2017.

CRUZ, F. C. et al. New technologies for examining the role of neuronal ensembles in drug addiction and fear. **Nat Rev Neurosci**, v. 14, 2013.

CRYAN, J. F.; HOLMES, A. The ascent of mouse: advances in modelling human depression and anxiety. **Nat Rev**, v. 4, 2005.

CRYAN, J. F.; MOMBÉREAU, C. In search of a depressed mouse: utility of models for studying depression-related behavior in genetically modified mice. **Mol Psychiatry**, v. 9, n. 4, p. 326-57, 2004.

DAHER, F.; MATTIOLI, R. Impairment in the aversive memory of mice in the inhibitory avoidance task but not in the elevated plus maze through intra-amygdala injections of histamine. **Pharmacol Biochem Behav**, v. 135, p. 237-45, 2015.

DALLEY, J. W.; CARDINAL, R. N.; ROBBINS, T. W. Prefrontal executive and cognitive functions in rodents: neural and neurochemical substrates. **Neurosci Biobehav Rev**, v. 28, p. 771–784, 2004.

DAMASIO, A. R. et al. Subcortical and cortical brain activity during the feeling of self generated emotions. **Nat Neurosci**, v. 3, p. 1049–1056, 2000.

DARWIN, C. **A expressão das emoções nos homens e nos animais**. São Paulo: Companhia das Letras, 2009.

- DAVIDSON, R. J. Anxiety and affective style: role of prefrontal cortex and amygdala. **Biol Psychiatry**, v. 51, p. 68–80, 2002.
- DAVIS, M.; RAINNIE, D.; CASSELL, M. Neurotransmission in the rat amygdala related to fear and anxiety. **Trends Neurosci.**, v. 17, p. 208–214, 1994.
- DAVIS, M. et al. Phasic vs sustained fear in rats and humans: role of the extended amygdala in fear vs anxiety. **Neuropsychopharmacology**, v. 35, p. 105–135, 2010.
- DEAKIN, J. F. W., GRAEFF, F. G. 5-HT and mechanisms of defense. **J. Psychopharmacol.**, v. 5, n. 4, p. 305-315, 1991.
- DERE, E. et al. Neuronal histamine and the interplay of memory, reinforcement and emotions. **Behav Brain Res**, v. 31, n. 215(2), p. 209-20, 2010.
- DEVINSKY, O.; MORRELL, M. J.; VOGT, B. A. Contributions of anterior cingulate cortex to behaviour. **Brain**, v. 118, p. 279–306, 1995.
- DIAS-FERREIRA, E. et al. Chronic stress causes frontostriatal reorganization and affects decision-making. **Science**, v. 325, p. 621– 625, 2009.
- DUNCAN, G. E.; KNAPP, D. J.; BREESE, G. R. Neuroanatomical characterization of Fos induction in rat behavioral models of anxiety. **Brain Res**, v. 713, p. 79-91, 1996.
- ESPEJO, E. F. Structure of the mouse behaviour on the elevated plus-maze test of anxiety. *Behavioural Brain Res*, v. 86, p. 105-112, 1997.
- EHRLISH, I. et al. Amygdala Inhibitory Circuits and the Control of Fear Memory. **Neuron Rev**, v. 62, p. 757-771, 2009.
- FERRARI, P. F. et al. Interindividual Variability in Swiss Male Mice: Relationship between Social Factors, Aggression, and Anxiety. **Physiol Behav**, v. 63, n. 5, p. 821– 827, 1998.
- FINK, G. In retrospect: Eighty years of stress. **Nature**, v. 539, p. 175–176, 2016.
- FRIEDRICH, M. J. Depression Is the Leading Cause of Disability Around the World. **JAMA**, v. 317, n. 15, 2017.
- GARCIA, A. M. B. et al. Effect of different illumination levels on rat behavior in the elevated plus-maze. **Physiol Behav**, v. 85, p. 265-270, 2005.
- GIANLORENÇO, A. C.; CANTO-DE-SOUZA, A.; MATTIOLI, R. L-histidine induces state-dependent memory deficit in mice mediated by H1 receptor. **Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry**, v. 35, n. 1, p. 91-5, 2010.

- GIANLORENÇO, A. C.; CANTO-DE-SOUZA, A.; MATTIOLI, R. Microinjection of histamine into the cerebellar vermis impairs emotional memory consolidation in mice. **Brain Res Bull**, v. 86, p. 134–138, 2011.
- GIANLORENÇO, A. C.; CANTO-DE-SOUZA, A.; MATTIOLI, R. Intra-cerebellar microinjection of histamine enhances memory consolidation of inhibitory avoidance learning in mice via H2 receptors. **Neurosci Lett**, v. 557, p. 159–164, 2013.
- GRAY, N.; McNAUGHTON, P. J. A two-dimensional neuropsychology of defense: fear/anxiety and defensive distance. **Neurosci Biobehav Rev**, v. 28, p. 285-305, 2004.
- GROENEWEGER, H. J.; UYLINGS, H. The prefrontal cortex and the integration of sensory, limbic and autonomic information. **Prog Brain Res**, v. 126, 2000.
- GROSS, C. T.; CANTERAS, N. S. The many paths to fear. **Nature Rev Neurosci**, v. 13, 2012.
- GUIMARÃES, F.S. et al. Hippocampal 5-HT receptors and consolidation of stressful memories. **Behav Brain Res**, v. 58, p. 133-139, 1993.
- HAAS, H.; PANULA, P. The role of histamine and the tuberomamillary nucleus in the nervous system. **Nature Rev**, v. 4, p. 121-129, 2003.
- HAAS, H.L. et al. Histamine in the Nervous System. **Physiol Rev**, v. 88, p. 1183-1241, 2008.
- HAAS, H. L.; SERGEEVA, O. A.; SELBACH, O. Histamine in the Nervous System. **Physiol Rev**, v. 88, n. 3, p. 1183-1241, 2008.
- HERMAN, J. P. Neural control of chronic stress adaptation. **Frontiers Behav Neurosci**, v. 7, 2013. Artigo 61.
- HESSE, H. **Demian**. São Paulo: Bestbolso, 2012.
- ISGOR, C. et al. Delayed effects of chronic variable stress during peripubertal-juvenile period on hippocampal morphology and on cognitive and stress axis functions in rats. **Hippocampus**, v. 14, n. 5, p. 636-48, 2004.
- ITO, C. The role of brain histamine in acute and chronic stresses. **Biomed Pharmacother**, v. 54, p. 263-7, 2000
- JANAK, P. H.; TYE, K. M. From circuits to behaviour in the amygdala. **Nature**, v. 517, p. 284-292, 2015.
- JINKS, A. L.; MCGREGOR, I. S. Modulation of anxiety-related behaviours following lesions of the prelimbic or infralimbic cortex in the rat. **Brain Res**, v. 772, p. 181–190, 1997.

- JOCA, S. R. L.; PADOVAN, C. M.; GUIMARÃES, F. S. Activation of post-synaptic 5-HT_{1A} receptors in the dorsal hippocampus prevents learned helplessness development. **Brain Res**, v. 978, p. 177–184, 2003.
- KANDEL, E. et al. **Princípios de Neurociências**. 5. ed. Porto Alegre: AMGH, 2014.
- KANO, M. et al. Decreased histamine H₁ receptor binding in the brain of depressed patients. **Eur J Neurosci**, v. 20, p. 803–810, 2004.
- KESSLER, R. C. et al. Lifetime prevalence and age-of-onset distributions of DSM-IV disorders in the National Comorbidity Survey Replication. **Arch Gen Psychiatry**, v. 62, p. 593–602, 2005.
- KESSLER, R. C. et al. Development of Lifetime Comorbidity in the World Health Organization World Mental Health Surveys. **Arch Gen Psychiatry**, v. 68, n. 1, p. 90-100, 2011.
- KIM, J. J.; DIAMOND, D. M. The stressed hippocampus, synaptic plasticity and lost memories. **Nat Rev Neurosci**, v. 3, 2002.
- KINCH, M. S. et al. An overview of FDA-approved new molecular entities: 1827–2013. **Drug Discov Today**, v. 19, p. 1033–1039, 2014.
- KNAPSKA, E. et al. Functional anatomy of neural circuits regulating fear and extinction. **Proc Natl Acad Sci**, v. 109, p. 17093–17098, 2012.
- KÖHLER, C. A. et al. Histaminergic mechanisms for modulation of memory systems. **Neural Plast**, p. 1–16, 2011.
- KUMAR, K. V.; KRISHNA, D. R.; PALIT, G. Histaminergic H₁ receptors mediate L-histidine-induced anxiety in elevated plus-maze test in mice. **Behav Pharmacol**, v. 18, p. 213–217, 2007.
- LAU, T. et al. Stress-induced structural plasticity of medial amygdala stellate neurons and rapid prevention by a candidate antidepressant. **Mol Psychiatry**, p. 1–8, 2016.
- LeDOUX, J. Rethinking the emotional brain. **Neuron**, v. 73, p. 653–676, 2012.
- LeDOUX, J. E. The slippery slope of fear. **Trends Cogn Sci**, v. 17, n. 4, 2013.
- LeDOUX, J.E. Coming to terms with fear. **Proc Natl Acad Sci**, v. 111, n. 8, p. 2871–2878, 2014.
- LEHMANN, B. et al. Glucocorticoids orchestrate divergent effects on mood through adult neurogenesis. **J Neurosci**, v. 33, n. 7, p. 2961–2972, 2013.
- LEWIS, M.; HAVILAND-JONES, J. M.; BARRETT, L. F. **Handbook of Emotions**. New York: The Guilford Press, 2008.

- LIM, H. D. et al. Evaluation of histamine H1-, H2-, and H3-receptor ligands at the human histamine H4 receptor: identification of 4-methylhistamine as the first potent and selective H4 receptor agonist. **J Pharmacol Exp Ther.**, v. 314, n. 3, p. 1310-21, 2005.
- LISTER, G. The use of a plus-maze to measure anxiety in the mouse. **Psychopharmacology**, v. 92, p. 180-185, 1987.
- LUPIEN, S. J. et al. Effects of stress throughout the lifespan on the brain, behaviour and cognition. **Nat Rev Neurosci**, v. 10, 2009.
- McEWEN, B. S. Protective and damaging effects of stress mediators. **N Engl J Med**, v. 338, n. 3, 1998.
- McEWEN, B. S. Physiology and neurobiology of stress and adaptation: central role of the brain. **Physiol Rev**, v. 87, p. 873–904, 2007.
- McEWEN, B. S.; MORRISON, J. H. The brain on stress: vulnerability and plasticity of the prefrontal cortex over the life course. **Neuron**, v. 79, p. 16–29, 2013.
- McEWEN, B. S. et al. Mechanisms of stress in the brain. **Nat Neurosci**, v. 18, n. 10, 2015.
- McGAUGH, J. L. The amygdala modulates the consolidation of memories of emotionally arousing experiences. **Annu Rev Neurosci**, v. 27, p. 1–28, 2004.
- McNAUGHTON, N.; CORR, P. J. A two-dimensional neuropsychology of defense: fear/anxiety and defensive distance. **Neurosci Biobehav Rev**, v. 28, p. 285–305, 2004.
- MIKLÓS, I. H.; KOVÁCS, K. J. Functional heterogeneity of the responses of histaminergic neuron subpopulations to various stress challenges. **Eur J Neurosci**, v. 18, p. 3069–3079, 2003.
- MOGHADDAM, A. H. et al. GABA and Histamine Interaction in the Basolateral Amygdala of Rats in the Plus-Maze Test of Anxiety-Like Behaviors. **Pharmacology**, v. 82, n. 1, p. 59-66, 2008.
- MORGAN, M. A.; ROMANSKI, L. M.; LeDOUX, J. E. Extinction of emotional learning: contribution of medial prefrontal cortex. **Neurosci Lett**, v. 163, p. 109–113, 2016.
- MONTEIRO, S. et al. An efficient chronic unpredictable stress protocol to induce stress-related responses in C57BL/6 mice. **Frontiers Psychiatry**, v. 6, 2015. Artigo 6.
- MORGAN, J. I.; CURRAN, T. Stimulus-transcription coupling in the nervous system: involvement of the inducible proto-oncogenes fos and jun. **Annu Rev Neurosci**, v. 14, p. 421-51, 1991.
- MUIGG, P. et al. Differential Stress-Induced Neuronal Activation Patterns in Mouse Lines Selectively Bred for High, Normal or Low Anxiety. **PloS ONE**, v. 4, n. 4, 2009.

MURUA, V. S. et al. Shuttle-box deficits induced by Chronic Variable Stress: reversal by imipramine administration. **Pharmacol Biochem Behav**, v. 38, p. 125-130, 1991.

MURUA, V. S.; MOLINA, V. A. Effects of Chronic Variable Stress and antidepressant drugs on behavioral inactivity during an uncontrollable stress interaction between both treatments. **Behav Neural Biol**, v. 57, p. 87-89, 1992.

NASEHI, M. et al. The effects of dopaminergic drugs in the dorsal hippocampus of mice in the nicotine-induced anxiogenic-like response. **Pharmacol Biochem Behav.**, v 98, n. 3, p. 468-73, 2011.

NESTLER, E. J.; HYMAN, S. E.; MALENKA, R. C. **Molecular Neuropsychopharmacology: a foundations for Clinical Neuroscience**. 2nd ed. New York: Mc Graw Hill, 2009.

PANKSEPP, J. The basic emotional circuits of mammalian brains: do animals have affective lives? **Neurosci Biobehav Rev**, v. 35, p. 1791–1804, 2011.

PAPE, H. -C.; PARE, D. Plastic synaptic networks of the amygdala for the acquisition, expression, and extinction of conditioned fear. **Physiol Rev**, v. 90, p. 419–463, 2010.

PAPP, M.; MORYL, C. Antidepressant-like effects of 1-aminocyclopropanecarboxylic acid and D-cycloserine in an animal model of depression. **European J of Pharmacol**, v. 316, p. 145-151, 1996.

PAXINOS, G.; FRANKLIN, K. B. J. **The mouse brain: in stereotaxic coordinates**. 2 ed. San Diego: Academic, 2001.

PEREZ-GARCÍA, M. et al. Neuropsychological evaluation of everyday memory. **Neuropsychol Rev**, v. 8, n. 4, 1998.

PITTENGER, C.; DUMAN, R. S. Stress, depression, and neuroplasticity: a convergence of mechanism. **Neuropsychopharmacology Rev**, v. 33, p. 88–109, 2008.

PONNUSAMY, R. et al. Amygdala-dependent and amygdala-independent pathways for contextual fear conditioning. **Neuroscience**, v. 147, p. 919–927, 2007.

POST, R. M. The transduction of psychosocial stress into the neurobiology of recurrent affective disorder. **Am J Psychiatry**, v. 149, n. 8, p. 999-1010, 1992.

QUIRK, G. J.; MUELLER, D. Neural mechanisms of extinction learning and retrieval. **Neuropsychopharmacology**, v. 33, p. 56–72, 2008.

RICON, T. et al. Unpredictable chronic stress in juvenile or adult rats has opposite effects, respectively, promoting and impairing resilience. **Stress**, v. 15, n. 1, p. 11-20, 2012.

- RODGERS, R. J.; JOHNSON, J.T. Factor analysis of spatiotemporal and ethological measures in the Murine Elevated Plus-Maze test of anxiety. **Pharmacol Biochem Behav**, v. 52, p. 297-303, 1995.
- RODGERS, R. J. et al. Plus-Maze Retest Profile in Mice: Importance of Initial Stages of Trial 1 and Response to Post-Trial Cholinergic Receptor Blockade. **Pharmacol Biochem Behav**, v. 54, p. 41-50, 1996.
- ROGAN, M. T.; LEDOUX, J. E. Emotion: system, cells, synaptic plasticity. **Cell**, v. 85, p. 469-475, 1996.
- ROSEN, J. B.; SCHULKIN, J. From normal fear to pathological anxiety. **Psychol Rev.**, v. 105, n. 2, p. 325-50, 1998.
- RUSSO, S.J. et al. Neurobiology of resilience. **Nat Neurosci**, v. 15, n. 11, 2012.
- SAGAR, S.; SHARP, F. R., CURRAN, T. Expression of c-fos protein in brain: metabolic mapping at the cellular level. **Science**, v. 240, p. 1328-1331, 1988.
- SAH, P. et al. The amygdaloid complex: anatomy and physiology. **Physiol Rev**, v. 83, p. 803–834, 2003.
- SANTARELLI, L. et al. Requirement of hippocampal neurogenesis for the behavioral effects of antidepressants. **Science**, v. 301, n. 805, 2003.
- SAPOLSKY, R. **The Biology of our best and worst selves**. TED Conference, 2017. Disponível em: <https://www.ted.com/talks/robert_sapolsky_the_biology_of_our_best_and_worst_selves>. Acesso em: 17 ago. 2017.
- SCHWARTZ, J. C. et al. Histaminergic transmission in the mammalian brain. **Physiol Rev**, v. 71, p. 1–51, 1991.
- SCHWEIZER, M. C.; HENNIGER, M. S. H.; SILLABER, I. Chronic Mild Stress (CMS) in mice: of anhedonia, “anomalous anxiolysis” and activity. **PLoS ONE**, v. 4, n. 1, 2009.
- SELIGMAN, M. E.; BEAGLEY, G. Learned helplessness in the rat. **J Comp Physiol Psychol**, v. 88, n. 2, p. 534-41, 1975.
- SELYE, H. A syndrome produced by diverse nocuous agents. **Nature**, v. 138, p. 32, 1936.
- SELYE, H. Stress and the General Adaptation Syndrome. **H Br Med J**, v. 1, p. 1383–1392, 1950.
- SELYE, H. Confusion and controversy in the stress field. **J Hum Stress**, v. 1, p. 37–44, 1975.
- SERAFIM, K. R. et al. L-histidine provokes state-dependent memory retrieval deficit in mice reexposed to the elevated plus-maze. **Braz J Med Biol Res**, v. 43, n. 1, p. 100-106, 2010.

- SHENG, M.; GREENBERG, M. E. The regulation and function of c-fos and other immediate early genes in the nervous system. **Neuron**, v. 4, 477-485, 1990.
- SHORTER, E.; TYRER, P. Separation of anxiety and depressive disorders: blind alley in psychopharmacology and classification of disease. **BMJ**, v. 327, p. 158-60, 2003.
- SIERRA-MERCADO, D. et al. Dissociable roles of prelimbic and infralimbic cortices, ventral hippocampus, and basolateral amygdala in the expression and extinction of conditioned Fear. **Neuropsychopharmacology**, v. 36, p. 529-538, 2011.
- SILVEIRA, M. C. L.; SANDNER, G.; GRAEFF, F. G. Induction of Fos immunoreactivity in the brain by exposure to the elevated plus-maze. **Behav Brain Res**, v. 56, p. 115-118, 1993.
- SINGEWALD, N.; SALCHNER, P.; SHARP, T. Induction of c-fos expression in specific areas of the fear circuitry in rat forebrain by anxiogenic drugs. **Biol Psychiatry**, v. 53, p. 275-283, 2003.
- STOCKMEIER, C. A. et al. Cellular changes in the postmortem hippocampus in major depression. **Biol Psychiatry**, v. 56, p. 640-650, 2004.
- STRAKHOVA, M. I. et al. Localization of histamine H4 receptors in the central nervous system of human and rat. **Brain Res**, v. 1250, p. 41-48, 2009.
- STREKALOVA, T. et al. Stress-induced anhedonia in mice is associated with deficits in forced swimming and exploration. **Neuropsychopharmacology**, v. 29, p. 2007-2017, 2004.
- SUFKAA, K. J. et al. Modeling the anxiety-depression continuum hypothesis in domestic fowl chicks. **Behav Pharmacol**, v. 17, n. 8, 2006.
- SURGET, A. et al. Antidepressants recruit new neurons to improve stress response regulation. **Mol Psychiatry**, v. 16, p. 1177-1188, 2011.
- SZABO, S.; TACHE, Y.; SOMOGYI, A. The legacy of Hans Selye and the origins of stress research: a retrospective 75 years after his landmark brief "Letter" to the Editor of Nature. **Stress**, v. 15, n. 5, p. 472-478, 2012.
- SWANSON, L. W. **Brain Maps: Structure of the Rat Brain**. Amsterdam: Elsevier, 1992.
- SWANSON, L. W.; PETROVICH, G. D. What is the amygdala? **Trends Neurosci**. v. 21, p. 323-331, 1998.
- TAYLOR K. M.; SYNDER, S. H. Brain histamine: rapid apparent turnover altered by restraint and cold stress. **Science**, v. 172, p. 1037-1039, 1971.
- TSUJIMOTO, S. et al. Effects of intracerebroventricular injection of histamine and related compounds on corticosterone release in rats. **Br J Pharmacol**, v. 109, p. 807-813, 1993.

TYRER, P. The case for cothymia: mixed anxiety and depression as a single diagnosis. **Br J Psychiatry**, v. 179, p. 191-193, 2001.

UNIVERSITY OF CAMBRIDGE. **Darwin Correspondence Project 2016**: Darwin's use of the photographs in expression. Cambridge: 2011. Disponível em: <<https://www.darwinproject.ac.uk/emotion-experiment>>. Acesso em: 25 ago. 2017.

VERTES, R. P. Interactions among the medial prefrontal cortex, hippocampus and midline thalamus in emotional and cognitive processing in the rat. **Neuroscience**, v. 142, p. 1–20, 2006.

VIZUETE, M.L. et al. Endogenous histamine induces c-fos expression within paraventricular and supraoptic nuclei. **Neuroreport**, v. 6, p. 1041–1044, 1995.

YANAI, K.; TASHIRO, M. The physiological and pathophysiological roles of neuronal histamine: an insight from human positron emission tomography studies. **Pharmacol Ther**, v. 113, p. 1–15, 2007.

YOON, S. H. et al. Chronic non-social stress affects depressive behaviors but not anxiety in mice. **Korean J Physiol Pharmacol.**, v. 18, n. 3, p. 263-8, 2014.

YOSHIKAWA, T. et al. Insufficient intake of L-histidine reduces brain histamine and causes anxiety-like behaviors in male mice. **J Nutr.**, v. 144, n. 10, p. 1637-41, 2014.

YOSHITOMI, I. et al: Brain histamine turnover enhanced by foot shock. **Brain Res**, v. 362, p. 195–198, 1986.

YUZURIHARA, M. et al. Effects of drugs action as histamine releasers or histamine receptor blockers on an experimental anxiety model in mice. **Pharmacol Biochem Behav**, v. 67, p. 145-150, 2000.

XU, C. et al. Histamine innervation and activation of septohippocampal GABAergic neurones: involvement of local ACh release. **J Physiol**, v. 561, p. 657–670, 2004.

ZARRINDAST, M.-R. et al. The effects of histaminergic agents in the central amygdala of rats in the elevated plus-maze test of anxiety. **Behav Pharmacol**, v. 16, p. 643–649, 2005.

ZARRINDAST, M.-R. et al. Histaminergic system of the lateral septum in the modulation of anxiety-like behaviour in rats. **Eur J Pharmacol**, v. 583, p. 108–114, 2008.

ZURITA, A. et al. Early exposure to chronic variable stress facilitates the occurrence of anhedonia and enhanced emotional reactions to novel stressors: reversal by naltrexone pretreatment. **Behav Brain Res**, v. 117, p. 163–171, 2000.

WALF, A. A.; FRYE, A. C. The use of the elevated plus maze as an assay of anxiety-related behavior in rodents. **Nat Protoc.**, v. 2, n. 2, p. 322-8, 2007.

WANG, M. et al. Synaptic modifications in the medial prefrontal cortex in susceptibility and resilience to stress. **J Neurosci.**, v. 34, n. 22, p. 7485-92, 2014.

WATANABE, T. et al. Distribution of the histaminergic neuron system in the central nervous system of rats; a fluorescent immunohistochemical analysis with histidine decarboxylase as a marker. **Brain Res**, v. 295, p. 13-25, 1984.

WILLNER, P. Chronic Mild Stress (CMS) revisited: consistency and behavioural neurobiological concordance in the effects of CMS. **Neuropsychobiology**, v. 52, p. 90-110, 2005.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Depression and Other Common Mental Disorders: Global Health Estimates**. Geneva: World Health Organization, 2017. Licence: CC BY-NC-SA 3.0 IGO.

APÊNDICE A

1 Análise de comportamentos do tipo depressivo em camundongos C57Bl/6 submetidos ao teste de suspensão pela cauda

A fim de avaliar se camundongos C57Bl/6J expostos ao estresse crônico desenvolveriam comportamento do tipo depressivo, grupos de animais que passaram (ST7) ou não (NST) pelo ECV foram submetidos ao teste de suspensão pela cauda. O teste foi aplicado após 7 dias de ECV para estabelecer uma comparação com os camundongos Suíços.

As três medidas analisadas no teste de suspensão pela cauda foram estatisticamente comparáveis. Os camundongos NST e ST7 apresentaram valores similares de tempo total de imobilidade [$T(17)=0,84$; $p=0,41$], latência para o primeiro episódio de imobilidade [$T(17)=0,31$; $p=0,76$] e tempo gasto imóvel em blocos de 2 min [blocos: $F(2,34)=75,58$; $p<0,01$; condição $F(1,17)=0,71$; $p=0,41$; interação $F(2,34)=0,06$; $p=0,94$] (Figura 25). Para ambos os grupos, a resposta passiva de imobilidade tem um crescente e significativo aumento no intervalo de tempo entre primeiro e segundo blocos, estabilizando-se nos últimos minutos do teste. Esses resultados indicaram que, assim como para linhagem de Suíços, o protocolo de ECI com duração de 7 dias não foi capaz de induzir mudanças comportamentais relacionadas à depressão em camundongos C57Bl/6.

Figura 25 – Análise do comportamento de desamparo em camundongos C57Bl/6 submetidos ao teste de suspensão pela cauda após o estresse crônico variado de 7 dias.

O tempo de imobilidade foi analisado em blocos de 2 min cada para os grupos NST (n=10) e ST7 (n=9; protocolo 3 de ECI). Valores estão apresentados como média $\pm$ erro padrão da média. * $p < 0,05$ comparado ao bloco 0-2 min.

APÊNDICE B

1 Medida indireta da atividade neural

Controle positivo para técnica imunoistoquímica de marcação da proteína Fos: amostras de camundongos Suíços injetados i.p. com pentilenotetrazol (PTZ, 50 mg/kg) foram verificadas previamente aos ensaios de interesse (imagens não apresentadas).

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA

Comissão de Ética no Uso de Animais
Via Washington Luís, km. 235 - Caixa Postal 676
Fones: (016) 3351.8025 / 3351.9679
Fax: (016) 3351.8025
CEP 13560-970 - São Carlos - SP - Brasil
ceua@ufscar.br - www.propq.ufscar.br

Parecer da Comissão de Ética no Uso de Animais nº 044/2013

Protocolo nº. 044/13

A Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal de São Carlos - CEUA/UFSCar **APROVOU** o projeto de pesquisa intitulado "*Envolvimento da histamina neural no desamparo aprendido, memória aversiva e neurogênese pós-natal de camundongos*", submetido pela pesquisadora *Fernanda Daher Pitta*.

São Carlos, 26 de setembro de 2013.

Profa. Dra. Azair Liane Matos do Canto de Souza

Presidente da Comissão de Ética no Uso de Animais

Contents lists available at ScienceDirect

Behavioural Brain Research

journal homepage: www.elsevier.com/locate/bbr

Hypersocial behavior and biological redundancy in mice with reduced expression of PSD95 or PSD93

Daniela Winkler^{a,b,1}, Fernanda Daher^{a,c,1}, Liane Wüstefeld^a, Kurt Hammerschmidt^d, Giulia Poggi^{a,e}, Anna Seelbach^a, Dilja Krueger-Burg^a, Behnam Vafadari^f, Anja Ronnenberg^a, Yanling Liu^g, Leszek Kaczmarek^f, Oliver M. Schlüter^{b,g}, Hannelore Ehrenreich^{a,b,*}, Ekrem Dere^{a,b,*}

^a Clinical Neuroscience, Max Planck Institute of Experimental Medicine, Germany

^b DFG Research Center for Nanoscale Microscopy and Molecular Physiology of the Brain (CNMPB), Göttingen, Germany

^c Laboratory of Neurosciences, Federal University of Sao Carlos, Brazil

^d Cognitive Ethology Laboratory, German Primate Center, Göttingen, Germany

^e Neurobiology Department, Friedrich Miescher Institute for Biomedical Research, Basel, Switzerland

^f Neurobiology Department, Nencki Institute of Experimental Biology, Warsaw, Poland

^g Department of Psychiatry and Psychotherapy, University Medical Center, Göttingen, Germany

ARTICLE INFO

Article history:

Received 31 January 2017

Received in revised form 7 February 2017

Accepted 8 February 2017

Available online xxx

Keywords:

Dyadic social interaction

Social blindness

Aggression

Ultrasonic vocalization

Hypoactivity

Biological redundancy

Substitution effect

ABSTRACT

The postsynaptic density proteins 95 (PSD95) and 93 (PSD93) belong to a family of scaffolding proteins, the membrane-associated guanylate kinases (MAGUKs), which are highly enriched in synapses and responsible for organizing the numerous protein complexes required for synaptic development and plasticity. Genetic studies have associated MAGUKs with diseases like autism and schizophrenia, but knockout mice show severe, complex defects with *difficult-to-interpret* behavioral abnormalities due to major motor dysfunction which is atypical for psychiatric phenotypes. Therefore, rather than studying *loss-of-function* mutants, we comprehensively investigated the behavioral consequences of reduced PSD95 expression, using heterozygous *PSD95* knockout mice (*PSD95*^{+/-}). Specifically, we asked whether heterozygous *PSD95* deficient mice would exhibit alterations in the processing of social stimuli and social behavior. Additionally, we investigated whether *PSD95* and *PSD93* would reveal any indication of functional or biological redundancy. Therefore, homozygous and heterozygous *PSD93* deficient mice were examined in a similar behavioral battery as *PSD95* mutants. We found robust hypersocial behavior in the dyadic interaction test in both *PSD95*^{+/-} males and females. Additionally, male *PSD95*^{+/-} mice exhibited higher levels of aggression and territoriality, while female *PSD95*^{+/-} mice showed increased vocalization upon exposure to an anesthetized female mouse. Both male and female *PSD95*^{+/-} mice revealed mild hypoactivity in the open field but no obvious motor deficit. Regarding *PSD93* mutants, homozygous (but not heterozygous) knockout mice displayed prominent hypersocial behavior comparable to that observed in *PSD95*^{+/-} mice, despite a more severe motor phenotype, which precluded several behavioral tests or their interpretation. Considering that PSD95 and PSD93 reduction provoke strikingly similar behavioral consequences, we explored a potential substitution effect and found increased PSD93 protein expression in hippocampal synaptic enrichment preparations of *PSD95*^{+/-} mice. These data suggest that both PSD95 and PSD93 are involved in processing of social stimuli and control of social behavior. This important role may be partly assured by functional/behavioral and biological/biochemical redundancy.

© 2017 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

The postsynaptic density proteins 95 (PSD95) and 93 (PSD93) are neuronal membrane-associated guanylate kinases [1] that mediate synaptic protein–protein interactions, the trafficking of neurotransmitter receptors and the coupling of membrane-associated binding sites, including NMDA and AMPA receptors with intracellular signaling pathways [2–10]. Pathological alterations of

* Corresponding authors at: Clinical Neuroscience, Max Planck Institute of Experimental Medicine, Göttingen, Germany.

E-mail addresses: ehrenreich@em.mpg.de (H. Ehrenreich), dere@em.mpg.de (E. Dere).

¹ Equal contribution.

synaptic structure and function, named synaptopathies [11], have been implicated in a wide range of neuropsychiatric disorders, including schizophrenia [12], autism [13], Alzheimer's disease [14], and multiple sclerosis [15]. Mutations in genes belonging to the PSD scaffolding proteins lead to disrupted synaptic plasticity causing e.g. mental retardation or affecting sociability in rodents and humans [16–18].

Genetic studies have connected *PSD95* with autism spectrum disorders (ASD) [19,20]. Manipulations that lead to changes in *PSD95* expression can induce deficits in learning and memory performance, impaired motor function and abnormal social behavior in mice [21–25]. Specifically, homozygous *PSD95* deficiency induced aberrant social behavior including increased repetitive behaviors, abnormal communication and enhanced social preference in the tripartite chamber, augmented stress reactivity and anxiety-related responses, as well as distinct motor impairments. The severe motor phenotype of the homozygous *PSD95* knockout mice, however, complicates the interpretation of their behavioral symptoms, and heterozygous *PSD95* mutants have not yet been comprehensively behaviorally examined [17]. In fact, only locomotor activity and beam walking were tested earlier in heterozygous *PSD95* mutants and found to be mildly impaired [26]. Published data on comprehensive behavioral phenotyping of homozygous and heterozygous *PSD93* deficient mice are presently lacking.

In humans, genetic mutations appear mostly in the heterozygous form, leading to lower expression levels rather than to complete absence of the respective protein as provoked in homozygous knockout mice [27,28]. Also, normal gene variation, e.g. single nucleotide polymorphisms in regulatory regions, frequently impact gene expression to a moderate degree while substantially influencing phenotypes [29–31].

In the present study, we investigated whether heterozygous *PSD95* deficient mice, expected to mimic consequences of human *partial loss-of-function* situations, would show any changes in the processing of social stimuli and social behavior. Further, to address whether *PSD95* and *PSD93* may have functionally redundant roles, homozygous and heterozygous *PSD93* deficient mice were examined in a similar behavioral battery as *PSD95* mutants. We report here the surprising finding that *PSD95* and *PSD93* deficiency are both associated with a prominent hypersocial phenotype, indicating a role of these manifold interacting proteins in social information processing.

2. Materials and methods

All experiments were approved by the local *Animal Care and Use Committee* (Niedersächsisches Landesamt für Verbraucherschutz und Lebensmittelsicherheit, Oldenburg, Germany) in accordance with the German Animal Protection Law. In all experiments, the experimenter was unaware of the genotype of mice ('fully blinded').

2.1. Animals and housing

PSD95^{+/-} and *PSD95*^{+/+} as well as *PSD93*^{-/-}, *PSD93*^{+/-} and *PSD93*^{+/+} littermate mice with C57BL/6J background were used for the experiments of the present study. They were bred as reported previously [32–34]. Genotyping PCR was performed with the following primers: For *PSD95*: 5'-CAG GTG CTG CTG GAA GAA GG-3' and 5'-CTA CCC TGT GAT CCA GAG CTG-3', resulting in a product of 255 bp for WT and 355 bp for KO allele; for *PSD93*: 5'-GTG CGG AAT GTT GTT GTG CAG TGC-3' and 5'-CAC AAC AGT CTC CAA TAT GGG TCG C-3' and 5'-TAT CGC CGC TCC CGA TTC GCA GC-3', resulting in a product of 330 bp for WT and 750 bp for KO allele. Males and females were kept in separately ventilated cabinets (Scantainers; Scanbur Karlslunde, Denmark),

group-housed, unless otherwise indicated for tests requiring single housing. They had woodchip bedding, nesting material (paper tissue) and cardboard tubes to be used as playing material and shelters in their home cages and were maintained on a 12 h light-dark cycle (light-off at 7 p.m.), at 20–22 °C, with food and water provided *ad libitum*. Male C57BL/6N mice (Charles River Laboratories GmbH, Sulzfeld, Germany) were used as intruders for the resident-intruder paradigm. Female C57BL/6J mice (provided by the animal facility of Max Planck Institute of Experimental Medicine, Göttingen, Germany) were used as anesthetized stimulus mice for the ultrasonic vocalization test.

2.2. Behavioral methods and procedures

The methods and behavioral procedures of the basic test battery have been described extensively earlier [31,35–40]. In the following, only the tests with abnormal results in the present study are presented in greater detail: Social interaction in pairs, aggression testing, ultrasound vocalization, home cage observation, open field and chimney test. Two independent large cohorts of male and female *PSD95*^{+/-} and *PSD95*^{+/+} littermates and 1 large cohort of male *PSD93*^{-/-}, *PSD93*^{+/-} and *PSD93*^{+/+} littermates underwent the basic and social behavior battery, starting at the age of 3–4 months. Cohort 1 of male and female *PSD95*^{+/-} and *PSD95*^{+/+} mice have been tested in the following tests: Light-dark box, open field, rotarod, buried food finding test, grip strength, marble burying, social interaction in pairs, hole board working and reference memory, Morris water-maze, visual cliff, beam balance, LABORAS, and hot plate. Cohort 2 of male and female *PSD95*^{+/-} and *PSD95*^{+/+} mice were tested in the hole board, social interaction in pairs, ultrasonic vocalization test, resident-intruder test, tail suspension, forced swim test, and chimney test. Behavioral experiments were conducted during light phase (8 a.m.–6 p.m.). Genders were always tested separately. The sequence of tests ensured that inter-test intervals were sufficient to avoid carry-over effects and that the most aversive tests were performed at the end of the battery (final tests).

2.2.1. Social interaction in pairs

The dyadic social interaction test was performed at 130 lx light intensity in a neutral testing cage constructed of grey Perspex (30 × 30 × 30 cm) with fresh sawdust on the ground. Each mouse was individually habituated to the testing cage for 10 min over 2 consecutive days. On day 3, pairs of unfamiliar mice of the same genotype were placed into the testing cage and allowed to interact for 10 min. Encounters were scored by a trained observer from videotapes of the sessions. The following parameters were registered: (i) time (s) spent in close contact, (ii) number of chasing events, (iii) number of nose-to-nose sniffs, (iv) number of anogenital sniffs [31].

2.2.2. Resident-intruder test

Inter-male aggression and territoriality was measured with the resident-intruder test. As standard opponents (intruders), group-housed males (4 weeks younger than resident test males) of the C57BL/6N strain were used. Previously group-housed male mice were single housed for 4 weeks prior to the test. Given that the level of inter-male aggression among C57BL/6 mice is relatively low as compared to other inbred strains, we used a modified version of the resident-intruder paradigm. Here, the home cage of the resident mouse was placed on a hot plate (50 °C) for 10 min prior to testing in order to increase the basal level of aggression using warming. It remained thereafter on a warming pad (set to 38 °C). Additionally, the home cage of the resident was positioned under a heat-emitting red lamp (ambient temperature of 26 °C). An intruder was then introduced into the home cage of the resident; the observation was

stopped at the first attack (defined as a bite) to prevent injury or at a cut-off time of 600 s. In order to minimize the influence of previous defeat experiences, intruders were only used 4 times in total, the latency to attack (s) was recorded using a stop watch [31]. The number of mice attacking the intruder was expressed in %.

2.2.3. Ultrasonic vocalization (USV)

An ultrasound microphone (UltraSoundGate CM16; Avisoft Bioacoustics Berlin, Germany) fixed 28–30 cm above the cage lid was connected to a preamplifier (UltraSoundGate116, Avisoft Bioacoustics, Berlin, Germany), coupled to a notebook computer. PSD95 females were individually housed in Type II standard cages for 3 days prior to the test. Then, they were confronted with an anesthetized female intruder, a paradigm known to induce vocalizations [37,41]. For the anesthetized female intruder condition, intruder mice were injected intraperitoneally (i.p.) with 0.25 % tribromoethanol (0.1 mg/10 g body weight; Sigma-Aldrich, Munich, Germany). USV of resident mice were recorded from their home cage. After 1 min of habituation of the testing mouse within its home cage in the experimental room (12 lx light intensity), the mouse was exposed to a female intruder mouse and USV were recorded for 3 min. The sampling frequency of 300 kHz resulted in a frequency range of 150 kHz. Because background noise below the frequency range of the produced USVs can have a negative influence on the estimations, a high pass FIR filter of 35 kHz was applied. USV were separated from other sounds using the whistles detection algorithm of Avisoft-SASLab5.2 (Avisoft Bioacoustics, Berlin, Germany) with following selection criteria: possible changes per step = 4 (4687 Hz), minimal continuity = 8 ms (adults), possible frequency range = 35–150 kHz. These criteria were positively evaluated in former studies of adult mouse vocalizations. In addition, all estimations of the whistle detection algorithm were visually controlled by an experienced observer. Total number of calls (#) and latency to vocalize (s) per recording session was measured [42].

2.2.4. Behavior in the home cage

To estimate the overall time that mice spent immobile in their home cages, the LABORAS behavior monitoring system (Metris b.v., Hoofddorp, The Netherlands) was applied for overnight recording (after 1 h of habituation to the experimental room, recording from 6 p.m.–9 a.m.). It allows transformation of mechanical vibrations caused by the movement of the animal by force transducers into electrical signals, which are then amplified to a fixed signal range, filtered to eliminate noise, digitized and stored on a computer. Signal analysis techniques classify the signals into specific behavioral categories including times of immobility [37].

2.2.5. Exploratory activity in the open field

Spatial novelty-induced exploratory behavior was measured with an open field set-up. The apparatus consisted of a gray circular Perspex arena (120 cm diameter; wall height 25 cm) with a light intensity of 140 lx in the center of the arena. Each mouse was placed into the center of the open field and allowed to explore it for 7 min. Latency (s) to cross from the center to the periphery, time spent (s) in the peripheral, intermediate, and center zones of the apparatus and the total distance travelled (m) as well as the mean running velocity (mm/s) were measured using an automated tracking software (Viewer2, Biobserve, Bonn, Germany) [35,37].

2.2.6. Chimney test

The chimney test allows the measurement of the ability to step backwards out of a transparent vertical plastic tube of 30 cm length and 3 cm diameter [36]. The mouse was placed into the horizontally oriented tube and gently pushed to its end. Then the ‘chimney’ was put in an upright position and the mouse had to climb backwards up

to leave the tube. Mice were tested once and their escape latencies (s) were recorded to determine their motor performance.

2.3. Real-time quantitative reverse transcription-PCR (qPCR)

The qPCR was performed as described earlier [37] with minor modifications. Briefly, total RNA was isolated, using miRNeasy MiniKit (Qiagen, Hilden, Germany), from hippocampi of 4 week-old mice. This early age was chosen to confirm that PSD95 and PSD93 mRNA was indeed reduced in mutants prior to starting behavioral experiments. Only this way it is possible to attribute behavioral phenotypes of heterozygous mice to changes in PSD95 and PSD93 expression. From 1 µg of RNA, cDNA was synthesized using SuperScript® III Reverse Transcriptase (Thermo Fisher Scientific Life Technologies GmbH, Darmstadt, Germany), oligo-dT and random N6 primers in a total volume of 20 µl. For quantitative reverse transcription-PCR (qPCR), 4 µl cDNA were used as template with 5 µl of Power SYBR Green PCR Master Mix (Thermo Fisher Scientific Life Technologies) and 1 pmol of primers.

The following primers were applied:

PSD95 forward primer: 5'-AGCCCCAGGATATGAGTTGCGAGG-3',
PSD95 reverse primer: 5'-TGTCGGTGCCACCTGCGATG-3',
PSD93 forward primer: 5'-AACTTA TGACCGGGCGATTAAACT-3',
PSD93 reverse primer: 5'-GCTCTTCAATAACAAGCTTGCAATGG-3',

GAPDH forward primer: 5'-CAATGAATACGGCTACA

The qPCR reactions (3 technical replicates) were run on LightCycler® 480 System (Roche, Mannheim, Germany). Relative expression of PSD95 and PSD93 were calculated by the threshold cycle method and normalization to GAPDH.

2.4. Synaptic enrichment preparation and western blot

The synaptic enrichment preparation was done as detailed previously [43] with minor modifications. Briefly, hippocampi were dissected, immediately frozen on dry ice and stored at –80 °C. Tissue was homogenized on ice in 0.32 M sucrose, supplemented with protease inhibitors (50 µg/ml leupeptin, 0.2 mM PMSF, 1 mM sodium orthovanadate, 20 µg/ml aprotinin). Homogenate was centrifuged at 1000 g for 10 min at 4 °C to pellet cell debris and nuclei. Supernatant was centrifuged at 12,000 g for 30 min at 4 °C to obtain the pellet of the crude synaptosome fraction. Pellet was resuspended in RIPA buffer (50 mM Tris/HCl pH7.5, 150 mM NaCl, 1 mM EDTA, 1 % TritonX-100, 0.5 % sodiumdeoxycholate) supplemented with protease inhibitors. Protein concentration was measured by the Lowry method. Protein lysate was denaturated in Laemmli buffer for 20 min at room temperature (RT) and stored at –80 °C. For Western blot, 10 µg were separated by 10 % SDS-PAGE and transferred onto a nitrocellulose membrane with 90 V for 2 h. Membranes were blocked with 5 % milk in Tris-buffered saline-Tween (TBST; 50 mM Tris, 150 mM NaCl, 0.5 % Tween20, pH7.4) for 1 h at RT and incubated with primary antibodies: PSD95 (BD Biosciences 1:600; BD Medical Technology, Franklin Lakes, New Jersey, USA), PSD93 (Chemicon; 1:500; Merck Millipore, Darmstadt, Germany), NMDAR-NR1 (Synaptic Systems; 1:1000; Synaptic Systems, Göttingen, Germany), NMDAR-NR2A (Chemicon; 1:1000), NMDAR-NR2B (Chemicon; 1:1000), AMPAR-GluR1 (Synaptic Systems; 1:1000), α-Tubulin (Sigma-Aldrich 1:10000, St. Louis, Missouri, USA) and GAPDH (Enzo Life Sciences; 1:10000; Enzo Life Sciences, Lörrach, Germany) over night at 4 °C. The next day, membranes were washed with TBST and incubated with IRDye800 conjugated secondary antibodies (Rockland; 1:5000; Rockland antibodies, Limerick, Pennsylvania, USA) for 1 h at RT. After washing, membranes were scanned with Odyssey reader 9201 (LI-COR Biotechnology GmbH, Bad Homburg, Germany) and densitometrically analyzed

with Image Studio software (LI-COR Biotechnology GmbH). Western blot intensities were corrected for inter-blot variability and normalized to housekeeping genes α -Tubulin or GAPDH. Results are presented in percentage of wildtype mean (100%).

2.5. Statistical analyses

All data presented in figures and tables are expressed as mean $\pm$ sem. Data distribution and tests of variance homogeneity were performed using Kolmogorov-Smirnov and Levene tests. Statistically significant outliers were determined with the Grubbs test. Between-group comparisons were performed with either Student *t*-test for independent samples or Mann-Whitney *U* test, dependent on data distribution and variance homogeneity. One-way ANOVA with and without repeated measures was used for data with normal distribution, Kruskal-Wallis test for data without normal distribution. All statistics were performed using SPSSv.17 (IBM; New York City, New York, USA) or Prism4 software (GraphPad Software, San Diego, California, USA). All *p*-values are 2-tailed and considered to be significant if <0.05 .

3. Results

3.1. *PSD95*^{+/-} mice show largely normal behavior with only mild motor slowing in a comprehensive basic behavioral test battery

Both male and female *PSD95*^{+/-} and *PSD95*^{+/+} mice were characterized using an extensive test battery, comprising measures of anxiety, exploratory behavior, impulsivity, motor learning, coordination, muscle strength, sensory function, emotion, motivation and depression, as well as assessments of learning and memory (Table 1). Essentially all tested domains including cognitive tests revealed for both genders and genotypes comparable behavior, except for mildly reduced motor activity in the open field (Fig. 1A–H) and chimney test in mutants (Fig. 1I–J). The mildness of this motor slowing is not only reflected by unimpaired rotarod and beam balance performance (Table 1), but also by similar time spent immobile upon overnight home cage observation (Fig. 1K–L).

3.2. *PSD95*^{+/-} mice exhibit increased social interaction, boosted aggression and enhanced ultrasound vocalization

Male and female *PSD95*^{+/-} and *PSD95*^{+/+} mice were subjected to a test of dyadic social interaction, males additionally to evaluation of aggressive behavior based on territoriality (resident-intruder paradigm), and females to a defined stimulus inducing ultrasound vocalization. *PSD95*^{+/-} mice of both genders exhibited increased interest towards an unfamiliar conspecific in the social interaction in pairs test. They showed this increase in the total time spent in contact, as well as in basically all specific social sub-behaviors, comprising chasing, snout-snout and anogenital sniffs (Fig. 2A–H). This increased sociability of *PSD95*^{+/-} mice was associated in males with enhanced aggression as detected in the resident-intruder paradigm. They had significantly lower attack latencies and a higher aggression probability (% of attacking mice) as compared to their wildtype littermates (Fig. 2I–J). In females, an ultrasonic vocalization test, where mice are confronted with an anesthetized female mouse, revealed that *PSD95*^{+/-} mice had an increased number of calls concomitant with highly reduced latency to the first vocalization (Fig. 2K–L).

3.3. *PSD93*^{-/-} deficient mice show similarly increased social interaction despite their more severe motor impairment

While *PSD95*^{-/-} mice were found to be too severely motor-impaired to obtain reliable test results, male *PSD93*^{-/-} mice could

be tested next to *PSD93*^{+/-} and *PSD93*^{+/+}, even though the basic behavior screening showed, in addition to a general motor slowing phenotype (Fig. 1M–P), also a distinct motor dysfunction. As presented in Table 1, *PSD93*^{-/-} mice were impaired in rotarod and beam balance testing, precluding them from being evaluated in tests requiring e.g. swimming (Morris water maze) or backwards moving out of a tube in the chimney test (Fig. 1Q). In the home cage, however, immobility was still comparable among genotypes (Fig. 1R). Nevertheless, despite their motor disability, *PSD93*^{-/-} mice displayed highly increased sociability in the dyadic social interaction test, while both *PSD93*^{+/-} and *PSD93*^{+/+} mice behaved equivalently normal (Fig. 3A). This result may indicate a similar but less prominent role for PSD93 in these social behaviors since heterozygosity is obviously fully compensated for.

3.4. Reduced PSD95 but increased PSD93 expression in hippocampal synaptic enrichment preparations of heterozygous PSD95 deficient mice

Considering the surprisingly equivalent consequences of PSD93 and PSD95 reduction on social behaviors, we wondered whether PSD93 would reveal any compensatory upregulation upon reduction of PSD95. Quantitative PCR (relative mRNA expression normalized to GAPDH), conducted before the time point of starting behavioral experiments, showed around 50% reduction of *PSD95* mRNA in total hippocampus extracts of *PSD95*^{+/-} mice (*PSD95*^{+/+} 0.393 $\pm$ 0.01 versus *PSD95*^{+/-} 0.171 $\pm$ 0.02; *n* = 5 per group; *p* < 0.0001), while PSD93 mRNA was comparable between *PSD95*^{+/+} and *PSD95*^{+/-} mice (*PSD95*^{+/+} 0.047 $\pm$ 0.01 versus *PSD95*^{+/-} 0.044 $\pm$ 0.01; *n* = 10–12; *p* = 0.27). Western blots, performed after termination of the behavioral battery, confirmed a 30–40% reduction of PSD95 protein expression in the hippocampal synaptic fraction of *PSD95*^{+/-} mice (Table 2). In contrast, no appreciable quantitative changes in the expression of NMDA receptor subunits NR1, NR2A and NR2B or in AMPAR GluR1 expression were detected in these preparations (all *p* > 0.05; Table 2). Interestingly, however, *PSD95*^{+/-} mice of both genders exhibited a significant increase in PSD93 protein in hippocampal preparations already at the age of 4 weeks (Fig. 3B), possibly reflecting partial substitution of PSD93 for PSD95 deficiency.

4. Discussion

In the present study, we show robust ‘hypersocial’ behavior of both male and female heterozygous *PSD95* mutant mice in the dyadic social interaction test. This aberrant social conduct occurs in otherwise widely normally behaving mice as demonstrated by the results of a comprehensive battery of tests, replicated in 2 independent cohorts. Together with the enhanced ultrasound communication in females and boosted aggression in the resident-intruder paradigm in males, this highly interesting social phenotype appears to reflect a general reduction in social distance. This reduction could be the consequence of some sort of ‘social blindness’, i.e. the inability to adequately process and respond to social signals as emitted by conspecifics. The social memory deficits of these mice may support this interpretation [44]).

In fact, to explore whether social memory is affected by partial absence of PSD95, we had previously tested a cohort of *PSD95*^{+/-} mice in an innovative, highly sensitive test of social recognition, the *SocioBox*, and found impaired social recognition in male *PSD95*^{+/-} mice. This interesting result has been included as a sample of mental disease-relevant social pathology in our recent publication of this novel test paradigm [44]. Importantly, non-social learning and memory tests were found unaffected in *PSD95*^{+/-} mice. Likewise the processing of non-social stimuli (e.g. navigation towards visual

Table 1
Basic behavioral screening results of PSD95 and PSD93 mutant mice.

Behavioral paradigms	Age	♂ PSD95 ^{+/-}	♂ PSD95 ^{+/-}	p value	Age	♀ PSD95 ^{+/-}	♀ PSD95 ^{+/-}	p-value	Age	♂ PSD93 ^{+/-}	♂ PSD93 ^{+/-}	♂ PSD93 ^{-/-}	p value
	month	(n)	(n)		month	(n)	(n)		month	(n)	(n)	(n)	
Anxiety and activity													
Light dark box (time light box [%])	5	20 ± 4.3	22 ± 6.9	U(76.0); p = 0.422	7	18 ± 2.8	13 ± 2.0	t(35) = 1.313; p = 0.198	6	30 ± 5.9	19 ± 2.8	24 ± 7.3	F(2,32) = 0.921; p = 0.4083
		(9)	(21)			(12)	(25)			(9)	(14)	(12)	
Exploratory behavior													
Hole board (holes visited [#])	3	24.4 ± 2	21.8 ± 2	t(32) = 0.913; p = 0.368	3	17.1 ± 1	17.2 ± 2	t(31) = 0.042; p = 0.967		n.t.	n.t.	n.t.	n.t.
		(14)	(20)			(16)	(17)						
Impulsivity													
Marble burying (marble buried [#])	4	15.1 ± 1.4	15.2 ± 1.0	U(89.0); p = 0.820	7	3.3 ± 1	5.3 ± 1	t(35) = 1.632; p = 0.112	4	14.4 ± 2.7	15.5 ± 1.0	11.8 ± 2.0	F(2,37) = 1.410; p = 0.257
		(9)	(21)			(12)	(25)			(9)	(19)	(12)	
Motor learning and coordination													
Rotarod day 1 (latency to fall [s])	3	89.6 ± 11	99.4 ± 10	t(28) = 0.603; p = 0.551	4	138 ± 12	140 ± 11	t(36) = 0.129; p = 0.899	3	108 ± 12	71.5 ± 6.5	52.4 ± 5.0	F(2,38) = 9.952; p < 0.001
		(9)	(21)			(13)	(25)			(9)	(20)	(12)	
Rotarod day 2 (latency to fall [s])	3	147 ± 18	130 ± 8.8	t(28) = 0.897; p = 0.377	4	182 ± 13	168 ± 13	U(159.5); p = 0.939	3	136 ± 15	97.7 ± 8.8	61.3 ± 6.1	F = 10.150; p < 0.001
		(9)	(21)			(13)	(25)			(9)	(20)	(11)	
Beam balance (8 mm beam latency [s])	8	33.0 ± 8.6	28.2 ± 4.9	U(90.0); p = 0.981	8	18.4 ± 4.7	23.5 ± 3.9	U(119.5); p = 0.548	7	18.3 ± 7.0	79.4 ± 15.7	140 ± 18	X ² (2) = 13.61; p = 0.001
		(9)	(20)			(11)	(25)			(9)	(14)	(12)	
Muscle strength													
Grip strength [au]	4	130 ± 3.5	128 ± 2.8	t(28) = 0.307; p = 0.761	4	137 ± 4	130 ± 2	t(35) = 1.856; p = 0.072	6	107.4 ± 7.4	102.8 ± 5.1	107.1 ± 6.4	U(0.565); p = 0.754
		(9)	(21)			(12)	(25)			(9)	(14)	(12)	
Heat/pain perception													
Hot plate (latency to lick [s])	8	12 ± 0.9	13 ± 0.6	t(29) = 0.587; p = 0.562	8	13 ± 0.7	13 ± 0.4	t(35) = 0.104; p = 0.918	8	11.0 ± 0.6	11.3 ± 0.4	11.2 ± 0.6	F(2,32) = 0.099; p = 0.906
		(10)	(21)			(12)	(25)			(9)	(14)	(12)	
Vision													
Visual cliff (time on "air" side [%])	7	28.3 ± 6	18.3 ± 4	t(29) = 1.423; p = 0.166	7	30.9 ± 4	23.1 ± 3	t(35) = 1.597; p = 0.119	4	30.3 ± 4.4	25.1 ± 2.2	29.2 ± 2.7	F(2,37) = 0.988; p = 0.382
		(10)	(21)			(12)	(25)			(9)	(19)	(12)	
Olfaction													
Buried food test (latency to find cookie [s])	4	91 ± 23	115 ± 21	U(87.0); p = 0.751	6	210 ± 33	227 ± 18	U(146.5); p = 0.922	4	88.6 ± 23.8	59.8 ± 11.3	50.3 ± 16.0	X ² (2) = 1.997; p = 0.368
		(9)	(21)			(12)	(25)			(9)	(18)	(11)	

Table 1 (Continued)

Behavioral paradigms	Age	♂ PSD95 ^{+/+}	♂ PSD95 ^{+/-}	p value	Age	♀ PSD95 ^{+/+}	♀ PSD95 ^{+/-}	p-value	Age	♂ PSD93 ^{+/+}	♂ PSD93 ^{+/-}	♂ PSD93 ^{-/-}	p value
	month	(n)	(n)		month	(n)	(n)		month	(n)	(n)	(n)	
Depression tests													
Tail suspension (immobility [s])	7	169 ± 9.1 (13)	171 ± 5.9 (18)	t(29) = 0.216; p = 0.831	8	147 ± 14 (14)	163 ± 8.5 (14)	t(26) = 0.947; p = 0.352	11	160 ± 14 (9)	63 ± 15 (11)	n.t.	t(18) = 4.567; p < 0.001
Forced swim test (immobility [s])	7	104 ± 16.4 (13)	83 ± 11.6 (18)	t(29) = 1.065; p = 0.296	8	85 ± 14 (13)	51 ± 10.4 (14)	t(25) = 1.995; p = 0.057	13	47 ± 8.0 (8)	34 ± 8.6 (10)	n.t.	t(16) = 1.069; p = 0.301
Learning and memory													
Morris water maze													
Hidden platform, day 1 (latency [s])	6	57.75 ± 6.18	66.84 ± 2.73	F(1,28) = 1.751; p = 0.196 ^a	7	68.54 ± 4.75	67.09 ± 2.59	F(1,35) = 0.058; p = 0.811 ^a	6	68.22 ± 5.26	72.43 ± 3.21	n.t.	F(1,21) = 1.346; p = 0.259 ^a
Hidden platform, day 8 (latency [s])		10.22 ± 2.34	15.88 ± 1.79			26.81 ± 4.49	28.82 ± 4.76			21.30 ± 8.47	15.55 ± 3.22	n.t.	
Hidden probe trial, (time target zone [%])		48.82 ± 2.62	47.64 ± 3.30	t(28) = 0.219; p = 0.829		43.31 ± 4.23	38.22 ± 3.02	t(35) = 0.975; p = 0.339		37.16 ± 3.10	36.42 ± 3.23	n.t.	t(21) = 0.156; p = 0.878
Reversal, day 1 (escape latency [s])		51.51 ± 7.39	48.81 ± 4.31	F(1,28) = 0.110; p = 0.743 ^a		51.16 ± 7.51	54.33 ± 4.54	F(1,35) = 0.010; p = 0.922 ^a		47.08 ± 6.37	50.60 ± 8.10	n.t.	F(1,21) = 0.001; p = 0.970 ^a
Reversal, day 4 (escape latency [s])		15.26 ± 2.86	15.87 ± 2.34			30.41 ± 6.51	25.06 ± 3.57			28.37 ± 5.23	22.23 ± 5.53	n.t.	
Reversal probe trial, (time target zone[%])		37.19 ± 2.26 (9)	35.57 ± 1.71 (21)	t(28) = 0.539; p = 0.594		33.80 ± 4.55 (12)	30.08 ± 2.19 (25)	t(35) = 0.758; p = 0.454		24.56 ± 4.00 (9)	23.21 ± 2.68 (14)	n.t.	t(21) = 0.291; p = 0.774
Hole board working and reference memory	5				6				5				
Hole board reference memory (errors [#]) (final performance level on day 6)		0.17 ± 0.12 (9)	0.31 ± 0.08 (21)	t(28) = 0.981; p = 0.335		0.88 ± 0.34 (12)	1.00 ± 0.25 (25)	U(129.5); p = 0.514		0.44 ± 0.21 (9)	0.68 ± 0.20 (14)	0.38 ± 0.11 (12)	X ² (2) = 1.049; p = 0.592
Hole board working memory (errors [#]) (final performance level on day 6)		2.44 ± 0.60 (9)	2.45 ± 0.25 (21)	t(28) = 0.015; p = 0.9885		2.67 ± 0.59 (12)	2.78 ± 0.50 (25)	U(146.0); p = 0.910		1.67 ± 0.36 (9)	1.61 ± 0.29 (14)	2.13 ± 0.42 (12)	X ² (2) = 0.776; p = 0.678

^a 2way-ANOVA with repeated measurements over 8 respectively 4 consecutive days of hidden platform or reversal learning performance. n.t.: not tested.

Fig. 1. Mild motor slowing of heterozygous PSD mutants.

A–L: *PSD95*^{+/−} and *PSD95*^{+/+} mice of both genders were tested: Open field parameters (A–H), chimney test (I–J) and time spent immobile in an overnight home cage observation (LABORAS) (K–L) reveal mild reduction of activity in male and female *PSD95*^{+/−} mice. Note: *PSD95*^{−/−} mice were not tested due to their severe motor phenotype. M–R: Male *PSD93*^{+/+}, *PSD93*^{+/−} and *PSD93*^{−/−} mice were tested in parallel: Open field parameters (M–P), chimney test (Q) and time spent immobile in an overnight home cage observation (LABORAS) (R) reveal reduction of activity, mild in *PSD93*^{+/−} and more severe in *PSD93*^{−/−} mice. Male and female *PSD95*^{+/−} and *PSD95*^{+/+} mice were tested at the age of 4.5 months in the open field. LABORAS and chimney tests were performed at the age of 8 and 9 months, respectively. Male *PSD93*^{+/+}, *PSD93*^{+/−} and *PSD93*^{−/−} mice were tested in the open field at the age of 3.5 months. LABORAS and chimney test were performed at the age of 7.5 and 8 months, respectively. Bars represent mean ± sem. Sample sizes are indicated in the bars. Numbers on top denote p values, all 2-tailed, derived from t-tests for independent samples, Mann-Whitney U tests or 1-way analysis of variance, dependent on data distribution and number of groups to be compared. Detailed statistics of corresponding figures: B: Mann-Whitney U = 84.5; p = 0.665. C: t-test for independent samples t(28) = 3.193; p = 0.004. D: t-test for independent samples t(28) = 3.205; p = 0.003. F: Mann-Whitney U = 133.0; p = 0.470. G: Mann-Whitney U = 60.0; p = 0.001. H: t-test for independent samples t(36) = 3.546; p = 0.001. I: Mann-Whitney U = 60.5; p = 0.037. J: Mann-Whitney U = 57.0; p = 0.101. K: t-test for independent samples t(29) = 0.020; p = 0.984. L: t-test for independent samples t(35) = 1.644; p = 0.109. N: 1-way analysis of variance F(2,38) = 23.91; p < 0.001. O: Kruskal-Wallis test $\chi^2(2)$ = 13.544; p = 0.001. P: 1-way analysis of variance F(2,38) = 9.474; p = 0.001. Q: t-test for independent samples t(19) = 1.145; p = 0.266. R: 1-way analysis of variance F = 0.479; p = 0.624.

Table 2

Protein expression in hippocampal synaptic enrichment fractions (9 months old mice were analyzed after completion of behavioral tests; data normalized to α -Tubulin and percentage of wildtype mean presented; mean ± sem; t-test for independent samples).

Protein	<i>PSD95</i> ^{+/+} females	<i>PSD95</i> ^{+/−} females	Statistics	<i>PSD95</i> ^{+/+} males	<i>PSD95</i> ^{+/−} males	Statistics
PSD95	100.0 ± 7.97 (n = 8)	60.97 ± 3.34 (n = 8)	t(14) = 4.515; p < 0.001	100.0 ± 5.86 (n = 8)	70.43 ± 3.72 (n = 7)	t(13) = 4.118; p = 0.001
NMDAR-NR1	100.0 ± 10.38 (n = 8)	83.35 ± 8.95 (n = 8)	t(14) = 1.214; p = 0.245	100.0 ± 10.41 (n = 8)	94.28 ± 5.43 (n = 7)	t(13) = 0.466; p = 0.649
NMDAR-NR2A	100.0 ± 15.36 (n = 8)	83.75 ± 12.69 (n = 8)	t(14) = 0.816; p = 0.428	100.0 ± 7.17 (n = 8)	89.67 ± 5.82 (n = 8)	t(14) = 1.119; p = 0.282
NMDAR-NR2B	100.0 ± 11.24 (n = 8)	81.62 ± 9.68 (n = 8)	t(14) = 1.239; p = 0.236	100.0 ± 10.61 (n = 7)	96.91 ± 11.82 (n = 8)	t(13) = 0.192; p = 0.851
AMPA-GluR1	100.0 ± 8.30 (n = 6)	89.55 ± 13.13 (n = 8)	t(12) = 0.619; p = 0.546	100.0 ± 4.85 (n = 8)	90.87 ± 4.19 (n = 8)	t(14) = 1.425; p = 0.176

cues or buried food finding), and the behavioral reactions to these stimuli was not altered in *PSD95*^{+/−} mice. Together, these data suggest a prominent role of PSD95 in the processing of social stimuli and the resulting control of social behavior.

Surprisingly, homozygous *PSD93* deficient mice revealed a highly similar hypersocial phenotype, indicating that both PSD95 and PSD93 are particularly important at synapses involved in processing of social signals and control of social behavior. An increase in PSD93 protein expression in the hippocampal synaptic fraction

of *PSD95*^{+/−} mice may even point to a partial substitution effect of these proteins for each other. Since *PSD93* mRNA expression is unaltered, this increase may be due to an increase in translation, half-life or in trafficking of the PSD93 protein to the synapse.

In contrast to the heterozygous mice tested here, the homozygous male *PSD95* deficient mice have been reported earlier to display a complex behavioral phenotype, including highly reduced locomotion and impaired motor performance, decreased spontaneous alternation in T-maze, increased stereotypical behavior in

Fig. 2. Hypersocial behavior of male and female heterozygous *PSD95* mutant mice. A–H: *PSD95* $^{+/-}$ and *PSD95* $^{+/+}$ mice of both genders were tested in the dyadic social interaction test. Overall time spent in social contact (A, E) as well as social sub-behaviors, chasing (B, F), snout (C, G) and anogenital sniff (D, H) were increased in both genders. I–J: Male mutants showed higher aggression. K–L: Female mutants displayed increased vocalizations. The dyadic social interaction test was performed with 5.5 months old male and 6 months old female *PSD95* $^{+/-}$ and *PSD95* $^{+/+}$ mice. Resident-intruder tests were performed with 7 months old male *PSD95* $^{+/-}$ and *PSD95* $^{+/+}$ mice, vocalization tests with 5 months old female *PSD95* $^{+/-}$ and *PSD95* $^{+/+}$ mice. Bars represent mean $\pm$ sem. Sample sizes are indicated in the bars (in the dyadic tests, these numbers refer to pairs). Numbers on top denote p values, all 2-tailed, derived from *t*-tests for independent samples or Mann-Whitney *U* tests, dependent on data distribution. A: *t*-test for independent samples $t(15) = 5.266$; $p < 0.001$. B: Mann-Whitney $U = 20.0$; $p = 0.140$. C: *t*-test for independent samples $t(15) = 3.170$; $p = 0.006$. D: *t*-test for independent samples $t(15) = 1.839$; $p = 0.086$. I: Mann-Whitney $U = 62.5$; $p = 0.036$. J: Mann-Whitney $U = 68.5$; $p = 0.026$. E: *t*-test for independent samples $t(14) = 3.315$; $p = 0.005$. F: *t*-test for independent samples $t(14) = 3.447$; $p = 0.004$. G: *t*-test for independent samples $t(14) = 3.849$; $p = 0.002$. H: *t*-test for independent samples $t(14) = 2.658$; $p = 0.019$. K: Mann-Whitney $U = 32.0$; $p = 0.004$. L: *t*-test for independent samples $t(25) = 4.547$; $p = 0.001$.

terms of self-grooming, altered impulsivity and ultrasound vocalizations, and increased stress reactivity as well as anxiety-related responses. They exerted normal behavior in the social interaction in pairs test but higher preference for social stimuli and better

social memory in the tripartite chamber [17]. It is not surprising that the heterozygous *PSD95* deficient mice of the present study show normal behavior in most of these tests except for the reduced locomotion that is also evident (but much more prominent) in

Fig. 3. *PSD95* and *PSD93* serve similar social functions and may partly substitute for each other. A: Social interaction in pairs of 5 months old male *PSD93*^{-/-} (but not of *PSD93*^{+/-}) mice reveals hypersocial behavior comparable to *PSD95*^{+/-} mice. B: *PSD93* protein expression (normalized to GAPDH) is increased in hippocampal synaptic enrichment preparations of *PSD95*^{+/-} mice already at 4 weeks. Sample blots are shown below. Bars represent mean $\pm$ sem. Sample sizes are indicated in the bars (in the dyadic tests, these numbers refer to pairs). Gender distribution of samples: *PSD95*^{+/+} females n = 5, males n = 8; *PSD95*^{+/-} females n = 7, males n = 13. Numbers on top denote p values, all 2-tailed, derived from Kruskal-Wallis test $\chi^2(2) = 9.432$; $p = 0.003$ (A) and t-test for independent samples $t(31) = 3.008$; $p = 0.005$ (B).

homozygous *PSD95* deficient mice. In fact, *PSD95* may still be sufficiently expressed to fulfill its main tasks. In addition, *PSD93* protein is increased and may partly compensate for the reduction in *PSD95*. However, it is very remarkable that the heterozygous *PSD95* deficient mice show a social behavior profile quite distinct from the homozygous mice. The underlying mechanisms for this dissociating phenotypical consequence of reduction versus loss of *PSD95* still remain to be defined. In any case, differences between the behavioral phenotypes of homozygous and heterozygous *PSD95* deficient mice might in part be related to NMDA and AMPA receptor functions which are likely more disturbed in homozygous *PSD95* deficient mice [2]. Accordingly, no gross changes in expression of NMDA receptor subunits NR1, NR2A and NR2B or in AMPAR GluR1 were detected here in heterozygous *PSD95* deficient mice.

The increase in *PSD93* protein in the hippocampus of heterozygous *PSD95* deficient mice might in the sense of biological redundancy help attenuate deficits caused by reduction in *PSD95*. However, unidirectional changes in social behavior of *PSD95* and *PSD93* deficient mice suggest that both synaptic proteins are essential for the processing of social signals and control of social behavior and that the functional compensation for each other is not complete. On the other hand, the combination of reduced *PSD95* and increased *PSD93* expression in heterozygous *PSD95* deficient mice might alter synaptic function in neuronal circuits that are important for the processing of social stimuli, thereby amplifying inappropriate social behaviors in heterozygous *PSD95* deficient mice. On the other hand, the combination of reduced *PSD95* and increased *PSD93* expression in heterozygous *PSD95* deficient mice might alter synaptic function in neuronal circuits that are important for the processing of social stimuli, thereby amplifying inappropriate social behaviors in heterozygous *PSD95* deficient mice.

While homozygous *PSD95* deficient mice show enhanced synaptic long-term potentiation, homozygous *PSD93* deficient mice exhibit deficits in synaptic long-term potentiation together with impaired performance in a touchscreen-based object-location task, similar to humans with *DLG2* CNV deletions [9,45]. Despite prominent expression of *PSD93* in the cerebellum, cerebellar synaptic function and motor coordination performance was reported to be

normal in homozygous *PSD93* deficient mice [33]. In contrast to these previous reports, we found normal learning and memory performance in the hole board paradigm, but impaired motor coordination performance in beam balance and rotarod in homozygous *PSD93* deficient mice.

The social behavioral phenotypes of heterozygous *PSD95* and homozygous *PSD93* deficient mice are distinct from the behavioral phenotypes observed in mouse models of autism with synaptic gene deletion mimicking human monogenetic forms of autism. While these models typically show reduced social interactions, dampened inter-male aggression, diminished vocalization, increased stereotypic behavior and hyperactivity [37,41,42,46–50], heterozygous male and female *PSD95* deficient mice exhibit opposite phenotypes including hyper-sociability, increased inter-male aggression, augmented vocalization, and mild hypoactivity. The molecular explanation for this contrasting phenotypical consequence can at present only be speculated on: Whereas PSD proteins are responsible for organizing multiple protein complexes required for synaptic development and plasticity, most synaptic proteins mutated in monogenetic autism, like neuroligins, neurexins or shanks, have more specific and narrower functions at the synapse. But even in these monogenetic conditions, the underlying autism-causing molecular mechanisms are still far from being understood. Deficiency in the pivotal PSD ‘organizer proteins’ does not only lead to a remarkable motor phenotype (which is absent in the aforementioned synaptic gene mutants) but may also cause a more global social deficiency which we like to address here with the working term ‘social blindness’, expressed by loss of social distance in the absence of social recognition.

5. Conclusions

The aberrant social behaviors of both male and female heterozygous *PSD95* deficient mice and partially also of homozygous *PSD93* knockout mice might be most parsimoniously explained by a deficit in the processing and response to social stimuli leading to lack of social distance. As such, heterozygous *PSD95* deficient mice could be used to model some aspects of the social disinhibition phenotype

that is observed in a number of neuropsychiatric diseases including various forms of mental retardation.

Author contributions

Concept and design of the study: HE, supported by ED, LK, and OMS

Data acquisition and analysis: DW, FD, LW, KH, GP, AS, DKB, BV, AR, YL

Drafting the manuscript and figures: HE, ED

All authors read and approved the final version of the manuscript.

Conflict of interest statements

Authors declare no conflict of interest.

Acknowledgements

This work was supported by the Max Planck Society, the Max Planck Förderstiftung, the DFG (CNMPB), EXTRABRAIN EU-FP7, as well as by EU-AIMS. The research of EU-AIMS receives support from the Innovative Medicines Initiative Joint Undertaking under grant agreement n° 115300, resources of which are composed of financial contribution from the European Union's Seventh Framework Programme (FP7/2007–2013), from the EFPIA companies, and from Autism Speaks. FD was supported by FAPESP (Research Internship Abroad (BEPE), 2014/18795-2).

References

- [1] R.H. Scannevin, R.L. Huganir, Postsynaptic organization and regulation of excitatory synapses, *Nat. Rev. Neurosci.* 1 (2) (2000) 133–141.
- [2] X. Chen, J.M. Levy, A. Hou, C. Winters, R. Azzam, A.A. Sousa, R.D. Leapman, R.A. Nicoll, T.S. Reese, PSD-95 family MAGUKs are essential for anchoring AMPA and NMDA receptor complexes at the postsynaptic density, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 112 (50) (2015) E6983–6992.
- [3] H.C. Kornau, L.T. Schenker, M.B. Kennedy, P.H. Seeburg, Domain interaction between NMDA receptor subunits and the postsynaptic density protein PSD-95, *Science* 269 (5231) (1995) 1737–1740.
- [4] O.M. Schluter, W. Xu, R.C. Malenka, Alternative N-terminal domains of PSD-95 and SAP97 govern activity-dependent regulation of synaptic AMPA receptor function, *Neuron* 51 (1) (2006) 99–111.
- [5] W. Xu, O.M. Schluter, P. Steiner, B.L. Czervionke, B. Sabatini, R.C. Malenka, Molecular dissociation of the role of PSD-95 in regulating synaptic strength and LTD, *Neuron* 57 (2) (2008) 248–262.
- [6] M.J. Parker, S. Zhao, D.S. Bredt, J.R. Sanes, G. Feng, PSD93 regulates synaptic stability at neuronal cholinergic synapses, *J. Neurosci.* 24 (2) (2004) 378–388.
- [7] A.E. El-Husseini, E. Schnell, D.M. Chetkovich, R.A. Nicoll, D.S. Bredt, PSD-95 involvement in maturation of excitatory synapses, *Science* 290 (5495) (2000) 1364–1368.
- [8] E. Kim, K.O. Cho, A. Rothschild, M. Sheng, Heteromultimerization and NMDA receptor-clustering activity of Chapsyn-110, a member of the PSD-95 family of proteins, *Neuron* 17 (1) (1996) 103–113.
- [9] H.J. Carlisle, A.E. Fink, S.G. Grant, T.J. O'Dell, Opposing effects of PSD-93 and PSD-95 on long-term potentiation and spike timing-dependent plasticity, *J. Physiol.* 586 (24) (2008) 5885–5900.
- [10] J.M. Kruger, P.D. Favaro, M. Liu, A. Kitlinska, X. Huang, M. Raabe, D.S. Akad, Y. Liu, H. Urlaub, Y. Dong, Differential roles of postsynaptic density-93 isoforms in regulating synaptic transmission, *J. Neurosci.* 33 (39) (2013) 15504–15517.
- [11] S.G. Grant, Synaptopathies: diseases of the synaptome, *Curr. Opin. Neurobiol.* 22 (3) (2012) 522–529.
- [12] J. Hall, S. Trent, K.L. Thomas, M.C. O'Donovan, M.J. Owen, Genetic risk for schizophrenia: convergence on synaptic pathways involved in plasticity, *Biol. Psychiatry* 77 (1) (2015) 52–58.
- [13] H.Y. Zoghbi, Postnatal neurodevelopmental disorders: meeting at the synapse, *Science* 302 (5646) (2003) 826–830.
- [14] D.T. Proctor, E.J. Coulson, P.R. Dodd, Reduction in post-synaptic scaffolding PSD-95 and SAP-102 protein levels in the Alzheimer inferior temporal cortex is correlated with disease pathology, *J. Alzheimers Dis.* 21 (3) (2010) 795–811.
- [15] G. Mandolesi, A. Gentile, A. Musella, D. Fresegha, F. De Vito, S. Bullitta, H. Sepman, G.A. Marfia, D. Centonze, Synaptopathy connects inflammation and neurodegeneration in multiple sclerosis, *Nat. Rev. Neurol.* 11 (12) (2015) 711–724.
- [16] J. Chen, S. Yu, Y. Fu, X. Li, Synaptic proteins and receptors defects in autism spectrum disorders, *Front. Cell. Neurosci.* 8 (2014) 276.
- [17] M. Feyder, R.M. Karlsson, P. Mathur, M. Lyman, R. Bock, R. Momenan, J. Munasinghe, M.L. Scattoni, J. Ihne, M. Camp, et al., Association of mouse *dlg4* (PSD-95) gene deletion and human *DLG4* gene variation with phenotypes relevant to autism spectrum disorders and williams' syndrome, *Am. J. Psychiatry* 167 (12) (2010) 1508–1517.
- [18] P. Tarpey, J. Parnau, M. Blow, H. Woffendin, G. Bignell, C. Cox, J. Cox, H. Davies, S. Edkins, S. Holden, et al., Mutations in the *DLG3* gene cause nonsyndromic X-linked mental retardation, *Am. J. Hum. Genet.* 75 (2) (2004) 318–324.
- [19] T. Bourgeron, From the genetic architecture to synaptic plasticity in autism spectrum disorder, *Nat. Rev. Neurosci.* 16 (9) (2015) 551–563.
- [20] A. de Bartolomeis, G. Latte, C. Tomasetti, F. Iasevoli, Glutamatergic postsynaptic density protein dysfunctions in synaptic plasticity and dendritic spines morphology: relevance to schizophrenia and other behavioral disorders pathophysiology, and implications for novel therapeutic approaches, *Mol. Neurobiol.* 49 (1) (2014) 484–511.
- [21] H. Park, J. Yang, R. Kim, Y. Li, Y. Lee, J. Park, D. Lee, H. Kim, E. Kim, Mice lacking the PSD-95-interacting E3 ligase, *Dorfin/Rnf19a*, display reduced adult neurogenesis, enhanced long-term potentiation, and impaired contextual fear conditioning, *Sci. Rep.* 5 (2015) 16410.
- [22] H. Nagura, Y. Ishikawa, K. Kobayashi, K. Takao, T. Tanaka, K. Nishikawa, H. Tamura, S. Shiosaka, H. Suzuki, T. Miyakawa, et al., Impaired synaptic clustering of postsynaptic density proteins and altered signal transmission in hippocampal neurons, and disrupted learning behavior in PDZ1 and PDZ2 ligand binding-deficient PSD-95 knockin mice, *Mol. Brain* 5 (2012) 43.
- [23] M. Migaud, P. Charlesworth, M. Dempster, L.C. Webster, A.M. Watabe, M. Makhinson, Y. He, M.F. Ramsay, R.G. Morris, J.H. Morrison, Enhanced long-term potentiation and impaired learning in mice with mutant postsynaptic density-95 protein, *Nature* 396 (6710) (1998) 433–439.
- [24] P.J. Fitzgerald, C.R. Pinard, M.C. Camp, M. Feyder, A. Sah, H.C. Bergstrom, C. Graybeal, Y. Liu, O.M. Schluter, S.G. Grant, et al., Durable fear memories require PSD-95, *Mol. Psychiatry* 20 (7) (2015) 913.
- [25] A. Elkobi, I. Ehrlich, K. Belevsky, L. Barki-Harrington, K. Rosenblum, ERK-dependent PSD-95 induction in the gustatory cortex is necessary for taste learning, but not retrieval, *Nat. Neurosci.* 11 (10) (2008) 1149–1151.
- [26] J. Zhang, T. Saur, A.N. Duke, S.G. Grant, D.M. Platt, J.K. Rowlett, O. Isacson, W.D. Yao, Motor impairments, striatal degeneration, and altered dopamine-glutamate interplay in mice lacking PSD-95, *J. Neurogenet.* 28 (1–2) (2014) 98–111.
- [27] S.G. Schwab, D.B. Wildenauer, Genetics of psychiatric disorders in the GWAS era: an update on schizophrenia, *Eur. Arch. Psychiatry Clin. Neurosci.* 263 (2013) S147–S154.
- [28] K.M. Erslund, A. Christoforou, C. Stansberg, T. Espeseth, M. Mattheisen, M. Mattingsdal, G.A. Hardarson, T. Hansen, C.P.D. Fernandes, S. Giddaluru, et al., Gene-Based analysis of regionally enriched cortical genes in GWAS data sets of cognitive traits and psychiatric disorders, *PLoS One* 7 (2) (2012).
- [29] M. Begemann, S. Grube, S. Papiol, D. Malzahn, H. Krampe, K. Ribbe, H. Friedrichs, K.A. Radyushkin, A. El-Kordi, F. Benseler, et al., Modification of cognitive performance in schizophrenia by complexin 2 gene polymorphisms, *Arch. Gen. Psychiatry* 67 (9) (2010) 879–888.
- [30] N. Hagemeyer, S. Goebbels, S. Papiol, A. Kastner, S. Hofer, M. Begemann, U.C. Gerwig, S. Boretius, G.L. Wieser, A. Ronnenberg, et al., A myelin gene causative of a cataplexy-depression syndrome upon aging, *EMBO Mol. Med.* 4 (6) (2012) 528–539.
- [31] M. Tantra, C. Hammer, A. Kastner, L. Dahm, M. Begemann, C. Bodda, K. Hammerschmidt, I. Giegling, B. Stepniak, A. Castillo Venzor, et al., Mild expression differences of *MECP2* influencing aggressive social behavior, *EMBO Mol. Med.* 6 (5) (2014) 662–684.
- [32] F. Greifzu, D. Parthier, B. Goetze, O.M. Schluter, S. Lowel, Ocular dominance plasticity after stroke was preserved in PSD-95 knockout mice, *PLoS One* 11 (3) (2016) e0149771.
- [33] A.W. McGee, J.R. Topinka, K. Hashimoto, R.S. Petralia, S. Kakizawa, F.W. Kauer, A. Aguilera-Moreno, R.J. Wenthold, M. Kano, D.S. Bredt, PSD-93 knock-out mice reveal that neuronal MAGUKs are not required for development or function of parallel fiber synapses in cerebellum, *J. Neurosci.* 21 (9) (2001) 3085–3091.
- [34] W.D. Yao, R.R. Gainetdinov, M.I. Arbuckle, T.D. Sotnikova, M. Cyr, J.M. Beaulieu, G.E. Torres, S.G. Grant, M.G. Caron, Identification of PSD-95 as a regulator of dopamine-mediated synaptic and behavioral plasticity, *Neuron* 41 (4) (2004) 625–638.
- [35] P.R. Netrakanti, B.H. Cooper, E. Dere, G. Poggi, D. Winkler, N. Brose, H. Ehrenreich, Fast cerebellar reflex circuitry requires synaptic vesicle priming by *munc13-3*, *Cerebellum* 14 (3) (2015) 264–283.
- [36] H. Heinecke, A comparison of two variants of the chimney behaviour test in mice, *Z. Versuchstierkd.* 29 (3–4) (1987) 145–148.
- [37] E. Dere, L. Dahm, D. Lu, K. Hammerschmidt, A. Ju, M. Tantra, A. Kastner, K. Chowdhury, H. Ehrenreich, Heterozygous *ambra1* deficiency in mice: a genetic trait with autism-like behavior restricted to the female gender, *Front. Behav. Neurosci.* 8 (2014) 181.
- [38] E. Dere, D. Winkler, C. Ritter, A. Ronnenberg, G. Poggi, J. Patzig, M. Gernert, C. Muller, K.A. Nave, H. Ehrenreich, et al., *Gpm6b* deficiency impairs sensorimotor gating and modulates the behavioral response to a 5-HT2A/C receptor agonist, *Behav. Brain Res.* 277 (2015) 254–263.
- [39] A. El-Kordi, A. Kastner, S. Grube, M. Klugmann, M. Begemann, S. Sperling, K. Hammerschmidt, C. Hammer, B. Stepniak, J. Patzig, A single gene defect causing claustrophobia, *Transl. Psychiatry* 3 (2013) e254.

- [40] J.F. Cryan, C. Mombereau, A. Vassout, The tail suspension test as a model for assessing antidepressant activity: review of pharmacological and genetic studies in mice, *Neurosci. Biobehav. Rev.* 29 (4–5) (2005) 571–625.
- [41] A. Ju, K. Hammerschmidt, M. Tantra, D. Krueger, N. Brose, H. Ehrenreich, Juvenile manifestation of ultrasound communication deficits in the neuroligin-4 null mutant mouse model of autism, *Behav. Brain Res.* 270 (2014) 159–164.
- [42] S. Jamain, K. Radyushkin, K. Hammerschmidt, S. Granon, S. Boretius, F. Varoquaux, N. Ramanantsoa, J. Gallego, A. Ronnenberg, D. Winter, et al., Reduced social interaction and ultrasonic communication in a mouse model of monogenic heritable autism, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 105 (5) (2008) 1710–1715.
- [43] E.G. Gray, V.P. Whittaker, The isolation of nerve endings from brain: an electron-microscopic study of cell fragments derived by homogenization and centrifugation, *J. Anat.* 96 (1962) 79–88.
- [44] D. Krueger-Burg, D. Winkler, M. Mitkovski, F. Daher, A. Ronnenberg, O.M. Schluter, E. Dere, H. Ehrenreich, The SocioBox: a novel paradigm to assess complex social recognition in male mice, *Front. Behav. Neurosci.* 10 (2016) 151.
- [45] J. Nithianantharajah, A.G. McKechnie, T.J. Stewart, M. Johnstone, D.H. Blackwood, D. St Clair, S.G. Grant, T.J. Bussey, L.M. Saksida, Bridging the translational divide: identical cognitive touchscreen testing in mice and humans carrying mutations in a disease-relevant homologous gene, *Sci. Rep.* 5 (2015) 14613.
- [46] A.L. Bey, Y.H. Jiang, Overview of mouse models of autism spectrum disorders, *Curr. Protoc. Pharmacol.* 66 (5) (2014) (5 66 61–26).
- [47] A. El-Kordi, D. Winkler, K. Hammerschmidt, A. Kastner, D. Krueger, A. Ronnenberg, C. Ritter, J. Jatho, K. Radyushkin, T. Bourgeron, et al., Development of an autism severity score for mice using Nlgn4 null mutants as a construct-valid model of heritable monogenic autism, *Behav. Brain Res.* 251 (2013) 41–49.
- [48] X. Wang, Q. Xu, A.L. Bey, Y. Lee, Y.H. Jiang, Transcriptional and functional complexity of Shank3 provides a molecular framework to understand the phenotypic heterogeneity of SHANK3 causing autism and Shank3 mutant mice, *Mol. Autism* 5 (2014) 30.
- [49] J.C. Schroeder, D. Reim, T.M. Boeckers, M.J. Schmeisser, Genetic animal models for autism spectrum disorder, *Curr. Top. Behav. Neurosci.* 30 (2017) 311–324.
- [50] K.T. Kleijer, M.J. Schmeisser, D.D. Krueger, T.M. Boeckers, P. Scheiffele, T. Bourgeron, N. Brose, J.P. Burbach, Neurobiology of autism gene products: towards pathogenesis and drug targets, *Psychopharmacology (Berl.)* 231 (6) (2014) 1037–1062.

The SocioBox: A Novel Paradigm to Assess Complex Social Recognition in Male Mice

Dilja Krueger-Burg^{1†}, Daniela Winkler^{1,2†}, Mišo Mitkovski^{1†}, Fernanda Daher¹, Anja Ronnenberg¹, Oliver M. Schlüter^{2,3}, Ekrem Dere^{1,2} and Hannelore Ehrenreich^{1,2*}

¹ Max Planck Institute of Experimental Medicine, Göttingen, Germany, ² DFG Research Center for Nanoscale Microscopy and Molecular Physiology of the Brain, Göttingen, Germany, ³ European Neuroscience Institute, Göttingen, Germany

Impairments in social skills are central to mental disease, and developing tools for their assessment in mouse models is essential. Here we present the SocioBox, a new behavioral paradigm to measure social recognition. Using this paradigm, we show that male wildtype mice of different strains can readily identify an unfamiliar mouse among 5 newly acquainted animals. In contrast, female mice exhibit lower locomotor activity during social exploration in the SocioBox compared to males and do not seem to discriminate between acquainted and unfamiliar mice, likely reflecting inherent differences in gender-specific territorial tasks. In addition to a simple quantification of social interaction time of mice grounded on predefined spatial zones (zone-based method), we developed a set of unbiased, data-driven analysis tools based on heat map representations and characterized by greater sensitivity. First proof-of-principle that the SocioBox allows diagnosis of social recognition deficits is provided using male PSD-95 heterozygous knockout mice, a mouse model related to psychiatric pathophysiology.

Keywords: behavior, gender differences, mouse model, autism, schizophrenia, PSD-95

OPEN ACCESS

Edited by:

Oliver T. Wolf,
Ruhr University Bochum, Germany

Reviewed by:

Alexa H. Veenema,
Boston College, USA
Vootele Vöikar,
University of Zurich, Switzerland

*Correspondence:

Hannelore Ehrenreich
ehrenreich@em.mpg.de

[†] These authors have contributed
equally to this work.

Received: 18 May 2016

Accepted: 19 July 2016

Published: 11 August 2016

Citation:

Krueger-Burg D, Winkler D,
Mitkovski M, Daher F, Ronnenberg A,
Schlüter OM, Dere E and
Ehrenreich H (2016) The SocioBox:
A Novel Paradigm to Assess Complex
Social Recognition in Male Mice.
Front. Behav. Neurosci. 10:151.
doi: 10.3389/fnbeh.2016.00151

INTRODUCTION

A fundamental prerequisite for living in social communities is a highly complex set of social skills that governs interactions between individual members of a group. In consequence, impairments in these social skills, prominently prevalent in human psychiatric disorders such as autism and schizophrenia, have devastating consequences for individuals and society (Meyer-Lindenberg and Tost, 2012; Lai et al., 2014; Green et al., 2015). Major efforts are underway to understand molecular and cellular mechanisms that underlie social behaviors (Yizhar et al., 2011; Gunaydin et al., 2014; Hitti and Siegelbaum, 2014) and link disease-associated genetic constellations with social dysfunction (Tabuchi et al., 2007; Jamain et al., 2008; Schmeisser et al., 2012; Tantra et al., 2014). This interest is reflected in a 10-fold increase in the number of publications on mouse models of psychiatric diseases over the past 15 years.

This research has been hampered by the limited availability of reliable tools assessing complex social functions. Like humans, mice are capable of a rich set of social behaviors (Singleton and Krebs, 2007), but virtually all current tests assess only simple two-way discriminations between a mouse and an inanimate object or between a familiar and an unfamiliar mouse (Moy et al., 2004; Silverman et al., 2010; Kas et al., 2014). Accordingly, they are likely to underestimate the social competencies of mice, obscuring subtle alterations in disease-related social functions. Here we present a novel paradigm for standardized measurement of more complex social recognition

in mice, proving for the first time that male mice are easily capable of distinguishing between 5 mice. This paradigm provides a valuable tool for studying the circuitry underlying social recognition in wildtype mice as well as for identifying mechanisms by which disease-associated mutations may result in impaired social skills.

MATERIALS AND METHODS

Animals

Wildtype (WT) mice were purchased from Janvier (C57BL/6J) or Charles River (C3H/HeNCrl and BALB/cAnNCrl). The age of the mice upon arrival ranged from 3 weeks (males) to 6 weeks (females). Mice were group-housed in standard cages (36.5 cm × 20.7 cm × 14 cm, 4–5 mice per cage of the same gender and strain), in rooms separated by gender (to avoid olfactory contact). PSD-95 heterozygous knockout mice (Yao et al., 2004) on C57BL/6J background were obtained from the laboratory of Oliver Schlüter and bred in the animal facility at the Max Planck Institute of Experimental Medicine. An experimental cohort of male PSD-95 heterozygous knockout mice (PSD-95^{+/-}) and male WT littermate controls was generated from PSD-95 heterozygous breeding pairs and was housed in large cages (60 cm × 38 cm × 20 cm) in groups of 17 mice of mixed genotypes. Food and water were provided *ad libitum*. The housing room was maintained on a 12 h light–dark cycle (lights off at 7 pm) at 20–22°C. All experiments were approved by the local Animal Care and Use Committee in accordance with the German Animal Protection Law.

Experimental Setup

Experiments on WT mice were conducted using groups of 10 mice ('experimental mice') of the same gender and strain (C57BL/6J, C3H or BALB/c) as specified, aged 12–15 weeks at the beginning of testing. C3H mice were used as interaction partners ('stimulus mice') for all experiments, based on prior reports that this strain shows robust social interaction in a test situation (Moy et al., 2007). Stimulus mice were gender-matched with the experimental mice and were aged 12–15 weeks at the beginning of testing. All experiments were conducted during the light phase of the day (from 9 am to 6 pm) at a light intensity of 10–15 lux.

Experiments on PSD-95 heterozygous knockout mice were conducted using a group of 14 PSD-95^{+/+} mice and 20 PSD-95^{+/-} mice, aged 16 weeks at the beginning of testing. C3H mice were again used as stimulus mice, and testing was performed during the light phase of the day (from 9 am to 6 pm) by an investigator blind to genotype. The experiment described here was part of a test battery conducted on this cohort of mice, the complete results of which will be reported elsewhere.

SocioBox Apparatus

The SocioBox apparatus (Figures 1A–E; Table 1) was constructed by the machine shop at the Max Planck Institute of Experimental Medicine. It consisted of a plastic ground plate, an outer ring of five rectangular removable boxes ('inserts') separated by fixed dividers of gray plastic, and a central open arena (diameter of the

TABLE 1 | Glossary of the SocioBox terminology.

Category	Term	Explanation
Apparatus	Central arena	Open area in the center of the SocioBox that contains the experimental mouse
	Insert	Removable boxes that contain the stimulus mice
	Partition	Opaque removable divider that separates the experimental and stimulus mice during initiation
	Interaction zone	Area defined in the Viewer3 software that is adjacent to each insert and used to calculate interaction time
Mice	Experimental mouse	Mouse being tested for social recognition
	Stimulus mouse	Interaction partner for experimental mice
	Original stimulus mouse (S[ori] mouse)	Stimulus mouse that is present in exposures 1 and 2, but that is removed for the recognition test
	New stimulus mouse (S[new] mouse)	Stimulus mouse that is inserted instead of the S[ori] mouse during the recognition test
	Constant stimulus mouse (S[con] mouse)	Stimulus mice that are present in all 3 phases of the test session
	Unfamiliar stimulus mouse	Stimulus mouse that has never been seen by the experimental mouse
Paradigm	Newly acquainted stimulus mouse	Stimulus mouse that was seen in a previous phase of the test session, but not prior to the current day
	Test session	Day 4 of the paradigm: Test session lasting approx. 40 min, consisting of 3 test phases
	Test phase	Each test phase (exposure 1, exposure 2, and recognition test) lasts 10 min and consists of 2 min × 5 min stages, the initiation and interval stages
	Exposures 1 and 2	First and second phase of the test session, in which the experimental mouse encounters 1 S[ori] mouse and 4 S[con] mice
	Recognition test	Third phase of the test session, in which the S[ori] mouse is replaced by the S[new] mouse
	Initiation stage	First 5 min of each test phase, in which the experimental and stimulus mice are separated visually and spatially by the opaque partition
	Interaction stage	Second 5 min of each test phase, in which social interaction can occur between experimental and stimulus mice
Data analysis	Social Recognition Index (SRI)	$= (\text{Interaction time with S[new] mouse}) - (\text{Mean interaction time with S[con] mice})$
	Spatial heat map	Analysis showing mean localization of all mice per group in a given test phase
	Temporal distance heat map	Analysis showing the distance of each experimental mouse from the point of origin (i.e., the center for exposures 1 and 2, S[new] for the recognition test) across the 5 min of the test phase

outer ring = 56 cm, diameter of the central arena = 34 cm, height of the inserts and the dividers = 20.5 cm). Experimental mice were placed in the central arena, while stimulus mice were placed in the inserts in the outer ring. The inserts (width 8.5 cm, length 11.5 cm, height 20.5 cm) consisted of 3 walls of gray plastic and 1 front slider of clear plastic, facing the center of the apparatus, with 31 holes (diameter 0.8 cm) to permit social interaction and exchange of odors between the experimental mice and the stimulus mice (**Figures 1B,E**). The front slider was removable to facilitate cleaning of the inserts between mice. Within the central arena, a circular partition of white plastic (diameter 19 cm, height 18 cm, without a floor) served to spatially and visually separate the experimental mice from the inserts containing the stimulus mice during the initiation stage of the test paradigm (see below).

Video Tracking

An overhead video camera (Samsung) was mounted approximately 130 cm above the SocioBox apparatus. This camera was connected to a computer located in a separate room, enabling the experimenter to record the test session without being present in the room during testing. Videos were acquired with a temporal resolution of 25 frames per sec. An automated software (Viewer3, Biobserve) was used to track the experimental mouse and calculate the time spent in interaction with each stimulus mouse (defined as time in which the experimental mouse was located

within a predefined interaction zone adjacent to the insert, see **Figure 1C**).

Habituation of Experimental and Stimulus Mice

Prior to the test session, experimental and stimulus mice were habituated separately to the SocioBox apparatus for 3 consecutive days. This extensive habituation paradigm served to reduce anxiety in the mice, which is known to result from exposure to a novel open environment (Calhoun and Tye, 2015) and which may substantially interfere with social interest and recognition.

Stimulus mice were habituated to the inserts within the apparatus, but in the absence of an experimental mouse. Each mouse received 3 habituation sessions per day, each lasting for 10 min. For this purpose, the mouse was placed in the insert, and the insert was carefully placed in its slot in the outer ring. For the first 5 min, the circular partition in the central arena was present, and it was then removed for the last 5 min to mimic the test situation. The inserts were cleaned after every use, first with running tap water to remove urine and feces, then with 70% ethanol, then again with tap water to remove the smell of the ethanol. The inserts were then dried with paper tissue before the next use.

Experimental mice were habituated to the central arena with the inserts in place, but in the absence of any stimulus mice. Each mouse received 1 habituation session per day, lasting for 10 min.

For this purpose, the mouse was placed in the arena inside the circular partition for 5 min. After this time, the partition was removed to mimic the test situation, and the mouse was allowed to explore the entire arena. The arena was cleaned after every use, first with wet tissues, then with 70% ethanol, then again with wet tissues to remove the smell of the ethanol. Both the floor of the arena (including the space underneath the inserts, which were lifted briefly for cleaning purposes) and any parts of the walls that had been in direct contact with the experimental mouse (including the front sliders of the inserts) were cleaned in this manner.

Test Session

On the day of the test session (day 4 of the paradigm, after 3 habituation days), mice were exposed to the light conditions (10–15lux) of the experimental procedure in a separate room for approximately 30 min before testing. At the beginning of each test session, 6 assigned C3H stimulus mice were placed into 6 inserts and they stayed in these inserts throughout the test session. Five inserts were then transferred to the room with the SocioBox apparatus and were placed inside the apparatus. The 6th insert stayed in the separate room at the aforementioned light conditions until it was introduced to the apparatus during the recognition test phase. This procedure ensured that all stimulus mice spent equal time inside the inserts, since the activity of the stimulus mice within the insert decreased over time.

Each test session consisted of 3 phases, exposure 1, exposure 2, and recognition test (**Figure 1F**). To begin the test session, the experimental mouse was placed into the central arena inside the white Plexiglass circular partition, which separated the experimental mouse from the stimulus mice spatially and visually. After 5 min of recovery ('initiation stage'), the circular partition was lifted, and the experimental mouse was allowed to freely explore the stimulus mice in their inserts for 5 min ('interaction stage'). At the end of exposure 1, the experimental mouse was removed from the apparatus and placed in the cage used to transport the mouse into the testing room. The central arena was cleaned as described for the habituation session, and the experimental mouse was then returned to the central arena inside the circular partition. Exposure 2 followed immediately and consisted of the same initiation stage and interaction stage. At the end of exposure 2, the experimental mouse was again removed from the apparatus and the central arena was cleaned as above. At this point, 1 of the stimulus mice (the 'original stimulus mouse,' S[ori]) was removed with its insert, and the insert containing the 6th stimulus mouse (the 'new stimulus mouse,' S[new]) was introduced in its place. The other stimulus mice ('constant stimulus mice,' S[−2], S[−1], S[+1], and S[+2]) remained in the same position throughout the testing paradigm to avoid potential interference of object location memory (Dere et al., 2005; Murai et al., 2007). After this exchange was completed, the experimental mouse was returned to the circular partition and the recognition test was conducted, again consisting of an initiation stage and an interaction stage. At the end of the test session, the experimental mouse and the 6 stimulus mice were returned to their home cages, and the central arena and inserts were cleaned as described for the habituation phase.

In order to avoid fatigue and social disinterest of the stimulus mice due to repeated exposure to multiple experimental mice, several sets of stimulus mice were used for each experiment, and no stimulus mouse was used for >3 test sessions per day. Moreover, to eliminate any spatial biases on the part of the experimental mouse, the position of the S[ori]/S[new] stimulus mouse within the SocioBox chamber was rotated for each new experimental mouse. Regardless of the position of the S[ori]/S[new] stimulus mouse, the stimulus mouse immediately clockwise was designated as S[+1] for data alignment purposes, the next stimulus mouse clockwise was S[+2], the stimulus mouse immediately anti-clockwise was S[−1], and the next stimulus mouse anti-clockwise was S[−2]. For each experimental mouse, the spatial location of each stimulus mouse was the same across exposure 1, exposure 2, and recognition test (except for the S[ori]/S[new] exchange).

Analysis of Data Generated by the Viewer3 Software

The amount of time spent by the experimental mouse in each of the predefined zones during the 5 min of the interaction stage of each test was automatically calculated by the Viewer3 software. These data were aligned to the position of the S[ori]/S[new] stimulus mouse for purposes of statistical analysis and graphical representation.

Data-Driven Analysis Using Spatial Heat Map Visualization

2-dimensional, spatial heat maps depicting average animal location were generated with the open source FIJI image processing package (Schindelin et al., 2012), using the C57BL/6J male data set as an example (**Figures 4A–K**). A custom-written FIJI macro imported and then plotted a 1-pixel-diameter point of intensity 1 at each of the 7500 body coordinates originally generated by the Viewer3 software. This step produced an image stack consisting of 7500 frames for each of the animals. The frames of this stack were summed to generate 1 superimposed image containing all plotted coordinates an individual mouse had occupied during the 5 min of the interaction stage for each test (**Figure 4A**). Geometrical rotations were applied to the individual animal data sets so that the S[ori]/S[new] stimulus mouse was always aligned in the top position. The 2-dimensional heat maps depicting an animal group were then made by adding up the images of the summed coordinates of the individual animals belonging to that group (**Figure 4B**). Gaussian-weighted noise reduction filtering was applied with a 5-pixel radius that revealed 5 average locations the animals preferred during the testing period (**Figure 4C**). The image contrast was enhanced by applying a polychromatic lookup table to more easily recognize potential hotspots signified by aggregations of pixels with similar values. In a next step, thresholding was applied that segmented out 5 regions preferred by the animals (**Figure 4D**). The resulting binary images were used to generate a mask containing 5 regions of interests (ROIs) for each phase of the experiment (**Figure 4E**). Finally, ROIs were applied to the original, non-filtered, summed images of each animal to quantify the number of pixels per

individual ROI, where 25 pixels correspond to 1 sec (**Figure 4F**). For the analysis of the PSD-95^{+/-} experiment (**Figures 6A–D**), heat map representations were first generated separately for each genotype and then summed to generate a combined binary image and mask for quantification.

Data-Driven Analysis Using Temporal Heat Map Visualization

To obtain a single, global visual representation of mouse behavior during each test phase, heat maps were generated depicting the distance of the experimental mouse from the center of the arena (exposure 1) or the S[new] stimulus mouse (recognition test) across the 5 min of the recording, using the male and female BALB/c data set as an example (**Figures 5A–D**). First, the body coordinates generated by the Viewer3 tracking of each animal were imported into the Calc spreadsheet software of the open source LibreOffice5 (libreoffice.org) software package. Geometrical rotations were applied to the individual animal data sets so that the S[ori]/S[new] stimulus mouse was always aligned in the top position. Next, the distance of the experimental mouse to the point of origin (defined as the center of the arena for exposure 1 and the S[new] stimulus mouse for the recognition test, see **Figures 5A,B**) was calculated for each of the recorded 7500 timepoints (25 frames per sec × 300 sec of recording). The resulting distances were imported into FIJI in order to generate a multi-column image in which each column consists of 7500 distance recordings of an individual animal organized in a temporal manner (**Figures 5C,D**). In order to quantify these data, FIJI was used to generate histograms showing the frequencies with which individual distances occur (**Figures 5E,F**). For the recognition test (**Figures 5D,F**), 3 distance frequency populations emerged which corresponded to (i) the location of the new stimulus mouse S[new], (ii) the location of the constant stimulus mice immediately adjacent to the new stimulus mouse, i.e., S[−1] and S[+1], and (ii) the location of the constant stimulus mice opposite to the new stimulus mouse, i.e., S[−2] and S[+2]. To better visualize these 3 populations, a custom green–blue–red lookup table was created, where the colors correspond to the distances 0–8, 10–24, and 26–34 cm, respectively.

Statistical Analysis

Statistical analysis was performed using the Prism software v5.0c (GraphPad). Data were first analyzed for outliers using the Grubbs test outlier calculator (based on the method of Grubbs (1969) and calculated on the GraphPad website, <http://graphpad.com/quickcalcs/Grubbs1.cfm>, with a significance level of $\alpha = 0.01$). The following parameters were considered for detecting outliers: Interaction time with each of the 5 stimulus mice (**Figures 2A–I**, **3A–I**, and **4J,K**) or social recognition index (SRI) (**Figures 6C,D**). No outlier analysis was conducted for **Figures 5G,H** due to the large number of data points involved. Mice for which an outlier was identified in a given data set were excluded from further analysis for this data set. This affected the following data sets: BALB/c males, exposures 1 and 2 (**Figures 2D,E**, 1 mouse); C57BL/6J females, recognition test (**Figure 3C**, 1 mouse); BALB/c females, exposure 2 (**Figure 3E**,

3 mice); PSD-95 experiment, PSD-95^{+/-} mice (**Figure 6D**, 1 mouse), PSD-95^{+/-} mice (**Figure 6D**, 2 mice). Moreover, 1 mouse was excluded entirely from the male C57BL/6J data set due to technical issues (escape of a stimulus mouse during the recognition test). Data sets were then analyzed using repeated measures one-way ANOVA (**Figures 2–4**), repeated measures two-way ANOVA with gender as between-subjects factor and time as within-subjects factor (**Figure 5**), or two-tailed unpaired Student's *t*-test (**Figure 6**).

RESULTS AND DISCUSSION

After a series of optimization experiments (see Supplement for details), we developed a circular behavioral chamber ('SocioBox', see **Table 1** for nomenclature), in which the mouse of interest ('experimental mouse') was placed in a central arena surrounded by a ring of 5 unfamiliar mice ('stimulus mice') (**Figures 1A–D**). The stimulus mice were held in rectangular inserts facing the center of the chamber, with holes in the clear front panel to permit exchange of odors (**Figures 1B,E**). The movement of the experimental mouse was recorded by an overhead camera (**Figure 1C**), and the interaction time with each stimulus mouse (i.e., the time spent within a predefined zone in front of each insert, see **Figure 1C**), was calculated using an automated software (Viewer3, Biobserve).

Using this experimental setup, we established a testing paradigm that produces robust social recognition in wildtype mice (see Materials and Methods for details). Briefly, mice were first individually habituated to the apparatus for 3 consecutive days to eliminate any novelty-related confounds. On day 4, a test-session was conducted, consisting of 3 consecutive phases: Exposure 1, exposure 2, and recognition test (**Figure 1F**). In each phase, the experimental mouse was first placed into the central arena inside an opaque circular partition, which separated the experimental mouse from the 5 stimulus mice spatially and visually. After 5 min of exploration ('initiation stage'), the partition was lifted and the experimental mouse was allowed to freely explore the stimulus mice in their inserts for 5 min ('interaction stage'). For each experimental mouse, the identity and spatial position of the 5 stimulus mice was equal during exposures 1 and 2, while for the recognition test, 1 of the 5 stimulus mice (the 'original stimulus mouse', S[ori]) was replaced with an unfamiliar stimulus mouse (the 'new stimulus mouse', S[new]). The other stimulus mice ('constant stimulus mice', S[−2], S[−1], S[+1] and S[+2]) remained in their inserts in the same position throughout the testing paradigm. To control for spatial bias effects, the position of the S[ori]/S[new] stimulus mouse within the SocioBox chamber was rotated for each new experimental mouse. At the end of each phase, the experimental mouse was removed briefly while the arena was cleaned, and then returned to the circular partition to begin the next phase.

To validate our new paradigm, we first assessed social recognition in male C57BL/6J mice, commonly used as genetic background strain in animal models of psychiatric disorders (**Figures 2A–C**; **Table 2**). During exposure 1, experimental mice displayed substantial interest in the 5 stimulus mice (**Figure 2A**;

FIGURE 2 | Male mice from multiple strains show robust social recognition for 5 stimulus mice in the SocioBox paradigm. (A–C) Interaction time of male C57BL/6J mice with each stimulus mouse during **(A)** exposure 1, **(B)** exposure 2, and **(C)** recognition test. **(D–F)** Interaction time of male BALB/c mice with each stimulus mouse during **(D)** exposure 1, **(E)** exposure 2, and **(F)** recognition test. **(G–I)** Interaction time of male C3H mice with each stimulus mouse during **(G)** exposure 1, **(H)** exposure 2, and **(I)** recognition test. Statistical analysis was conducted using one-way ANOVA, summarized in **Table 2**. Data are expressed as interaction time in sec (mean $\pm$ SEM).

TABLE 2 | Statistical analysis of data presented in Figures 2–4.

Gender	Strain	Figure	Exposure 1 One-way ANOVA			Exposure 2 One-way ANOVA			Recognition Test One-way ANOVA			Recognition Test SRI ¹ Ave $\pm$ SEM
			p-value	F-value	DF (n;d)	p-value	F-value	DF (n;d)	p-value	F-value	DF (n;d)	
Male	C57BL/6J	2A–C	0.759	0.47	4;32	0.466	1.57	4;32	0.002	5.64	4;32	12.3 ² $\pm$ 3.9
	BALB/c	2D–F	0.261	1.38	4;36	0.899	0.26	4;32	<0.0001	17.07	4;32	25.1 ^{2,3} $\pm$ 3.1
	C3H	2G–I	0.138	1.87	4;36	0.895	0.27	4;36	0.033	2.96	4;36	20.4 $\pm$ 11.3
	C57BL/6J ⁴	4I–K	0.208	1.17	4;32	0.792	0.42	4;32	<0.0001	12.05	4;32	19.0 $\pm$ 3.1
Female	C57BL/6J	3A–C	0.646	0.63	4;36	0.673	0.59	4;36	0.078	2.33	4;32	8.4 $\pm$ 4.3
	BALB/c	3D–F	0.568	0.74	4;36	0.525	0.82	4;24	0.963	0.15	4;36	1.6 ³ $\pm$ 3.2
	C3H	3G–I	0.329	1.20	4;36	0.433	0.98	4;36	0.435	0.97	4;36	–1.7 $\pm$ 2.5

¹SRI, Social recognition index, calculated as (Interaction time with S[new]) – (Mean interaction time with S[con]). ²Comparison of SRI for C57BL/6J vs. BALB/c males: $p < 0.05$, Student's unpaired two-tailed t-test. ³Comparison of SRI for BALB/c males vs. females: $p < 0.0001$, Student's unpaired two-tailed t-test. ⁴Re-analysis of C57BL/6J male data using data-driven analysis method (**Figure 4**).

FIGURE 3 | Female mice show little or no social recognition in the SocioBox paradigm. (A–C) Interaction time of female C57BL/6J mice with each stimulus mouse during **(A)** exposure 1, **(B)** exposure 2, and **(C)** recognition test. **(D–F)** Interaction time of female BALB/c mice with each stimulus mouse during **(D)** exposure 1, **(E)** exposure 2, and **(F)** recognition test. **(G–I)** Interaction time of female C3H mice with each stimulus mouse during **(G)** exposure 1, **(H)** exposure 2, and **(I)** the recognition test. Statistical analysis was conducted using one-way ANOVA, summarized in **Table 2**. Data are expressed as interaction time in sec (mean $\pm$ SEM).

Table 2), which decreased slightly during exposure 2 (**Figure 2B**; **Table 2**), likely due to habituation to these stimulus mice. During the recognition test, experimental mice spent even less time with the constant stimulus mice, but interacted significantly more with the new stimulus mouse (**Figure 2C**; **Table 2**). Based on the well-documented tendency of rodents to interact more with a novel object or individual than with a familiar one (Bevins and Besheer, 2006; Macbeth et al., 2009), this difference in interaction time likely reflected the ability of the experimental mouse to distinguish between the previously encountered stimulus mice and the new stimulus mouse. To provide a quantitative parameter of social recognition that would facilitate direct comparison between groups of mice, we generated a single SRI for each experimental mouse, calculated as the difference in time spent with the new stimulus mouse S[new] and with the average of the 4 constant stimulus mice (**Table 2**). Together, our data indicate that C57BL/6J male mice can distinguish an unfamiliar

mouse from at least 4 other newly acquainted mice, and that the paradigm presented here enables robust assessment of this social recognition.

To confirm that our results were not confounded by olfactory cues left by the experimental mouse on the front sliders of the inserts via touching or nose poking, we repeated the experiment with a slightly modified protocol, which included a complete exchange of sliders for freshly cleaned ones during the recognition test. This procedure did not substantially affect performance in the recognition test (SRI, $p = 0.02$), and since it extended the length of the procedure and somewhat distracted the mice, we did not include the slider exchange in our subsequent experiments.

We next asked whether our paradigm would be similarly suitable for other mouse strains. Male BALB/c and C3H mice also displayed substantial social interest in exposures 1 and 2 and significant preference for the new stimulus mouse in the

FIGURE 4 | Spatial heat map analysis improves sensitivity of detection in the SocioBox paradigm. (A–C) Generation of the spatial heat map, using data for C57BL/6J males (exposure 1, corresponds to **Figure 2A**) as an example: **(A)** Example of body coordinates of a single mouse, exported from the Viewer3 software into FIJI. **(B)** Overlay of tracks from all C57BL/6J male mice for exposure 1. **(C)** Gaussian-weighted noise reduction filtering of the overlaid tracks to generate a spatial heat map. **(D)** Binary image created by application of a threshold to the spatial heat map. **(E)** Example of ROIs created from a binary image. **(F)** Example of the application of the mask created from the ROIs to the track of a single mouse. **(G,H)** Spatial heat map of data from the C57BL/6J male recognition test (corresponds to **Figure 2C**). **(G)** Heat map showing the combined location of the experimental mice during the recognition test, and **(H)** thresholded image. **(I–K)** Quantification of the time spent by male C57BL/6J mice in the 5 ROIs during **(I)** exposure 1, **(J)** exposure 2, and **(K)** recognition test (compare to **Figures 2A–C**). Statistical analysis was conducted using one-way ANOVA, summarized in **Table 2**. Data are expressed as interaction time in sec (mean $\pm$ SEM).

recognition test (**Figures 2D–I; Table 2**), confirming the validity of our paradigm. Interestingly, the SRI for BALB/c mice was significantly higher than for C57BL/6J mice (25.1 ± 3.1 vs. 12.3 ± 3.9 , respectively), indicating that male BALB/c mice show particularly pronounced social recognition skills under our conditions. In striking contrast, female mice of all 3 strains exhibited markedly lower preference for the new stimulus mouse (**Figures 3A–I; Table 2**), uncovering an essential gender difference in this behavior.

All of the above data originated from the Viewer3 software, which uses predefined spatial zones to quantify social interaction time (**Figure 1C**). An important limitation of this zone-based method is that it requires prior assumptions regarding the behavior of experimental mice, and that it may either over- or underestimate the time spent in social interaction if the predefined zones do not accurately match movement patterns of mice. To overcome this limitation, we developed a new set of unbiased, data-driven analysis tools based on heat map representations.

First, we generated spatial heat maps showing the average localization of all mice in a given test session, using the male C57BL/6J data set as example (**Figures 4A–H**). We identified 5 clearly preferred spatial locations in exposure 1 that corresponded to the location of the 5 stimulus mice (**Figure 4C**), while a strong preference for the location of the new stimulus mouse was observed in the recognition test (**Figure 4G**). These data were used to generate binary masks that defined 5 ROIs for subsequent quantification (**Figures 4D–F,H**). Quantification identified a highly significant preference for the new stimulus mouse during the recognition test (**Figures 4I–K; Table 2**). Importantly, direct comparison of the data obtained using our new data-driven analysis with those obtained for the same mice using the conventional zone-based analysis (compare **Figures 2C** and **4K**) revealed a substantial improvement both in the statistical significance (one-way ANOVA, $p < 0.0001$ for data-driven analysis vs. $p < 0.005$ for zone-based analysis) and in the magnitude of the SRI (19.0 ± 3.1 sec for data-driven analysis vs. 12.3 ± 9.6 sec for zone-based analysis). These findings confirm

FIGURE 5 | Continued

stimulus mouse, i.e., S[−2] and S[+2]. Based on this distribution, the color intensity and shade in the temporal heat map for the recognition test were assigned as follows: Green = distance 0–8 cm, blue = distance 10–24 cm, red = distance 26–34 cm. (G,H) Quantification of the average distance of male and female experimental mice from the new stimulus mouse (G) across the 5 min of the recognition test and (H) during the first minute of the recognition test, analyzed in 20 sec time bins. Statistical analysis was conducted using a repeated measures two-way ANOVA with gender as between-subjects factor and time as within-subjects factor. Data are expressed as distance traveled in cm (mean ± SEM).

that our new data-driven analysis method markedly improves the sensitivity of our paradigm.

We also generated temporal heat maps that depict the distance of all animals from the new stimulus mouse for the entire recognition test duration, using the BALB/c data set as an example (Figures 5A–F). This analysis revealed that male BALB/c mice changed their position more often than females (i.e., the color succession changes more rapidly), which was also reflected in a higher average speed of locomotion (recognition test: male = 2.60 ± 0.16 mm/sec; female = 1.41 ± 0.22 ; $p = 0.004$). Male BALB/c mice also spent more time in close proximity to the new stimulus mouse during the recognition test, particularly in the first minute of the test (Figure 5D, increase in green color in males, quantified in Figures 5G,H), indicating that they are capable of very rapidly distinguishing between new and familiar stimulus mice.

The observed gender differences are interesting and certainly worth pursuing. The reduced SRI in females may indicate either that female mice are less able to distinguish between 5 mice under the current conditions, or – more likely – that they do not show their recognition through increased exploration of the new stimulus mouse. Considering the higher locomotor activity of males during social exploration, this discrepant behavior may result from inherent differences in gender-specific territorial tasks (Miczek et al., 2001), rather than reflecting a lower social recognition capacity in females. It is also conceivable that the stage of the estrous cycle in female mice played a role, or that sexual maturation and in consequence the development of social skills was influenced by shipment of the female mice during puberty (Laroche et al., 2009). Further investigation of this interesting effect may provide important insights into gender differences in social behaviors.

To finally validate our new behavioral paradigm and analysis tools using a mutant mouse line relevant to psychiatric disorders, we tested mice with heterozygous deletion of PSD-95 (PSD-95^{+/-}) (Yao et al., 2004). PSD-95 is a major component of the excitatory synaptic scaffold and plays a key role in development, function and plasticity of excitatory synapses (El-Husseini et al., 2000). Alterations in PSD-95 function and the balance of excitatory and inhibitory synaptic transmission (E/I balance) have been associated with psychiatric phenotypes, including social dysfunction (Yizhar et al., 2011; Tsai et al., 2012; de Bartolomeis et al., 2014), and mice with a full deletion of PSD-95 display abnormalities in social behaviors (Feyder et al., 2010). In contrast, no such changes have been reported in PSD-95^{+/-}

mice, despite the fact that a partial reduction in protein levels, rather than a complete deletion, may more accurately reflect the disease contribution of PSD-95 (de Bartolomeis et al., 2014). This lack of a reported phenotype may result partly from the fact that current methods are not sufficiently sensitive to detect the subtle behavioral alterations that might be expected in these mice. Using our new SocioBox paradigm, we find that PSD-95^{+/-} mice show noticeably reduced preference for the new stimulus mouse in the spatial heat map analysis of the recognition test (Figures 6A,B). Quantification of these data reveals a significant reduction in the SRI using the data-driven analysis method, but not with the zone-based analysis (Figures 6C,D). These data confirm that our SocioBox paradigm is capable of identifying social recognition abnormalities in mutant mouse models, and that the improved sensitivity obtained from the data-driven analysis method can be essential for uncovering subtle disease-related changes. It is also interesting to note that the SRI obtained for the WT mice from the PSD-95 experiment (PSD-95^{+/+} on a C57BL/6J background) is remarkably similar to that seen in the standard inbred C57BL/6J mice from the first experiment (SRI = 14.2 ± 4.7 vs. 12.3 ± 3.9, respectively, for the zone-based analysis; 25.9 ± 6.5 vs. 19.0 ± 3.1, respectively, for the data-driven analysis), despite substantial differences in breeding (bred in-house vs. purchased from Janvier) and housing (17 mice per cage vs. 5 mice per cage). This observation confirms that our SocioBox paradigm can reproducibly measure social recognition across a wide range of experimental conditions.

We conclude that, using a combination of a novel circular testing apparatus, an easy-to-apply experimental paradigm and

an advanced set of analysis tools, we have developed a robust and sensitive new behavioral assay to study social recognition in male mice. To our knowledge, this is first report of a paradigm that can assess the ability of mice to discriminate between more than 2 mice using a standardized testing apparatus. Current assays, including the commonly used 3 chambered social approach task (Moy et al., 2004; Kas et al., 2014), are limited in usefulness for studying complex social recognition, since they assess only a binary discrimination between 1 familiar and 1 unfamiliar mouse. Our SocioBox paradigm overcomes this limitation by requiring experimental mice to distinguish an unfamiliar stimulus mouse from 4 newly acquainted stimulus mice, therefore placing a substantially higher social memory load on the mice which renders the assay more sensitive to subtle disease-related changes. Other studies have attempted to address this issue by developing automated systems to analyze patterns of social dynamics in the home cage or in semi-naturalistic environments (Shemesh et al., 2013; Weissbrod et al., 2013; Hong et al., 2015), but these generally require highly specialized and expensive technical equipment that is not widely available. In contrast, the SocioBox paradigm can easily be reconstructed in any standard behavioral laboratory, and the data-driven analysis is based on the open source software FIJI. With this unique combination of sensitivity and ease of implementation, the SocioBox is perfectly poised to assess complex social recognition in mouse models of psychiatric disorders. In particular, this assay will be valuable for studying models of autism and schizophrenia, both of which involve core deficits in social skills, including specific impairments in social and face recognition (Boucher and Lewis, 1992; Calkins et al., 2005; Tanaka et al., 2010; Meyer-Lindenberg and Tost, 2012). As such, the SocioBox represents an important expansion to the current repertoire of tests available to assess social skills in mice, and in combination with other behavioral paradigms measuring complementary aspects such as sociability, it will greatly facilitate the comprehensive analysis of social dysfunction in mouse models of psychiatric disorders.

AUTHOR CONTRIBUTIONS

HE conceived the study; HE, DK-B, and DW designed the study; DW performed experiments on all WT cohorts, supported by AR and DK-B; FD performed PSD-95^{+/-} experiment; MM developed visualization and analysis tools; HE, DW, DK-B, MM, and ED analyzed experiments; OMS provided the PSD-95 knockout mouse line and gave conceptual advice; DK-B, DW, MM, and HE wrote the paper. All authors discussed the results and commented on the manuscript at all stages.

ACKNOWLEDGMENTS

The research leading to these results has received support from the Innovative Medicines Initiative Joint Undertaking under grant agreement n° 115300, resources of which are composed of financial contribution from the European Union's Seventh Framework Programme (FP7/2007 – 2013) and EFPIA

companies' in kind contribution. In addition, this work was supported by the Max Planck Society (HE) and the German Research Foundation (DFG, CNMPB, HE). DK-B was supported by a research fellowship from the Alexander von Humboldt Foundation and by the European Commission (International Reintegration Grant, PIRG07-GA-2010-268358). FD was supported by FAPESP (Research Internship Abroad (BEPE), 2014/18795-2). The authors thank Markus Krohn and the Feinmechanik team for the construction of the

chamber and Heather Sanders for assistance with preliminary experiments.

SUPPLEMENTARY MATERIAL

The Supplementary Material for this article can be found online at: <http://journal.frontiersin.org/article/10.3389/fnbeh.2016.00151>

REFERENCES

- Bevins, R. A., and Besheer, J. (2006). Object recognition in rats and mice: a one-trial non-matching-to-sample learning task to 'study' recognition memory'. *Nat. Protocols* 1, 1306–1311. doi: 10.1038/nprot.2006.205
- Boucher, J., and Lewis, V. (1992). Unfamiliar face recognition in relatively able autistic children. *J. Child Psychol. Psychiatry* 33, 843–859. doi: 10.1111/j.1469-7610.1992.tb01960.x
- Calhoun, G. G., and Tye, K. M. (2015). Resolving the neural circuits of anxiety. *Nat. Neurosci.* 18, 1394–1404. doi: 10.1038/nn.4101
- Calkins, M. E., Gur, R. C., Ragland, J. D., and Gur, R. E. (2005). Face recognition memory deficits and visual object memory performance in patients with schizophrenia and their relatives. *Am. J. Psychiatry* 162, 1963–1966. doi: 10.1176/appi.ajp.162.10.1963
- de Bartolomeis, A., Latte, G., Tomasetti, C., and Iasevoli, F. (2014). Glutamatergic postsynaptic density protein dysfunctions in synaptic plasticity and dendritic spines morphology: relevance to schizophrenia and other behavioral disorders pathophysiology, and implications for novel therapeutic approaches. *Mol. Neurobiol.* 49, 484–511. doi: 10.1007/s12035-013-8534-3
- Dere, E., Huston, J. P., and De Souza Silva, M. A. (2005). Episodic-like memory in mice: simultaneous assessment of object, place and temporal order memory. *Brain Res. Protoc.* 16, 10–19. doi: 10.1016/j.brainresprot.2005.08.001
- El-Husseini, A. E.-D., Schnell, E., Chetkovich, D. M., Nicoll, R. A., and Brecht, D. S. (2000). PSD-95 involvement in maturation of excitatory synapses. *Science* 290, 1364–1368.
- Feyder, M., Karlsson, R.-M., Mathur, P., Lyman, M., Bock, R., Momenan, R., et al. (2010). Association of mouse Dlg4 (PSD-95) gene deletion and human DLG4 gene variation with phenotypes relevant to autism spectrum disorders and Williams' Syndrome. *Am. J. Psychiatry* 167, 1508–1517. doi: 10.1176/appi.ajp.2010.10040484
- Green, M. F., Horan, W. P., and Lee, J. (2015). Social cognition in schizophrenia. *Nat. Rev. Neurosci.* 16, 620–631. doi: 10.1038/nrn4005
- Grubbs, F. (1969). Procedures for detecting outlying observations in samples. *Technometrics* 11, 1–21. doi: 10.1080/00401706.1969.10490657
- Gunaydin, L. A., Grosenick, L., Finkelstein, J. C., Kauvar, I. V., Fenno, L. E., Adhikari, A., et al. (2014). Natural neural projection dynamics underlying social behavior. *Cell* 157, 1535–1551. doi: 10.1016/j.cell.2014.05.017
- Hitti, F. L., and Siegelbaum, S. A. (2014). The hippocampal CA2 region is essential for social memory. *Nature* 508, 88–92. doi: 10.1038/nature13028
- Hong, W., Kennedy, A., Burgos-Artizzu, X. P., Zelikowsky, M., Navonne, S. G., Perona, P., et al. (2015). Automated measurement of mouse social behaviors using depth sensing, video tracking, and machine learning. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 112, E5351–E5360. doi: 10.1073/pnas.1515982112
- Jamain, S., Radyushkin, K., Hammerschmidt, K., Granon, S., Boretius, S., Varoqueaux, F., et al. (2008). Reduced social interaction and ultrasonic communication in a mouse model of monogenic heritable autism. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 105, 1710–1715. doi: 10.1073/pnas.0711555105
- Kas, M., Glennon, J., Buitelaar, J., Ey, E., Biemans, B., Crawley, J., et al. (2014). Assessing behavioural and cognitive domains of autism spectrum disorders in rodents: current status and future perspectives. *Psychopharmacology* 231, 1125–1146. doi: 10.1007/s00213-013-3268-5
- Lai, M.-C., Lombardo, M. V., and Baron-Cohen, S. (2014). Autism. *Lancet* 383, 896–910. doi: 10.1016/S0140-6736(13)61539-1
- Laroche, J., Gasbarro, L., Herman, J. P., and Blaustein, J. D. (2009). Reduced behavioral response to gonadal hormones in mice shipped during the peripubertal/adolescent period. *Endocrinology* 150, 2351–2358. doi: 10.1210/en.2008-1595
- Macbeth, A. H., Edds, J. S., and Young, W. S. (2009). Housing conditions and stimulus females: a robust social discrimination task for studying male rodent social recognition. *Nat. Protoc.* 4, 1574–1581. doi: 10.1038/nprot.2009.141
- Meyer-Lindenberg, A., and Tost, H. (2012). Neural mechanisms of social risk for psychiatric disorders. *Nat. Neurosci.* 15, 663–668. doi: 10.1038/nn.3083
- Miczek, K. A., Maxson, S. C., Fish, E. W., and Faccidomo, S. (2001). Aggressive behavioral phenotypes in mice. *Behav. Brain Res.* 125, 167–181. doi: 10.1016/S0166-4328(01)00298-4
- Moy, S. S., Nadler, J. J., Perez, A., Barbaro, R. P., Johns, J. M., Magnuson, T. R., et al. (2004). Sociability and preference for social novelty in five inbred strains: an approach to assess autistic-like behavior in mice. *Genes Brain Behav.* 3, 287–302. doi: 10.1111/j.1601-1848.2004.00076.x
- Moy, S. S., Nadler, J. J., Young, N. B., Perez, A., Holloway, L. P., Barbaro, R. P., et al. (2007). Mouse behavioral tasks relevant to autism: phenotypes of 10 inbred strains. *Behav. Brain Res.* 176, 4–20. doi: 10.1016/j.bbr.2006.07.030
- Murai, T., Okuda, S., Tanaka, T., and Ohta, H. (2007). Characteristics of object location memory in mice: behavioral and pharmacological studies. *Physiol. Behav.* 90, 116–124. doi: 10.1016/j.physbeh.2006.09.013
- Schindelin, J., Arganda-Carreras, I., Frise, E., Kaynig, V., Longair, M., Pietzsch, T., et al. (2012). Fiji: an open-source platform for biological-image analysis. *Nat. Meth.* 9, 676–682. doi: 10.1038/nmeth.2019
- Schmeisser, M. J., Ey, E., Wegener, S., Bockmann, J., Stempel, A. V., Kuebler, A., et al. (2012). Autistic-like behaviours and hyperactivity in mice lacking ProSAP1/Shank2. *Nature* 486, 256–260. doi: 10.1038/nature11015
- Shemesh, Y., Sztainberg, Y., Forkosh, O., Shlapobersky, T., Chen, A., and Schneidman, E. (2013). High-order social interactions in groups of mice. *Elife* 2, e00759. doi: 10.7554/eLife.00759
- Silverman, J. L., Yang, M., Lord, C., and Crawley, J. N. (2010). Behavioural phenotyping assays for mouse models of autism. *Nat. Rev. Neurosci.* 11, 490–502. doi: 10.1038/nrn2851
- Singleton, G. R., and Krebs, C. J. (2007). "The secret world of wild mice," in *The Mouse in Biomedical Research*, eds J. G. Fox, S. W. Barthold, M. T. Davisson, C. E. Newcomer, F. W. Quimby, and S. L. Smith (San Diego, CA: Academic Press), 25–51. doi: 10.1016/B978-012369454-6/50015-7
- Tabuchi, K., Blundell, J., Etherton, M. R., Hammer, R. E., Liu, X., Powell, C. M., et al. (2007). A neuroligin-3 mutation implicated in autism increases inhibitory synaptic transmission in mice. *Science* 318, 71–76. doi: 10.1126/science.1146221
- Tanaka, J. W., Wolf, J. M., Klaiman, C., Koenig, K., Cockburn, J., Herlihy, L., et al. (2010). Using computerized games to teach face recognition skills to children with autism spectrum disorder: the Let's Face It! program. *J. Child Psychol. Psychiatry* 51, 944–952. doi: 10.1111/j.1469-7610.2010.02258.x
- Tantra, M., Hammer, C., Kästner, A., Dahm, L., Begemann, M., Bodda, C., et al. (2014). Mild expression differences of MECP2 influencing aggressive social behavior. *EMBO Mol. Med.* 6, 662–684. doi: 10.1002/emmm.201303744
- Tsai, N.-P., Wilkerson, J. R., Guo, W., Maksimova, M. A., Demartino, G. N., Cowan, C. W., et al. (2012). Multiple autism-linked genes mediate synapse elimination via proteasomal degradation of a synaptic scaffold PSD-95. *Cell* 151, 1581–1594. doi: 10.1016/j.cell.2012.11.040

- Weissbrod, A., Shapiro, A., Vasserman, G., Edry, L., Dayan, M., Yitzhaky, A., et al. (2013). Automated long-term tracking and social behavioural phenotyping of animal colonies within a semi-natural environment. *Nat. Commun.* 4:2018. doi: 10.1038/ncomms3018
- Yao, W.-D., Gainetdinov, R. R., Arbuckle, M. I., Sotnikova, T. D., Cyr, M., Beaulieu, J.-M., et al. (2004). Identification of PSD-95 as a regulator of dopamine-mediated synaptic and behavioral plasticity. *Neuron* 41, 625–638. doi: 10.1016/S0896-6273(04)00048-0
- Yizhar, O., Fenno, L. E., Prigge, M., Schneider, F., Davidson, T. J., O'Shea, D. J., et al. (2011). Neocortical excitation/inhibition balance in information processing and social dysfunction. *Nature* 477, 171–178. doi: 10.1038/nature10360

Conflict of Interest Statement: The authors declare that the research was conducted in the absence of any commercial or financial relationships that could be construed as a potential conflict of interest.

Copyright © 2016 Krueger-Burg, Winkler, Mitkovski, Daher, Ronnenberg, Schlüter, Dere and Ehrenreich. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (CC BY). The use, distribution or reproduction in other forums is permitted, provided the original author(s) or licensor are credited and that the original publication in this journal is cited, in accordance with accepted academic practice. No use, distribution or reproduction is permitted which does not comply with these terms.