

Camila Ematné do Amaral

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

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

Área de concentração: Farmacologia

Orientadora: Profa. Dra. Silvana Chiavegatto

Versão original

São Paulo
2012

RESUMO

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

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

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

ABSTRACT

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

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

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

1 INTRODUÇÃO

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

1.1 Depressão induzida pelo estresse

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

1.2 Estresse na adolescência e na fase adulta

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

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

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

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

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

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

1.3 Modelos animais e o estresse crônico

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

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

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

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

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

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

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

1.4 Plasticidade neural, estresse e depressão

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

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

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

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

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

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

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

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

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

1.5 Fator de transcrição MAX

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

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

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

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

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

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

6 CONCLUSÃO

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

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

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

REFERÊNCIAS*

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

* De acordo com:

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Buwalda B, Kole MH, Veenema AH, Huininga M, de Boer SF, Korte SM, et al. Long-term effects of social stress on brain and behavior: a focus on hippocampal functioning. *Neurosci Biobehav Rev*. 2005;29(1):83-97.

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Strekalova T, Spanagel R, Bartsch D, Henn FA, Gass P. Stress-induced anhedonia in mice is associated with deficits in forced swimming and exploration. *Neuropsychopharmacology*. 2004;29(11):2007-17.

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

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

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

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

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

Teicher MH, Anderson CM, Polcari A. Childhood maltreatment is associated with reduced volume in the hippocampal subfields CA3, dentate gyrus, and subiculum. *Proc Natl Acad Sci.* 2012.28;109(9):563-72.

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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