

JOSÉ FRANCIS DE OLIVEIRA

**MODULAÇÃO DA PLASTICIDADE SINÁPTICA POR TREK-1 E 5HT_{1A} NO ESTRESSE
CRÔNICO PÓS-NATAL**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação
em Fisiologia Humana do Instituto de Ciências
Biomédicas da Universidade de São Paulo, para
obtenção do Título de Doutor em Ciências.

São Paulo

2020

JOSÉ FRANCIS DE OLIVEIRA

**Modulação da Plasticidade Sináptica por TREK-1 e 5HT_{1A} no Estresse Crônico
Pós-Natal**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Fisiologia Humana do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, para obtenção do Título de Doutor em Ciências.

Área de concentração: Fisiologia Humana

Orientador: Prof. Dr. Roberto De Pasquale

Versão corrigida

São Paulo

2020

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

Ficha Catalográfica elaborada pelo(a) autor(a)

de Oliveira, José Francis
Modulação da Plasticidade Sináptica por TREK-1 e
5HT1A no Estresse Crônico Pós-Natal / José Francis de
Oliveira; orientador Roberto De Pasquale. -- São
Paulo, 2020.
105 p.

Tese (Doutorado) -- Universidade de São Paulo,
Instituto de Ciências Biomédicas.

1. Serotonina. 2. Estresse. 3. 5HT1A. 4. TREK-1.
5. Separação Materna. I. De Pasquale, Roberto,
orientador. II. Título.

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

Candidato:

José Francis de Oliveira

Título da Tese:

Modulação da Plasticidade Sináptica por TREK-1 e 5HT_{1A} no Estresse Crônico Pós-Natal

Orientador:

Dr. Roberto De Pasquale

A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa da Dissertação de Mestrado/Tese de Doutorado, em sessão pública realizada a **29/05/2020**, considerou o candidato:

(X) Aprovado () Reprovado

Examinador(a): Assinatura:

Nome: Manoel de Arcisio Miranda Filho

Instituição: Universidade Federal de São Paulo (UNIFESP)

Examinador(a): Assinatura:

Nome: Carolina Demarchi Munhoz

Instituição: Universidade de São Paulo (USP)

Examinador(a): Assinatura:

Nome: Fernando Abdulkader

Instituição: Universidade de São Paulo (USP)

Presidente: Assinatura:

Nome: Roberto De Pasquale

Instituição: Universidade de São Paulo (USP)

CERTIFICADO

Certificamos que o projeto intitulado "**Avaliação do Papel Fisiológico dos Canais TREK-1 na Modulação Neural do Estresse**", registrado sob o protocolo nº **54/2016**, que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de *Pesquisa Científica*, encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle e Experimentação Animal (CONCEA). Ante esta conformidade, o referido projeto foi avaliado e aprovado em **16/08/2016** pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo (CEUA-ICB/USP), outorgando esta licença de uso de animais com validade de **4 ano(s)** a partir da data de aprovação.

- Investigador Principal: **Dr.(a.) Roberto de Pasquale**

- Departamento: *Fisiologia e Biofísica*

- Membros da Equipe: *José Francis de Oliveira (Pós-graduando), Thiago Fernando Beckhauser Rodrigues (Pós-graduando)*

Ao final do período outorgado por esta licença, o pesquisador responsável deverá encaminhar a esta comissão, até o último dia de validade da atual proposta, *relatório final* de acordo com a Resolução Normativa CONCEA nº 30/2016 - Diretriz Brasileira para o Cuidado e a Utilização de Animais em Atividades de Ensino ou de Pesquisa Científica (DBCA), conforme modelo constante no endereço eletrônico www.icb.usp.br/ceua. Havendo interesse na renovação do projeto, a solicitação deverá ser protocolada pela Secretaria da CEUA-ICB/USP até o último dia de validade da atual proposta. Após esta data uma nova proposta deverá ser encaminhada.

CERTIFICATE

We hereby certify that the project entitled "**Evaluation of TREK-1 Physiological Role in Neural Stress Modulation**", protocol nº **54/2016**, which involves the production, maintenance and/or use of animals belonging to the phylum Chordata, subphylum Vertebrata (except human), for *Scientific Research Purposes*, is in accordance with the provisions of the Law nº 11.794 passed on October 8th, 2008, Decree nº 6899 passed on July 15th, 2009, and the rules issued by the National Council for Control and Animal Experimentation (CONCEA). According to this legislation, the project was evaluated and approved on **8/16/2016** by the ETHICS COMMITTEE ON ANIMAL USE, Institute of Biomedical Sciences, University of Sao Paulo (CEUA-ICB/USP), and the license for animal use is valid for **4 year(s)** from the date of approval.

- Principal Investigator: **Dr.(a.) Roberto de Pasquale**

- Team members: *José Francis de Oliveira (Graduate Student), Thiago Fernando Beckhauser Rodrigues (Graduate Student)*.

At the end of the period granted by this license, the Principal Investigator must submit a final report of the project to this committee, according to the Rule nº 30 and the Diretriz Brasileira para o Cuidado e a Utilização de Animais em Atividades de Ensino ou de Pesquisa Científica (DBCA) issued by the CONCEA. If a renewal of the project is intended, the request must be submitted to the CEUA-ICB/USP secretary before the expiration of the current proposal. After this date, a new proposal must be prepared.

Espécie/Species	Linhagem/Strain	Sexo/Gender	Idade-Peso/ Age-Weight	Total
<i>Rattus Norvegicus</i>	<i>Wistar</i>	<i>Fêmea/female</i>	<i>75 dias/days</i>	<i>120</i>
	<i>Wistar</i>	<i>Macho/Male</i>	<i>75 dias/days</i>	<i>60</i>

São Paulo, 19 de agosto de 2016.


Prof. Dr. **Anderson de Sá Nunes**
Coordenador CEUA-ICB/USP


Eliane Aparecida Gomes de M. Nascimento
Secretária CEUA-ICB/USP

AGRADECIMENTOS

Ao Dr. Roberto, pelas excelentes e constantes discussões científicas e filosóficas durante a execução desse trabalho, não somente relacionadas aos temas desse estudo, mas também a tópicos de outras naturezas.

A Carolina Parga, Matheus Azevedo Barbosa e Elisa Guimarães Souza, pelo companheirismo e apoio no cotidiano do laboratório.

A Matheus Garcia de Fragas e Guilherme Higa, pelos debates e compartilhamento de ideias sobre os mais variados tópicos das ciências naturais. Além disso, Guilherme foi responsável pela confecção de uma das figuras empregadas nesse trabalho (Figura 16).

A Adilson, pela assistência técnica na execução dos experimentos cujos dados são aqui apresentados.

Ao Prof. Luiz Britto, pelos conselhos acerca da carreira científica e sugestões para esse trabalho.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001 e verba PROEX (Programa de Excelência Acadêmica).

A FAPESP, pelo fornecimento de bolsa de estudo a nível de doutorado e financiamento do projeto cujos resultados estão aqui expostos, tornando possível a realização do mesmo (Processo nº 2016/09116-0). Esse trabalho também utilizou materiais provenientes de recursos do Auxílio Regular FAPESP nº 2011/23874-0 que estava aprovado no laboratório pelo Prof. Dr. Roberto De Pasquale.

Eu descobri em mim mesmo desejos os quais nada nesta Terra pode satisfazer.

A única explicação lógica é que eu fui feito para outro mundo.

C.S. Lewis

(Surpreendido pela Alegria, 1955)

RESUMO

DE OLIVEIRA, J. F. **Modulação da Plasticidade Sináptica por TREK-1 e 5HT_{1A} no Estresse Crônico Pós-Natal**. [Tese de Doutorado (Fisiologia Humana)]. São Paulo: Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo; 2020.

O estresse está relacionado a gênese de várias doenças, como ansiedade e depressão, sendo as mulheres mais suscetíveis ao desenvolvimento de depressão. Estresse durante o período da infância e adolescência pode levar a efeitos permanentes na idade adulta, relacionados ao desenvolvimento de doenças neuropsiquiátricas. O sistema serotoninérgico desempenha papel fundamental na modulação da resposta ao estresse, sendo o receptor serotoninérgico 5HT_{1A} um dos mais importantes na circuitaria cerebral da resposta ao estresse. A serotonina é um neurotransmissor importante na modulação da plasticidade sináptica, a qual é um evento neuronal importante que se encontra prejudicado na depressão, e este neurotransmissor pode atuar em canais de potássio na membrana e modificar a excitabilidade neuronal. Os canais de potássio do tipo TREK-1 têm sido relacionados com a etiologia de doenças relacionadas ao estresse, e camundongos nocaute para esses canais são resilientes à depressão. Nesse trabalho, se demonstra que o estresse pós-natal presente no modelo de Separação Materna (MS) induz comportamento depressivo-símile em ratos infantis, de maneira sexo-dependente, sendo as fêmeas mais vulneráveis à MS. Alterações correlacionadas na expressão de 5HT_{1A} e TREK-1 ocorrem no córtex entorrinal em machos infantis, e estão relacionadas com um fenótipo relativamente resiliente à depressão, enquanto alterações correlacionadas no giro denteado do hipocampo estão associadas a vulnerabilidade à depressão, em fêmeas infantis. A ativação de 5HT_{1A} no córtex pré-límbico é suficiente para induzir uma depressão sináptica de longo prazo (LTD), sendo esse efeito dependente da abertura de canais TREK-1. Porém, o bloqueio de TREK-1 também é suficiente para induzir LTD no PL através de um efeito pós-sináptico. A MS altera componentes de plasticidade sináptica associados ao bloqueio de TREK-1 no córtex pré-límbico, uma vez que animais MS apresentam também um componente pré-sináptico para essa LTD. Conclui-se que o estresse pós-natal induz maior vulnerabilidade neuropsiquiátrica em fêmeas, modificando a expressão de 5HT_{1A} e TREK-1 na circuitaria corticolímbica, resultando em plasticidade sináptica alterada no córtex pré-límbico e alterações de comportamento.

Palavras-chave: Serotonina. Estresse. 5HT_{1A}. Comportamento. TREK-1.

ABSTRACT

DE OLIVEIRA, J. F. **Synaptic Plasticity Modulation by TREK-1 and 5HT_{1A} in Postnatal Chronic Stress**. [PhD Thesis (Human Physiology)]. Sao Paulo: Biomedical Sciences Institute, Sao Paulo University; 2020.

Stress is associated to the etiology of several diseases, such as anxiety and depression, and women are more vulnerable to develop depression. Early-life stress, including adolescence, can lead to permanent effects at adulthood, related to neuropsychiatric illnesses development. The serotonergic system has a fundamental role in the stress response modulation, being the serotonergic receptor 5HT_{1A} one of the most important in the brain stress circuitry. Serotonin is a neurotransmitter important for synaptic plasticity, which is a key neuronal event impaired in depression, and this neurotransmitter can act on potassium channels in the membrane and alter neuronal excitability. TREK-1 potassium channels had been associated to stress related diseases, and knockout mice for these channels are depression resilient. This study demonstrated that early-life stress, present in the Maternal Separation (MS) model, is able to induce depressive-like behavior in infant rats, in a sex-dependent way, being females more vulnerable to MS. Correlated changes in 5HT_{1A} and TREK-1 expression occur in the entorhinal cortex in infant males, and are associated to a phenotype relatively resilient do depression, while correlated changes in the dentate gyrus of the hippocampus are associated to vulnerability to depression in infant females. 5HT_{1A} activation in the prelimbic cortex is sufficient to evoke a long-term synaptic depression (LTD), and this effect is dependent on the opening of TREK-1 channels. Nevertheless, TREK-1 blockage is also enough to elicit an LTD in the PL through a postsynaptic mechanism. MS alters the components of synaptic plasticity associated to this blockage, as MS animals also present a presynaptic component for this LTD. In conclusion, early-life stress produced by MS can induce increased neuropsychiatric vulnerability in females, modifying 5HT_{1A} and TREK-1 expression in the corticolimbic circuitry, resulting in altered synaptic plasticity in the prelimbic cortex and behavioral changes.

Keywords: Serotonin. Stress. 5HT_{1A}. Behavior. TREK-1.

LISTA DE ABREVIATURAS

5-HT – Serotonina

8-OH-DPAT – Agonista serotoninérgico seletivo para 5HT_{1A}

ACTH – Hormônio Adrenocorticotrófico

AMPA – Receptor de ácido α -amino-3-hidroxi-metil-5-4-isoxazolpropiónico (glutamatérgico do tipo ionotrópico)

BDNF – Fator Neurotrófico Derivado do Cérebro

BLA – Núcleo Basolateral da Amígdala

c-fos – Proteína expressada por um *early immediate gene*, utilizada como marcador de ativação neuronal recente

CaMKII – Cálcio-Calmodulina Kinase do tipo II

CeA – Núcleo Central da Amígdala

CMS – *Chronic Mild Stress* (Estresse Crônico Leve – um modelo animal de depressão)

DRN – Núcleos Dorsais da Rafe (produzem serotonina)

ERh – Córtex Entorrinal

FST – Teste do Nado Forçado

GD – Giro Denteado do Hipocampo

GABA – ácido γ -amino-butírico (neurotransmissor inibitório)

GABAérgico – Neurônios que utilizam GABA como neurotransmissor

HIN – Teste de Hipofagia Induzida pela Novidade

HPA – Eixo Hipotálamo-Hipófise-Adrenal

IL – Córtex Infra-Límbico

LTD – Depressão Sináptica de Longo Prazo

LTP – Potenciação Sináptica de Longo Prazo

mPFC – Córtex medial Pré-Frontal

MS – Separação Materna

MeA – Núcleo Medial da Amígdala

NAST – Núcleo Anterior da Estria Terminal

NMDA – Receptor de N-metil-D-aspartato (glutamatérgico do tipo ionotrópico)

OF – Teste do Campo Aberto

PFC – Córtex Pré-Frontal

PKA – Proteína Kinase A (ativada por cAMP)

PKC – Proteína Kinase C (ativada pela fosfolipase C)

PL – Córtex Pré-Límbico

PVN – Núcleo Paraventricular do Hipotálamo

PND – Dia Pós-Natal

SERT – Transportador de Serotonina, envolvido na recaptura de serotonina na sinapse

SPT – Teste de Preferência pela Sacarose

TREK-1 – Canal de Potássio *Twik-related* do tipo 1

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	12
1.1 O Período Perinatal e o Estresse	12
1.2 O Papel do PFC na Regulação da Resposta ao Estresse	13
1.3 Impacto do Estresse Pós-Natal na Plasticidade Sináptica no PFC.....	16
1.4 Modulação Serotonérgica na Resposta ao Estresse	19
1.4.1 Envolvimento da Serotonina na Função do PFC.....	20
1.4.2 Mecanismos de Modulação Serotonérgica da Plasticidade Sináptica	22
1.5 Serotonina e TREK-1 na Resposta ao Estresse	23
1.6 Dimorfismo Sexual na Resposta ao Estresse	27
2 OBJETIVOS E HIPÓTESE.....	28
3 METODOLOGIA	29
3.1 Acasalamento e Acompanhamento dos Filhotes	29
3.2 Separação Materna	30
3.3 Desenho Experimental	31
3.4 Testes de Comportamento	31
3.4.1 Nado Forçado.....	32
3.4.2 Hipofagia Induzida pela Novidade	33
3.4.3 Preferência pela Sacarose.....	34
3.4.4 Campo Aberto.....	35
3.5 Imunoistoquímica.....	35
3.6 Western-blot (SDS-PAGE).....	37

3.7 Estudo Eletrofisiológico em brain slices	39
3.7.1 Preparo de cortes de cérebro (<i>brain slices</i>).....	39
3.7.2 Micropipetas	40
3.7.3 Registro Eletrofisiológico	40
3.7.4 Estimulação Elétrica e Protocolo de <i>theta burst</i>	44
3.7.5 Drogas	44
3.7.6 Desenho Experimental do Estudo Eletrofisiológico	45
3.7.7 Pulso Pareado	46
3.7.8 Análise de Dados Eletrofisiológicos	47
3.8 Estatística.....	47
4 RESULTADOS.....	50
4.1 Alterações comportamentais em animais infantis MS	50
4.1.1 Fêmeas são mais vulneráveis ao desespero comportamental induzido pela MS.....	50
4.1.2 A impulsividade não é afetada pela MS, e fêmeas são mais impulsivas que machos	52
4.1.3 Anedonia não é induzida em ratos infantis pela MS, mas o autocuidado é reduzido	53
4.1.4 A MS não altera a locomoção nem o comportamento exploratório	54
4.1.5 Quadro geral de alterações comportamentais induzidas pela MS	55
4.2 Imunoistoquímica para TREK-1 e 5HT _{1A}	56
4.2.1 Imunomarcção para TREK-1 está em geral aumentada em animais MS.....	56
4.2.2 A MS modifica a quantidade de 5HT _{1A} de forma sexo- e área-dependente, em geral.....	59
4.2.3 Correlações nos efeitos da MS sobre o 5HT _{1A} e TREK-1 ocorrem no ERh e GD	62
4.3 Western-blot para TREK-1 e 5HT _{1A}	63
4.4 Estudo eletrofisiológico da plasticidade sináptica no córtex pré-límbico.....	67
4.4.1 5-HT é suficiente para induzir LTD no PL	67
4.4.2 Sinalização por 5HT _{1A} ou bloqueio de TREK-1 induz LTD no PL.....	68
4.4.3 A LTD induzida pela ativação de 5HT _{1A} é prevenida pelo bloqueio de TREK-1	70
4.4.4 <i>Theta burst</i> elicit plasticidade bidirecional no PL	71

4.4.5 A 5-HT não tem impacto na plasticidade induzida por <i>theta burst</i>	72
4.4.6 Sinalização via 5HT _{1A} não modula a plasticidade sináptica induzida por <i>theta burst</i>	73
4.4.7 A MS altera a plasticidade induzida por <i>theta burst</i> quando TREK-1 é bloqueado	74
4.4.8 A plasticidade sináptica no PL é influenciada por TREK-1 e 5HT _{1A} através de múltiplos mecanismos	75
5 DISCUSSÃO	78
5.1 Comportamento depressivo-símile é induzido pela MS	78
5.2 A vulnerabilidade aos efeitos do estresse pós-natal é sexo-dependente	79
5.3 Alterações Neurobiológicas em TREK-1 e 5HT _{1A} pela MS	81
5.3.1 A MS induz aumento da imunomarcção para 5HT _{1A} na BLA, resultando em fenótipo relativamente resiliente à depressão em machos, mas não em fêmeas	81
5.3.2 5HT _{1A} e TREK-1 são modulados de forma correlacionada pela MS no ERh e GD de forma sexo-dependente	83
5.3.3 A MS causa desbalanço excitação/inibição no circuito PL-BLA em machos e fêmeas através do aumento da quantidade de TREK-1	84
5.3.4 Mudanças na expressão de TREK-1 no ERh e GD gera hiperexcitabilidade desse circuito nos machos	86
5.3.5 O estresse pós-natal pela MS induz alterações em sub-regiões específicas da circuitaria de estresse	87
5.4 A plasticidade sináptica no PL pode ser modulada por 5HT _{1A} e TREK-1	87
5.4.1 Ativação de 5HT _{1A} ou bloqueio de TREK-1 induz LTD no PL	88
5.4.2 A LTD induzida por 5HT _{1A} no PL depende da ativação de TREK-1	89
5.5 A frequência theta induz plasticidade bidirecional no PL	90
5.5.1 A 5-HT não altera a plasticidade induzida por <i>theta burst</i> no PL	91
5.5.2 TREK-1 influencia a plasticidade induzida por <i>theta burst</i> no PL em animais MS.....	92
6 CONCLUSÃO.....	93

REFERÊNCIAS	94
-------------------	----

1 INTRODUÇÃO

Situações que ameaçam a homeostase do organismo provocam alterações fisiológicas que devem resultar em alterações de comportamento, para a adaptação do organismo à alteração do ambiente. Essa resposta envolve múltiplos efetores e moduladores, e é denominada de *resposta ao estresse*, enquanto agentes que promovem distúrbios na homeostase podem ser chamados de *estressores*. O papel do sistema nervoso central na articulação dessa resposta é complexo e envolve várias redes neurais diferentes, bem como múltiplos neurotransmissores que interagem com hormônios e outras informações sensoriais, presentes durante a resposta ao estresse [1]. A prevalência de doenças e problemas de saúde relacionados ao estresse vem aumentando nas últimas décadas, tornando o estresse um tópico de estudo importante para a compreensão da fisiopatologia dessas doenças [2, 3].

O estresse tem sido apontado como fator etiológico de várias doenças, como ansiedade, depressão e doenças cardiovasculares [4, 5]. Devido a essa relação já demonstrada na literatura, tanto em estudos com humanos e com modelos animais, o estresse vem se tornando um tópico de estudo cada vez mais importante [2, 6, 7]. Algumas áreas cerebrais importantes no processamento da resposta de estresse são a amígdala, o hipocampo, o hipotálamo, os núcleos dorsais da rafe (DRN) e o córtex pré-frontal (PFC) [5, 8-10]. As ações dos mediadores liberados durante uma resposta ao estresse nessas áreas tem sido postuladas como responsáveis pelas alterações neurais vistas em estudos de estresse, e têm sido ligadas à fisiopatologia das doenças relacionadas ao estresse [2, 7, 11, 12].

1.1 O Período Perinatal e o Estresse

Durante o período perinatal, a exposição a experiências adversas pode afetar de forma duradoura o desenvolvimento cognitivo e emocional [13, 14]. Esse período é altamente sensível a vários fatores para o cérebro em desenvolvimento, tanto em humanos como em roedores. Em roedores, esse período começa imediatamente após o parto e termina com o desmame, que ocorre geralmente no dia pós-natal (PND) 21. De fato, o estresse pós-natal é considerado um agente etiológico de doenças neuropsiquiátricas pela psicologia há alguns anos, e estudos nas últimas décadas, com humanos e modelos animais, têm apresentado

evidências de que a presença de estresse na infância está correlacionada com o desenvolvimento de doenças neuropsiquiátricas no futuro [15, 16]. O papel do sistema nervoso central na articulação da resposta ao estresse pós-natal é complexo e envolve várias redes neurais diferentes [14].

Ao longo do desenvolvimento e do crescimento, o sistema nervoso é constantemente reprogramado para responder a potenciais estressores específicos de uma certa fase da vida [17, 18]. Assim, a resposta ao estresse no período pós-natal difere quali e quantitativamente das respostas observadas na fase pré-natal ou adulta, pelo fato de o sistema nervoso reagir seletivamente aos estímulos que são relevantes nesse período [19, 20]. A separação materna (MS) e a hipotermia são consideradas estressores típicos da fase pós-natal em modelos animais: durante as duas primeiras semanas de vida, os roedores mostram elevação nos níveis plasmáticos de corticosterona e catecolaminas em resposta a esses tipos de estressores [21-23], e que também podem promover efeitos permanentes, observados na vida adulta [24-27]. Assim, modelos animais que envolvem perturbar o comportamento materno são utilizados para o estudo da etiologia e fisiopatologia das doenças neuropsiquiátricas, tais como a depressão e a ansiedade [28]. No entanto, há poucos dados a respeito de animais no período compreendido entre o PND21 (quando acontece o desmame) e o PND35 (quando o roedor é considerado adolescente), o que corresponderia a infância humana [29], visto que a maioria dos estudos empregam animais já na idade adulta.

1.2 O Papel do PFC na Regulação da Resposta ao Estresse

Das áreas cerebrais mencionadas anteriormente, o PFC desempenha um papel crucial na regulação do comportamento, atuando como mediador entre as informações sensoriais, as emoções e a memória [30]. Esta região cerebral está envolvida no planejamento de comportamentos e pensamentos complexos, como a memória de trabalho e a expressão da personalidade [1]. A atividade dessa região determina pensamentos e ações que estão em acordo com metas internas, julgando e inibindo escolhas e estratégias inadequadas e tornando-se assim fundamental para a execução de tarefas que requerem concentração e atenção, e para os comportamentos de tomada de decisão (*decision making*) [31-34]. No entanto, essa habilidade do PFC não se desenvolve apenas seguindo uma programação

genética prévia: ela também exige informações sobre o ambiente externo nos estágios iniciais da vida. Daí o fato das experiências ambientais orientarem o desenvolvimento neural e levarem a alterações irreversíveis na formação de circuitos neurais, prejudicando o desenvolvimento das funções cognitivas associadas a essa área [35, 36]. Portanto, perturbações ambientais que afetem o PFC na infância apresentam a possibilidade de modular estratégias comportamentais no futuro, podendo gerar circuitos que impeçam o indivíduo de responder adequadamente a um ambiente em constante mudança, ou induzir respostas inadequadas frente a desafios ambientais na vida adulta.

O PFC compreende várias subdivisões que desempenham funções diferentes. As subdivisões do PFC mais envolvidas na regulação do humor e em funções cognitivas se encontram no córtex medial pré-frontal (mPFC), que compreende o córtex pré-límbico (PL) e o córtex infralímbico (IL), (**Figura 1**) sendo que essas duas sub-regiões parecem desempenhar papéis diferentes no controle do estresse. As fibras que partem do PL e IL tendem a possuir alvos distintos: as projeções do IL inervam extensivamente estruturas que participam do aumento da resposta ao estresse, como o núcleo anterior da estria terminal (NAST), a amígdala medial (MeA) e central (CeA), e o núcleo do trato solitário, enquanto as projeções do PL inervam áreas envolvidas na inibição da resposta ao estresse, tais como a área pré-óptica ventrolateral e o hipotálamo dorsomedial [37-39].

No PL, o córtex é organizado em camadas, sendo a camada I por onde chegam as fibras de projeções aferentes para o PL, que se conectam com a árvore dendrítica de neurônios piramidais excitatórios situados na camada V, os quais são responsáveis pela integração das respostas no PL e pela formação das projeções eferentes [40]. A camada IV é inexistente em roedores, e a camada II/III, logo abaixo da camada I, consiste principalmente de interneurônios inibitórios. O PL e IL possuem conexões anatômicas com outras duas áreas relevantes para a compreensão da resposta ao estresse: o córtex entorrinal (ERh), o qual se projeta para o giro denteado do hipocampo (GD), formando o circuito responsável pela formação de memórias atreladas ao sistema límbico; e a amígdala, em particular a amígdala basolateral (BLA), que integra informações sensoriais e está em constante comunicação com o PFC, sendo responsável pelo gerenciamento das emoções e sua contextualização [41-43]. A amígdala consiste em uma série de núcleos que operam em conjunto. No âmbito desse trabalho, o núcleo basolateral da amígdala (BLA) foi o ponto de interesse em relação a

resposta ao estresse, visto que é nele que ocorre a plasticidade dependente de estímulos ambientais, e é nesse núcleo que a integração e associação de respostas emocionais e sensoriais acontece [44].

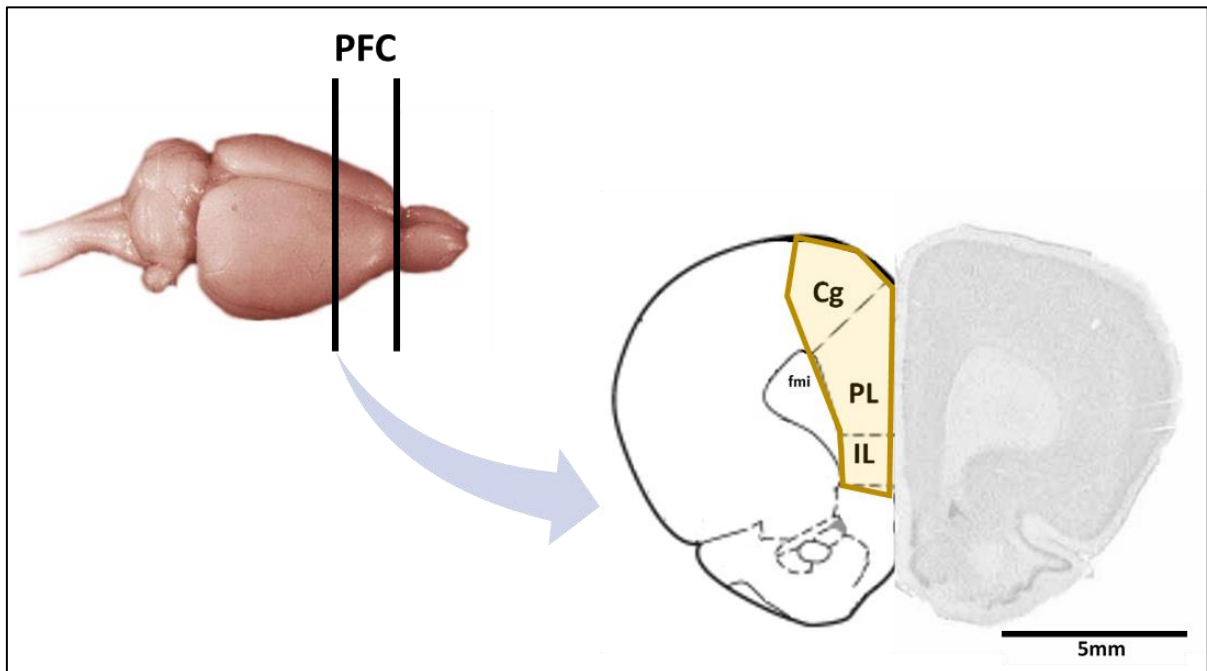


Figura 1. Anatomia do Córtex Pré-Frontal medial. A figura ilustra o local onde se deve realizar uma secção com o objetivo de isolar o córtex pré-frontal (PFC) das demais áreas cerebrais, em um cérebro de rato. Um corte coronal no primeiro traço ilustra a região chamada mPFC (córtex medial pré-frontal), demarcada na área colorida em amarelo, onde podem ser definidas as subdivisões: córtex pré-límbico (PL), córtex infralímbico (IL) e córtex cingulado (Cg). fmi = *fórcex minor*.

De acordo com achados anatômicos, alguns estudos indicaram que o PL poderia atuar como inibidor da resposta de estresse, enquanto o IL teria o papel contrário, ativando tais respostas. Apesar do NAST receber mais projeções do IL, o PL tem um controle inibitório sobre o núcleo paraventricular do hipotálamo (PVN) através do NAST: uma subpopulação de neurônios piramidais do PL inerva um grupo de neurônios do NAST que secretam como neurotransmissor o ácido γ -aminobutírico (GABA), que inibe o núcleo paraventricular (PVN) e, conseqüentemente, reduz a ativação do eixo hipotálamo-hipófise-adrenal (HPA) induzida pelo estresse [45]. Lesões no PL causam aumento da expressão de mRNA para *c-fos* no PVN, aumento da liberação do hormônio adrenocorticotrófico (ACTH) e de secreção de corticosterona quando da exposição a situações estressoras [46-48]. Por outro lado, animais com lesões no IL do hemisfério direito apresentam diminuição de ACTH e corticosterona durante a resposta ao estresse, e atenuam a secreção de ACTH induzida pela injeção de

interleucina-1 β [49, 50]. Isso sugere que o IL é o responsável por efetuar a resposta ao estresse, ao passo que o PL atua como um contensor dessa resposta.

1.3 Impacto do Estresse Pós-Natal na Plasticidade Sináptica no PFC

As consequências fisiológicas e moleculares da exposição pós-natal ao estresse envolvem alterações neurobiológicas no PFC e no hipocampo, as quais se correlacionam com alterações comportamentais que podem persistir até a idade adulta, sugerindo que os estímulos estressores no período pós-natal podem prejudicar a plasticidade sináptica durante o desenvolvimento [51]. No entanto, a maioria dos estudos que abordaram essa questão limitaram-se a observar unicamente no organismo adulto as consequências de um protocolo de estresse que foi aplicado no período pós-natal [22, 52-54]. Portanto, o que ocorre durante os períodos que compreendem o PND0 ao PND35 em resposta ao estresse ainda foi pouco investigado.

Para que a plasticidade sináptica ocorra, é necessária uma alteração na expressão de receptores glutamatérgicos ionotrópicos na membrana neuronal, permitindo uma maior ou menor despolarização do neurônio. Os receptores de glutamato podem ser divididos em dois tipos: receptores de ácido α -amino-3-hidroxi-metil-5-4-isoxazolpropiónico (AMPA), e receptores de N-metil-D-aspartato (NMDA) [55]. Ambos podem ser modulados através de vias de sinalização intracelular que envolvem a proteína quinase A (PKA), a cálcio-calmodulina quinase do tipo II (CaMKII) e a proteína quinase C (PKC), entre outras [56] (**Figura 2**). Há alguns estudos que investigaram o hipocampo, apontando que o estresse pós-natal causa diminuição da expressão de receptores que levam a excitação neuronal, tais como os receptores de NMDA, sugerindo uma redução da potenciação sináptica que poderia estar na base das alterações comportamentais provocadas pela exposição a estresse [57, 58]. Os mecanismos moleculares responsáveis por esses efeitos podem envolver alterações na expressão e/ou função de diversos receptores, bem como proteínas envolvidas nas vias de sinalização que interagem com esses receptores e canais iônicos relevantes para a excitabilidade neuronal. Duas formas clássicas de plasticidade sináptica são a potenciação sináptica de longo prazo (LTP), um fenômeno de plasticidade sináptica onde uma determinada sinapse apresenta uma resposta aumentada frente a um estímulo que antes promovia uma resposta de menor

intensidade, e a depressão sináptica de longo prazo (LTD), onde ocorre o inverso. Ambas LTP e LTD permitem que as redes neuronais se reorganizem de acordo com a experiência.

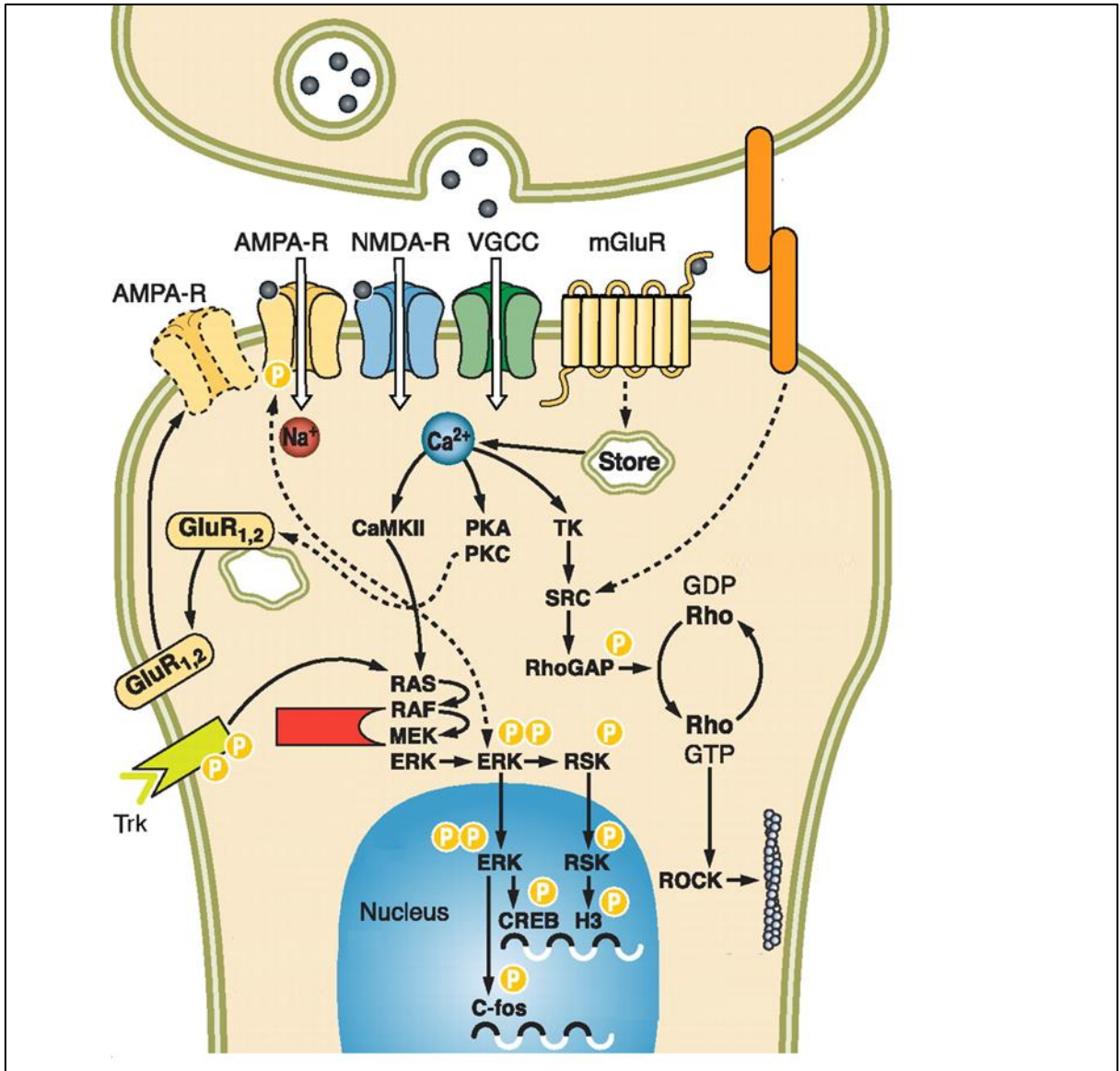


Figura 2. Modulação da Plasticidade Sináptica por diferentes vias de sinalização intracelular. Um dos principais sinais importantes para a indução de plasticidade é o cálcio intracelular, o qual por sua vez inicia a ativação de vias de sinalização pela CaMKII, PKA e PKC. Essas cinases também podem ser ativadas por receptores acoplados a proteína G. Além disso, outros mecanismos também podem desempenhar papéis importantes, como observado na figura a via da Rho GTPase e receptores Trk (Fonte: Pape, H. C. e D. Pare, 2010) [59].

Uma primeira indicação da relação entre plasticidade sináptica e estresse vem da observação de que as alterações comportamentais induzidas pelo estresse são frequentemente acompanhadas por alterações da transmissão excitatória neuronal. Especificamente, em animais adultos foi observado que as mudanças induzidas pela exposição

repetida ao estresse causam deficiências nos mecanismos de plasticidade [51]. Tanto no hipocampo quanto no PFC, o estresse está associado a prejuízos na indução ou manutenção da LTP. No hipocampo, o estresse crônico é capaz de inibir a LTP, produzindo atrofia dendrítica e prejudicando a formação de novas conexões sinápticas [60-63]. Também foi observado que a administração de glicocorticoides atenua a LTP, reproduzindo dessa forma os efeitos que o estresse provoca na plasticidade e sugerindo mecanismos dependentes de corticosteroides [63].

Ainda, no que se refere ao PFC, o PL parece ser particularmente influenciado pela exposição ao estresse. O estresse agudo potencializa as correntes sinápticas excitatórias dos receptores glutamatérgicos AMPA e NMDA no PL, e facilita os comportamentos que são mediados pelo PL [64]. No entanto, o estresse crônico diminui a densidade de espinhos dendríticos do PL, afetando negativamente a transmissão sináptica nessa área [45, 62, 65, 66], sugerindo um efeito temporal da resposta ao estresse sobre a plasticidade sináptica. O estresse crônico também modifica a morfologia dendrítica da subpopulação de neurônios do PL que inibem a resposta ao estresse estimulando os neurônios GABAérgicos (neurônios que liberam GABA) do NAST [67]. Nessa subpopulação de células, o estresse crônico causa uma substituição dos espinhos dendríticos do tipo *mushroom* por espinhos de tamanho menor, resultando numa redução de volume e superfície da árvore dendrítica [67]. Contudo, não foram observadas modificações nos espinhos dendríticos do IL após exposição a estresse agudo ou crônico [64], indicando que a modulação da resposta ao estresse acontece através do PL, ou que o estresse cause um impacto mais significativo no PL comparado ao IL.

Alguns trabalhos chegaram a conclusões divergentes sobre esse tema, provavelmente por terem utilizado protocolos estressores diferentes e/ou por terem focado em sub-regiões diferentes do PFC. Um trabalho mostrou que o estresse repetido de contenção em um cilindro (2h/dia durante 5 dias) em ratos no PND15 reduziu a transmissão sináptica do PFC mediada por AMPA e NMDA [68]. O mesmo protocolo também prejudicou significativamente a memória de reconhecimento, um processo cognitivo controlado pelo PFC [68]. Mas outro estudo relatou que a Separação Materna (MS) (3h/dia durante PND3-21) induziu aumento da ramificação dendrítica, do comprimento e da densidade de espinhos na região 3 do cíngulo anterior (Cg3) dos animais infantis, testados no PND22 [69]. Ratos que passaram por MS (1h/dia durante PND5-7 ou durante PND14-16) mostraram um aumento no comprimento

dendrítico em neurônios do córtex do cíngulo anterior, enquanto uma diminuição desse comprimento foi observada em ratos separados durante o PND1-3 [70]. Por fim, ainda outro trabalho demonstrou que a MS (2h/dia durante PND1-12) diminui o comprimento das árvores dendríticas dos neurônios da região 1 do cíngulo anterior (Cg1) e do PL [71]. Esse último achado é de particular relevância para a resposta ao estresse, considerando que os neurônios do PL desempenham um papel importante na inibição do eixo HPA [45]. Esses achados significam que a perda dos espinhos dendríticos no PL, como consequência da exposição ao estresse crônico no período pós-natal, poderia prejudicar o papel do PL de inibir a resposta periférica ao estresse ao longo da vida, gerando situações de má adaptação frente a adversidades.

Assim, embora esteja estabelecido que o estresse durante o período perinatal afeta a função do sistema nervoso central, apenas recentemente foi observado que as sinapses do PFC são afetadas, por serem sensíveis a uma vasta gama de estímulos, incluindo os estressores [35]. As primeiras experiências da vida definem as conexões sinápticas do PFC com outras áreas cerebrais, conexões estas que irão impactar sobre a regulação e modulação do comportamento na fase adulta, e o estresse pode interferir diretamente nesse processo.

1.4 Modulação Serotonérgica na Resposta ao Estresse

As transmissões sinápticas que ocorrem nas áreas límbicas e corticais são constantemente moduladas pelas projeções difusas ascendentes que derivam dos sistemas monoaminérgicos, os quais regulam a atividade cerebral de acordo com estímulos sensoriais internos e externos, modulando a resposta ao estresse, vigília, alerta, humor, agressividade e motivação [72-74]. Nesse contexto, a serotonina (5-HT) é considerada um dos moduladores mais importantes da plasticidade sináptica nas áreas corticais e límbicas envolvidas em funções cognitivas, emocionais e afetivas [75-78].

Os corpos celulares dos neurônios serotonérgicos se situam nos núcleos do rafe no tronco encefálico, enquanto os receptores serotonérgicos são encontrados em todo o sistema nervoso. Receptores para 5-HT são subdivididos em 7 famílias, com subtipos totalizando pelo menos 13 receptores com características estruturais e operacionais diferentes [79, 80] (**Figura 3**). Dentre eles, os mais estudados são os receptores de classe 1 e 2, principalmente devido ao

seu importante papel na regulação do humor e de áreas do sistema límbico, sendo postulados como os principais agentes responsáveis pela ação antidepressiva de várias drogas, como os inibidores seletivos da recaptura de serotonina, considerando que são expressos em áreas cerebrais importantes na regulação do estresse e do humor, tanto em humanos quanto em roedores [81, 82].

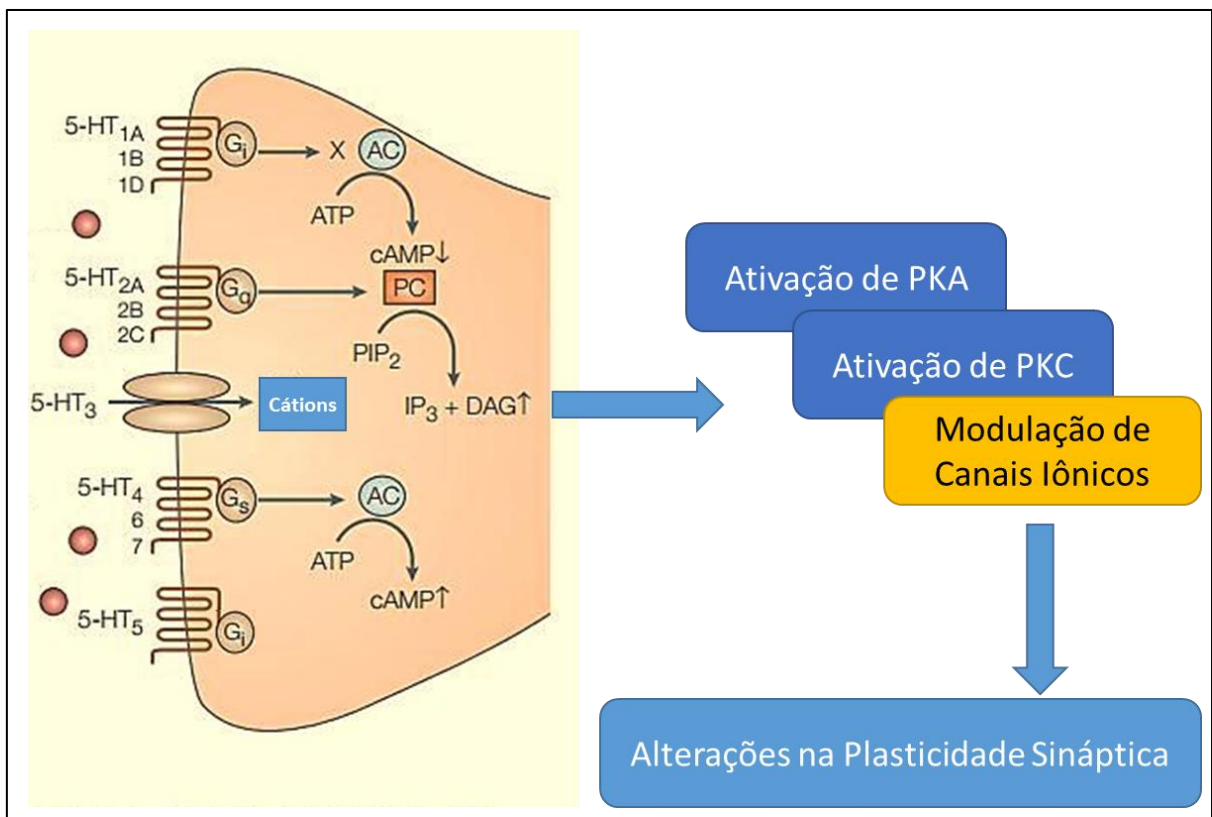


Figura 3. Vias de sinalização intracelular pelos receptores serotoninérgicos. A 5-HT pode sinalizar não apenas por vias associadas à proteína G, como também por ação direta em receptores ionotrópicos (5HT₃), que permitem influxo de Na⁺ e Ca²⁺ nos neurônios, podendo promover sinalização por cálcio e/ou despolarização do neurônio. A ação da 5-HT pode levar a ativação de proteínas quinase, como a PKA e a PKC, desencadeando eventos moleculares relacionados à plasticidade sináptica. Um exemplo é a modulação de canais iônicos pela fosforilação via PKA ou PKC, alterando os potenciais elétricos de membrana. (Adaptado de David T. Wong, Kenneth W. Perry & Frank P. Bymaster, 2005) [83].

1.4.1 Envolvimento da Serotonina na Função do PFC

Existem amplas evidências relatando um envolvimento da atividade serotoninérgica no PFC durante as respostas ao estresse [84-95]. Animais estressados mostram uma diminuição de transportadores envolvidos na recaptura da 5-HT do espaço sináptico [96], indicando possíveis alterações no tônus serotoninérgico basal, e um aumento do *turnover* de 5-HT no PFC [97-100]. Receptores do tipo 5HT_{1A} e 5HT_{2A/2C} são correlacionados a alterações vistas na

circuitaria que conecta o PFC à amígdala, no que se refere à resposta neural ao estresse [101]. Alterações da neurotransmissão serotoninérgica implicadas na patogênese de transtornos neuropsiquiátricos estão associadas à disfunção do PFC [102-104], e o impacto do estresse sobre o comportamento depende de um polimorfismo no gene do transportador de serotonina (SERT) [105].

A exposição ao estresse na fase pós-natal poderia envolver o sistema serotoninérgico na modulação da formação das conexões sinápticas primordiais do PFC. Foi visto que a atividade de SERT é fundamental para a expressão do fator neurotrófico derivado do cérebro (BDNF) ao longo do desenvolvimento pós-natal, o qual é liberado pelos neurônios em resposta à atividade neuronal durante os processos de potenciação das conexões sinápticas [106]. Reduzindo os níveis de BDNF no PFC durante o período pós-natal, o estresse afeta negativamente a possibilidade de LTP [73], o que pode eventualmente levar à problemas no desenvolvimento do PFC e à maior predisposição aos transtornos do humor. A supressão genética do SERT reduz os níveis de BDNF no PFC no início do desenvolvimento, diminuindo a plasticidade progressivamente nas primeiras duas semanas de vida [107]. A MS também provoca uma redução dos níveis de BDNF no PFC, e esses efeitos podem ser reproduzidos por meio da deleção genética do SERT [108]. Interessantemente, a redução de BDNF foi observada unicamente no mPFC, na região que compreende o IL e o PL, sugerindo que esses efeitos envolvem alterações na resposta neural ao estresse reguladas especificamente pelo mPFC.

Há evidências que mostram que o estresse crônico causado pela MS perturba a atividade serotoninérgica no PFC agindo sobre a expressão de $5HT_{1A}$ e $5HT_{2C}$ [26, 109]. Um estudo relatou que a MS diminui os níveis de 5-HT e a expressão dos receptores $5HT_{1A}$ e $5HT_{2C}$ no PFC durante a segunda semana pós-natal, e essas alterações retornaram a níveis normais após o fim do período de separação [26]. Portanto, devido a divergência entre os resultados existentes na literatura, é claro que a 5-HT está implicada na regulação da resposta ao estresse possivelmente através de alterações na plasticidade sináptica, porém não se sabe exatamente como e onde essas alterações acontecem, para que seja formulada uma teoria que explique os dados já obtidos a respeito da modulação serotoninérgica da resposta ao estresse.

1.4.2 Mecanismos de Modulação Serotonérgica da Plasticidade Sináptica

A 5-HT é capaz de modular várias vias de sinalização relacionadas à plasticidade sináptica, dependendo do tipo de receptor presente no neurônio: receptores do tipo 3 são ionotrópicos, permitindo a entrada de Na^+ e Ca^{+2} na célula, levando a ativação da CaMKII; os do tipo 1 são acoplados a proteína $G_{\alpha i}$, consequentemente reduzindo a atividade da PKA; os do tipo 2 sinalizam via $G_{\alpha q}$, levando a ativação da PKC; e os do tipo 4, 6 e 7 sinalizam via $G_{\alpha s}$ [76] (**Figura 3**). Dessa forma, a serotonina pode orquestrar a reorganização cortical através da modulação seletiva de potenciação e/ou depressão sináptica em ambas sinapses excitatórias e inibitórias.

Por exemplo, a sinalização serotonérgica modula as vias intracelulares envolvidas na funcionalidade do receptor AMPA, e na sua colocação na membrana pós-sináptica [76, 110, 111]. Foi observado que um antagonista de 5HT_{1A} aumenta a atividade da CaMKII, neutralizando os efeitos negativos que os bloqueadores de receptores AMPA exercem sobre os testes de memória que envolvem o hipocampo [112], sendo que a CaMKII estimula a inserção de receptores AMPA na membrana pós-sináptica, processo esse necessário para a consolidação da memória no hipocampo e que pode ser reforçado pelo bloqueio dos receptores 5HT_{1A} [66, 113, 114]. No hipocampo e no PFC, a 5-HT favorece a LTP [76, 115], e a facilitação da LTP em resposta à ativação do sistema serotonérgico é importante para o processamento de informações cognitivas e emocionais [79, 116-121]. No entanto, apesar de se conhecer os mecanismos moleculares que conectam as possíveis ações da 5-HT em seus receptores com os eventos que ocorrem durante a plasticidade sináptica, a função da 5-HT em áreas corticais ainda permanece elusiva. Ainda há poucos estudos da modulação da plasticidade sináptica pela 5-HT no PFC, mas um estudo eletrofisiológico demonstrou que os receptores 5HT_{1A} são capazes de modificar a orientação bidirecionalmente (ou seja, para LTP ou LTD) da plasticidade sináptica em neurônios piramidais da camada V do PFC de camundongos [122].

Em grande parte, a lacuna que se encontra na literatura a respeito desse tema se deve a complexidade do sistema, que além de apresentar uma gama enorme de sinalizações intracelulares diferentes, ainda apresenta localização seletiva de receptores em redes de interneurônios GABAérgicos. No PFC, neurônios piramidais expressam ambos 5HT_{2A} e 5HT_{1A}

(os quais possuem efeitos opostos sobre a plasticidade, de acordo com suas sinalizações intracelulares), enquanto que interneurônios expressam esses mesmos receptores e também 5HT₃, de forma que se torna difícil estabelecer o papel da 5-HT nessa rede [40]. Para se somar ainda mais à complexidade desse tópico, os receptores 5HT_{1A} também podem estar localizados em regiões diferentes do neurônio, de forma a regular não só a excitabilidade neuronal, mas também a liberação de neurotransmissores em sinapses específicas [123]. Em conjunto, levando em consideração as evidências existentes, se tem propagado a ideia de que existe uma sincronização da circuitaria do PFC com outras áreas límbicas, como o hipocampo e amígdala, de forma que a 5-HT seria capaz de modular os ritmos de sincronização nessas áreas e adaptar a resposta ao estresse do organismo. Alterações na sincronização da circuitaria do PFC com o hipocampo já foram vistas em condições patológicas em humanos e animais [41].

Sendo o sistema serotoninérgico fortemente influenciado pelo estresse, ele poderia ser o mecanismo principal através do qual o estresse pós-natal torna-se responsável por seus efeitos deletérios sobre o desenvolvimento emocional. Porém, outros neuromoduladores também devem desempenhar funções na resposta ao estresse, visto que há expressão de receptores dopaminérgicos e noradrenérgicos no PFC [74, 124].

1.5 Serotonina e TREK-1 na Resposta ao Estresse

Alguns estudos têm correlacionado as ações da 5-HT no sistema nervoso central com uma possível modulação de determinados canais de potássio presentes nessas regiões, sendo que os canais de potássio do tipo *Twik related 1* (TREK-1) tem chamado a atenção desde a descrição de fenótipo resiliente à depressão em camundongos nocautes para TREK-1 [125]. Os canais de potássio de mamíferos podem ser divididos em três famílias: sensíveis a voltagem (K_v), retificadores de corrente (K_{ir}) e canais com dois domínios formadores do poro (K_{2p}). Os canais TREK-1 pertencem à família K_{2p} e são particularmente expressos no tecido nervoso de roedores [126] e humanos [127], produzindo uma corrente *outward* (i.e., para fora da célula). Esses canais podem ser modulados por uma variedade de estímulos e mediadores, como neurotransmissores, temperatura, estímulos mecânicos e pelo ácido araquidônico (**Figura 4**) [128-131]. A 5-HT é capaz de inibir o córtex entorrinal através da ativação de TWIK-1, que

também é um canal pertencente à família K_{2P} [132], e bloqueadores de TREK-1 aumentam o *firing rate* nos núcleos dorsais da rafe (que são responsáveis pela produção de 5-HT e se projetam para várias regiões cerebrais), sugerindo que esses canais regulam o tônus serotoninérgico. A expressão de PKA e BDNF no PFC e hipocampo também é reduzida pelo bloqueio de TREK-1, e esses efeitos podem ser modulados pela manipulação do receptor $5HT_{1A}$ [133], indicando uma interação entre esse receptor serotoninérgico e TREK-1. A fluoxetina pode reverter o aumento da expressão de TREK-1 no PFC induzido por estresse [134].

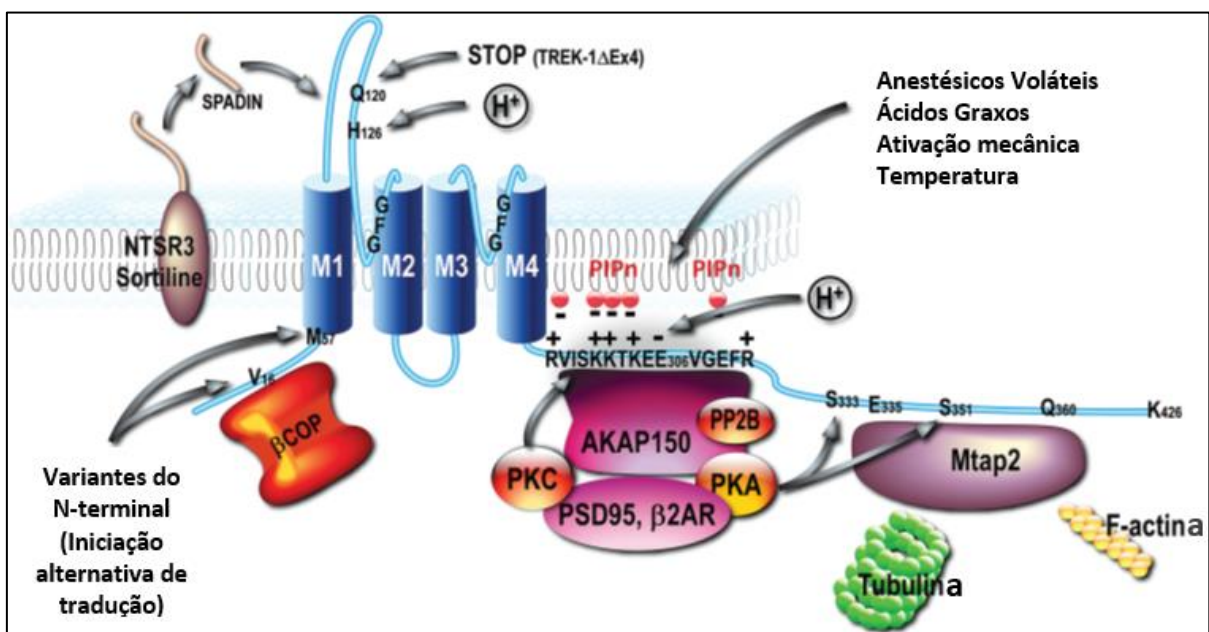


Figura 4. Modulação da função de TREK-1. Observa-se uma grande variedade de sítios passíveis de modulação por vários sinais intra e extracelulares diferentes na estrutura do canal TREK-1. Em particular, PKA e PKC podem fosforilar a porção carboxi-terminal intracelular do canal, o que favore o seu estado fechado, onde não há corrente de potássio fluindo pelo canal (Adaptado de: Noel, J., G. Sandoz e F. Lesage, 2011) [131].

Os canais TREK-1 desempenham importantes papéis fisiológicos em vários tecidos, particularmente no tecido muscular e nervoso, e estão envolvidos no processamento de estímulos sensoriais como dor e calor [128], além de desempenharem funções em astrócitos [135] e nos corticotropos da hipófise [136]. TREK-1 é expresso nos núcleos da rafe, estriado, hipocampo, amígdala, hipotálamo (PVN e arqueado) e regiões corticais [127]. Eles também são expressos na barreira hematoencefálica [137] e são implicados na fisiopatologia de várias doenças [138]. A modulação dos canais TREK-1 pode ocorrer por diversas vias de sinalização, incluindo a via da PKA e da PKC [129, 131], as quais estão implicadas na plasticidade sináptica

[139, 140] bem como na relação entre a adaptação cognitiva ao estresse com a plasticidade sináptica e psicopatologias [141].

Em relação à plasticidade sináptica, TREK-1 desempenha um papel importante na manutenção do potencial de membrana, regulando a excitabilidade neuronal e permitindo a plasticidade sináptica [142, 143]. Como os canais TREK-1 controlam diretamente o estado de despolarização da membrana (através do controle do efluxo de K^+), é muito provável que eles desempenhem um papel chave nas alterações sinápticas necessárias para a plasticidade e outros eventos neurofisiológicos relacionados às consequências emocionais e cognitivas do estresse. Adicionalmente, as diversas vias de sinalização intracelular que afetam a função de TREK-1 estão também envolvidas com a ação de neurotransmissores, como as monoaminas, na adaptação cognitiva ao estresse [141]. Sabe-se por exemplo que a PKA é capaz de fosforilar e inibir a função de TREK-1 [144], de onde se pode deduzir que receptores $5HT_{1A}$ poderiam levar ao aumento da probabilidade de abertura desses canais através da inibição da PKA.

Evidências recentes têm sugerido que os canais TREK-1 estão relacionados à fisiopatologia da depressão. Animais nocaute para TREK-1 apresentam fenótipo resiliente à depressão [6, 125], e a ação de antidepressivos largamente utilizados, como a fluoxetina, é dependente da função de TREK-1 [145-147]. Alguns estudos apresentam evidências de que os efeitos terapêuticos de antidepressivos podem ser dependentes do antagonismo de TREK-1 [145-147], sendo que alguns autores inclusive sugerem que o mecanismo de ação antidepressivo da fluoxetina ocorra pela inibição de TREK-1 que essa droga promove, mais do que pelo aumento de 5-HT na fenda sináptica [145, 148]. Além disso, alguns estudos demonstraram relação entre isoformas de TREK-1 e SERT na resposta terapêutica à antidepressivos em humanos [149]. Assim, considerando que a neurogênese e a plasticidade sináptica são processos responsáveis pela reversão de quadros de depressão e ansiedade, TREK-1 se tornou um alvo terapêutico para o desenvolvimento de novos fármacos para o tratamento da depressão [148, 150, 151].

O PFC e o hipocampo são as regiões cerebrais que apresentam maior sensibilidade ao estresse [152], mesmo durante a fase juvenil e adolescência [153, 154], e TREK-1 parece estar envolvido na sinalização do receptor $GABA_B$ no hipocampo [155]. A amígdala também apresenta plasticidade sináptica e é uma das áreas mais envolvidas na resposta ao estresse, porém suas ações estão mais ligadas à efetivação fisiológica da resposta ao estresse, assim

como o hipotálamo através do PVN e sua conexão com o eixo HPA, ao passo que o PFC e o hipocampo apresentam função na contextualização e controle cognitivo do estresse [1, 4, 5, 8]. Evidências na literatura indicam efeitos sinérgicos entre TREK-1 e $5HT_{1A}$ no efeito antidepressivo de drogas que atuam sobre os mesmos [133], e variações genéticas desse canal em humanos foram relacionadas a resiliência à depressão [149]. Ainda, TREK-1 também parece ser mais expresso em interneurônios, o que adiciona uma camada adicional de complexidade no mecanismo putativo de ação da 5-HT sobre a excitabilidade neuronal [127]. As regiões envolvidas na circuitaria de estresse também expressam receptores serotoninérgicos, e se configuram numa rede complexa que apresenta potencial de modulação em vários pontos, via TREK-1 e/ou 5-HT [156, 157] (**Figura 5**).

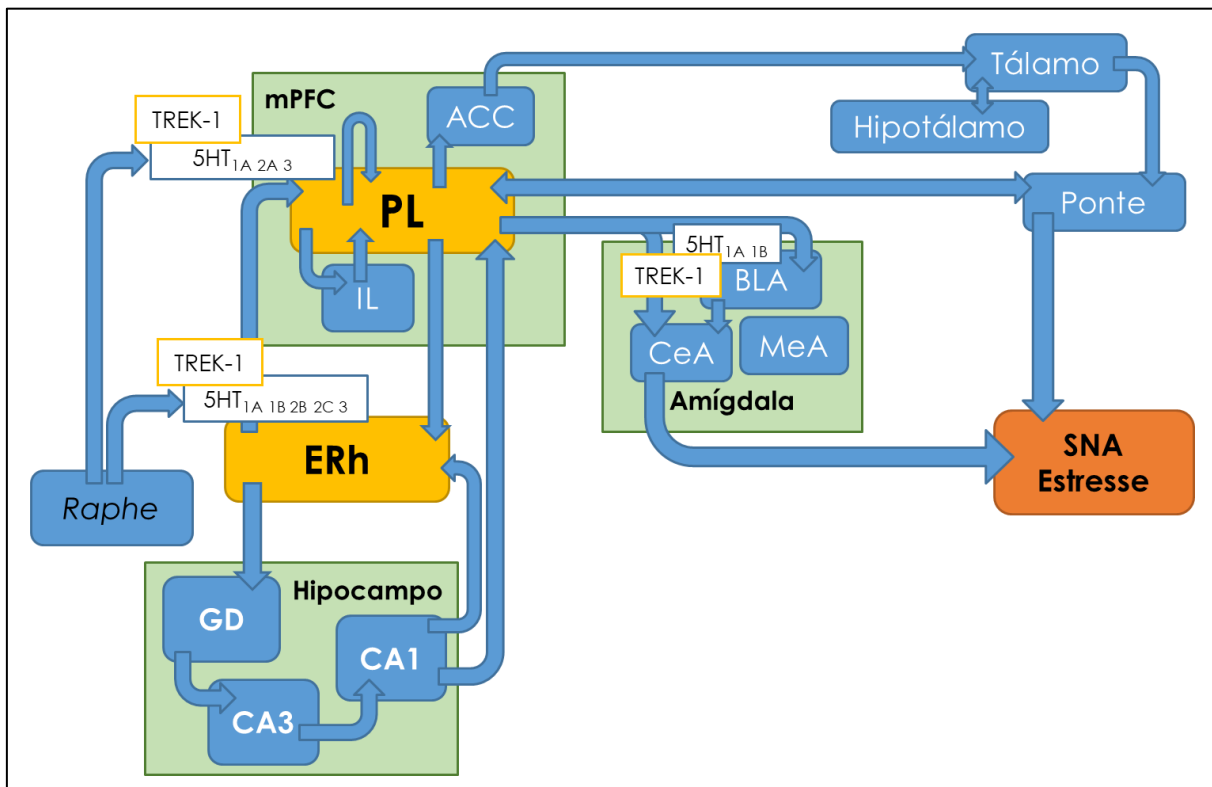


Figura 5. Circuitaria neural para a resposta ao estresse, e a expressão de TREK-1 e receptores serotoninérgicos. Receptores $5HT_{1A}$ são expressões em regiões chave da circuitaria de estresse, e nas mesmas áreas também se encontra a expressão de TREK-1, de forma que essas duas moléculas podem interagir na regulação das respostas ao estresse. Outros receptores serotoninérgicos, quando presentes, também estão indicados. CA3 = *cornu Ammon* 3 do hipocampo. CA1 = *cornu Ammon* 1 do hipocampo. SNA = Sistema Nervoso Autônomo. ACC = córtex cingulado anterior. Raphe = núcleos da rafe no tronco encefálico.

1.6 Dimorfismo Sexual na Resposta ao Estresse

Fatores ambientais que atuam nas fases iniciais da vida podem produzir alterações de comportamento que persistem até a idade adulta [158], sendo que a indução de comportamentos relacionados à depressão é um dos efeitos mais importantes. A depressão é uma doença cuja prevalência vêm aumentando na população mundial e causando incapacitação para o trabalho [159], e estando associada ao estresse, a compreensão dos mecanismos pelos quais o estresse pode levar à depressão faz-se necessária [160-163]. Observa-se que as mulheres são quase duas vezes mais diagnosticadas com depressão [159], porém a maioria dos estudos com modelos animais têm empregado apenas animais machos. Portanto se desconhece os fatores que levam o sexo feminino a ser mais susceptível à depressão: se se trata de fatores neurobiológicos ligados ao sexo, ou se fatores sociais e econômicos são mais responsáveis por essa maior prevalência em mulheres [164].

Vários estudos já documentaram algumas diferenças dependentes de sexo em modelos animais utilizando protocolos de estresse. Fêmeas secretaram mais corticosterona frente ao estresse em um estudo utilizando ratos [165], e em roedores, mesmo os níveis basais de corticosterona são mais elevados em fêmeas quando comparadas aos machos [166]. As áreas envolvidas na circuitaria de estresse, como o PFC e hipocampo, apresentam diferenças estruturais e funcionais na idade adulta entre os sexos [167]. Outro estudo, utilizando estresse controlável e inescapável, concluiu que no caso do estresse controlável as fêmeas apresentaram menor controle *top-down* do PL sobre o tônus serotoninérgico [168].

Em conjunto, essas evidências indicam que há importantes aspectos relacionados à diferenças entre os sexos na resposta ao estresse que precisam ser melhor investigadas, ainda mais considerando as interações entre sexo, idade e outros parâmetros fisiológicos [169].

2 OBJETIVOS E HIPÓTESE

A hipótese central desse trabalho afirma que o estresse pós-natal, causado pela separação materna, irá modular a quantidade e/ou função de TREK-1 e receptores $5HT_{1A}$ nas áreas cerebrais envolvidas na circuitaria de estresse, conseqüentemente alterando a plasticidade sináptica e levando ao desenvolvimento de comportamento depressivo-símile nos animais. Espera-se encontrar correção nas alterações de TREK-1 e $5HT_{1A}$ nas mesmas áreas cerebrais em animais com comportamento depressivo-símile. A hipótese central é apresentada na **Figura 6**.

O trabalho foi executado seguindo-se este fluxo:

1. Verificar se há diferenças entre os sexos na resposta ao estresse, conforme avaliada por testes de comportamento e por biologia molecular nas áreas cerebrais relevantes;
2. Realizar um estudo eletrofisiológico para avaliar se há modulação da plasticidade sináptica via TREK-1 e $5HT_{1A}$ no córtex pré-límbico, por ser uma área envolvida em vários circuitos relacionados ao estresse e comportamento;
3. Testar a possibilidade das ações do $5HT_{1A}$ ocorrerem por um mecanismo dependente de TREK-1, em neurônios piramidais do córtex pré-límbico.

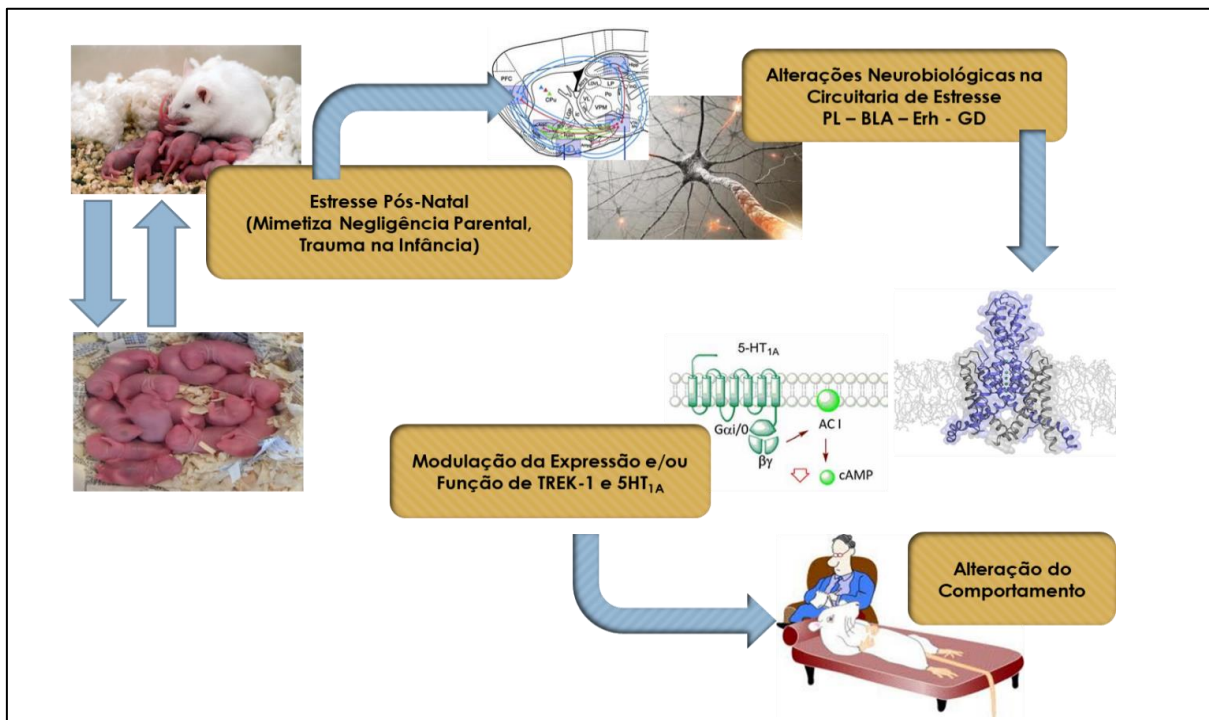


Figura 6. Hipótese Central utilizada nessa Tese.

3 METODOLOGIA

Neste trabalho, foi utilizado o modelo de MS. Este modelo foi selecionado para este estudo por apresentar validade de construto, além de simular situações humanas onde ocorre separação materna. Animais submetidos a este protocolo apresentam déficits comportamentais, diminuição nos níveis de BDNF no hipocampo e resposta alterada ao estresse agudo [170]. Além disso, o tratamento com antidepressivos como a amitriptilina pode reverter os efeitos provocados pela MS [171], conferindo a este modelo também validade preditiva, para um modelo animal de depressão. Serão utilizados ratos, considerando que camundongos são mais resistentes ao estresse neonatal e ratos apresentam respostas menos divergentes nesse modelo [28, 172].

Os animais utilizados nesse estudo foram ratos Wistar, provenientes do Biotério de Produção de Ratos do ICB-USP, onde são produzidos animais SPF (*Specific-Pathogen-Free*). Porém, os animais eram entregues com aproximadamente 60 dias de vida e foram hospedados no biotério local do departamento de Fisiologia e Biofísica, que não possui condições SPF, de forma que todos os ratos utilizados nesse estudo não podem ser considerados SPF. Todas as manipulações e protocolos empregados nesse trabalho se encontram aprovadas pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) do ICB, sob o protocolo 54/2016. A eutanásia dos animais foi sempre realizada por decapitação sob anestesia, quando não indicado de outra forma.

3.1 Acasalamento e Acompanhamento dos Filhotes

Ao serem recebidos, os animais eram mantidos em biotério em condições padrão ($23^{\circ}\text{C}\pm 2^{\circ}\text{C}$, água e alimento *ad libitum*, ciclo claro-escuro de 12h, luzes ligadas às 0600h, gaiolas com dimensões de 40x33x17cm, máximo de 4 animais por gaiola, iluminação de aproximadamente 200lux). Após período de habituação de no mínimo duas semanas no biotério local do departamento de Fisiologia e Biofísica, os animais eram colocados para acasalar por 10 dias, sendo um macho colocado na mesma gaiola com duas fêmeas nulíparas. Após o período de acasalamento, os machos eram removidos e as fêmeas isoladas em gaiolas identificadas. A data de nascimento prevista era considerada 21 dias após o primeiro dia de

acasalamento, e a partir dessa data as ratas prenhas eram acompanhadas diariamente para verificação dos nascimentos. Após a utilização para o acasalamento os machos utilizados eram eutanasiados.

O dia em que os filhotes nasciam é considerado o dia pós-natal (PND) 0, e nesse dia as ninhadas eram alocadas como grupo controle (CON) ou para o grupo que passaria pelo protocolo de separação materna (MS). Normalmente, quando se trabalha com animais durante o período perinatal, se realiza um acompanhamento do peso e crescimento dos filhotes como parâmetro de toxicidade. Se a manipulação experimental causa toxicidade ao desenvolvimento dos filhotes, isso pode se refletir em prejuízo e/ou alteração do ganho de peso dos animais. Portanto, nesse estudo foi realizado um acompanhamento semanal do peso dos filhotes, sendo a ninhada pesada como um todo e o peso dividido pelo número de filhotes na ninhada. As ninhadas eram pesadas semanalmente, no PND0, PND7, PND14 e PND21.

No PND4, as ninhadas eram reduzidas a 8 filhotes por ninhada, mantendo números iguais de machos e fêmeas em cada ninhada sempre que possível. A sexagem foi conduzida seguindo o critério da distância anogenital (definida como a distância entre o ânus e a genitália externa), que é pequena nas fêmeas e grande nos machos. Critérios de descarte foram ninhadas em que nasciam menos que 8 filhotes, e impossibilidade de manter números iguais de machos e fêmeas nas ninhadas. No PND21 o desmame era realizado, sendo as ratas mães eutanasiadas e os filhotes divididos em caixas por sexo.

3.2 Separação Materna

O protocolo empregado foi adaptado de Lippmann, 2007 [170]. A partir do PND2, diariamente as ratas mães foram separadas dos filhotes por 3h/dia, até o PND14, completando ao todo 13 dias de Separação Materna. A separação ocorria sempre no período da tarde, das 1300 às 1600h. As ratas mães eram colocadas em caixas separadas dos filhotes, sendo sempre a mesma caixa para todos os dias de separação, na mesma sala em que os filhotes estavam alocados, mas em estantes diferentes. Ao final do período de 3h, as ratas mães eram retornadas para suas gaiolas originais, junto de suas respectivas ninhadas. Do PND15 até o PND21 (dia do desmame) os animais não eram perturbados, com exceção da

limpeza das caixas que ocorria duas vezes por semana e dos dias semanais de pesagem como descrito na **seção 3.1**.

O grupo CON desse estudo consistiu em ninhadas AFR (*Animal Facility Rearing*), ou seja, ninhadas que foram manipuladas apenas nos dias de limpeza no biotério, e nos dias em que era efetuada a pesagem dos animais. Os filhotes foram utilizados para os testes experimentais na idade infante, definida nesse trabalho como PND25±1.

3.3 Desenho Experimental

Na ocasião do desmame foram formadas as sequencias experimentais, de forma que não mais que 2 filhotes do mesmo sexo e da mesma ninhada fossem utilizados para o mesmo experimento, minimizando possíveis efeitos de ninhada nos resultados obtidos e reduzindo o número de animais a ser utilizado no estudo. Nenhum animal foi utilizado em mais que um teste experimental, de forma a manter grupos independentes para a análise estatística. A **Figura 7** ilustra o desenho experimental geral empregado nesse estudo.

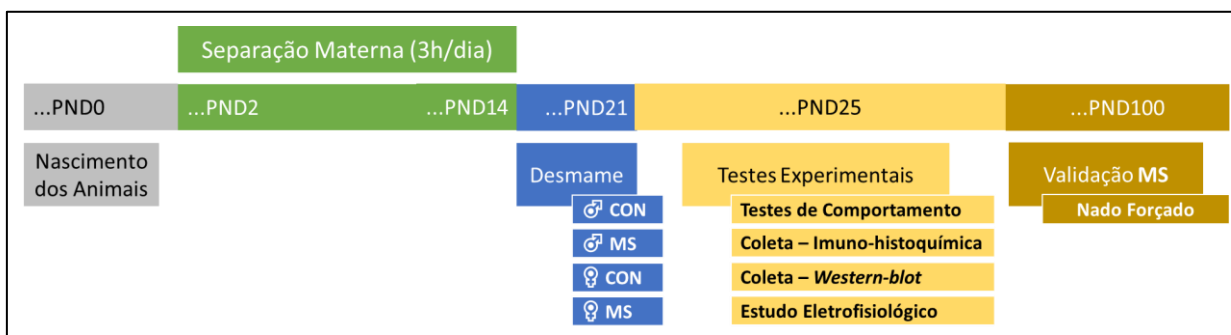


Figura 7. Desenho Experimental. CON = grupo controle, e MS = grupo de Separação Materna. Os testes de comportamento e os experimentos específicos realizados no estudo eletrofisiológico se encontram descritos na seção de Metodologia.

3.4 Testes de Comportamento

Aqui estão descritos todos os métodos empregados na análise comportamental envolvida nesse estudo.

3.4.1 Nado Forçado

Para validação do protocolo de MS empregado nesse estudo, considerando que o modelo seria implementado pela primeira vez no laboratório, foi realizado o teste de nado forçado (FST), nos filhotes provenientes do protocolo de MS em idade *adulta* (PND90-110). O FST é um teste clássico para avaliação de comportamentos relacionados a depressão, e pretende avaliar um comportamento descrito como *desespero comportamental*, o qual é sensível a administração de antidepressivos, tornando o FST um teste com validade preditiva para depressão [173]. Um FST também foi realizado nos filhotes em idade infante (PND25±1).

A execução do FST consistiu em uma sessão de 15min de nado forçado (denominada sessão pré-teste), em um tanque cilíndrico com água aquecida a $25\pm 2^{\circ}\text{C}$, dimensões de 80cm de altura e 20cm de diâmetro, com altura do nível de água de 60cm, de forma que o rato não fosse capaz de ancorar a cauda no fundo do tanque. Após os 15min, os ratos foram removidos do tanque e secos manualmente com o auxílio de uma toalha, e o tanque foi lavado com detergente entre sessões, com a substituição da água, para que não ocorresse influência de odores nos animais que fossem testados nas sessões subsequentes. No dia seguinte, os ratos foram submetidos a uma nova sessão de 5min de nado forçado (sessão teste), nas mesmas condições já descritas, com as sessões sendo registradas em câmera de vídeo, orientada para o lado do tanque cilíndrico. Todas as sessões de pré-teste e teste foram realizadas no período das 1300h às 1600h, sempre no mesmo ambiente (sala separada do laboratório), sem período de habituação. Para os animais infantes, o FST seguiu esse mesmo protocolo, porém com um tanque cilíndrico com 15cm de diâmetro.

O parâmetro de análise consistiu no tempo de imobilidade do animal durante a sessão teste de nado forçado. Foi feita uma distinção entre estados de comportamento *ativo* e *passivo* do animal nesse teste, ou seja, quando o rato estava ativamente nadando ou não, e o animal foi considerado imóvel quando duas ou mais patas estavam imóveis no estado passivo. O estado passivo é caracterizado pela presença de movimentos mínimos necessários apenas para manter a cabeça do animal acima do nível da água.

3.4.2 Hipofagia Induzida pela Novidade

O teste de hipofagia induzida pela novidade (HIN) é utilizado para a avaliação de ansiedade e depressão, além de outros comportamentos como impulsividade e tomada de decisão. O protocolo utilizado nesse estudo foi uma adaptação do protocolo de Bodnoff et.al. (1989) [174], onde os animais são colocados em jejum alimentar sem restrição hídrica por 24h, e após esse período são testados em um campo aberto no qual uma porção de alimento (ração) é colocada no centro do campo. O tempo que o animal leva para se alimentar é mensurado e utilizado como parâmetro de avaliação. Aqui, o teste foi realizado em uma sala com intensidade luminosa baixa (± 10 lux), em um aparato com 58cm de diâmetro circundado por uma parede de acrílico transparente de 52cm de altura, e os animais foram habituados em uma sala adjacente a sala do teste por 1h antes da realização do teste. O teste foi conduzido no período diurno, das 0700h às 1100h, e o parâmetro utilizado para mensuração da latência foi a primeira mordida no *pellet* de ração colocado na arena. Os animais foram testados no PND25 \pm 1.

É um teste de simples execução, mas de interpretação complexa, considerando que múltiplos aspectos comportamentais estarão envolvidos no resultado obtido nesse teste. Nesse estudo, esse teste foi selecionado com o propósito específico de avaliar o comportamento de tomada de decisão dos animais, e adicionalmente fornecer indícios a respeito de possíveis alterações na impulsividade. Existem testes comportamentais mais específicos para a análise de impulsividade, porém o HIN pode fornecer pistas sobre alterações na impulsividade induzidas por uma determinada manipulação, nesse caso a MS. Ainda, esse teste foi classicamente desenvolvido para a análise de ansiedade, e, no entanto, ele também é sensível a antidepressivos [175, 176], razão pela qual o mesmo foi incluído nesse estudo.

Um fator complicador nesse teste é a possibilidade de a manipulação realizada no animal induzir alterações do comportamento alimentar, levando à resultados enviesados, visto que o paradigma proposto no teste envolve a fome como um componente de motivação. Portanto, é necessário realizar um controle para esse experimento, que consiste em avaliar a quantidade de ração que os animais dos grupos experimentais a serem comparados consomem em suas gaiolas de origem. Alternativamente também pode ser avaliada a latência

para se alimentar, após o jejum, na gaiola de origem, quando ração *ad libitum* é oferecida ao animal novamente (logo após o teste de HIN). Nesse estudo, foi feita uma análise do consumo de ração na gaiola de origem ao longo de 5 dias, mensurado por pesagem da ração antes e após o período de 5 dias, com os ratos mantidos isolados no biotério. Esse experimento permite uma avaliação mais precisa do comportamento alimentar dos animais, evitando a inserção de viés na interpretação dos resultados do HIN.

3.4.3 Preferência pela Sacarose

Este é um teste idealizado para avaliação do comportamento de anedonia, o qual é um dos sintomas principais da depressão, e está envolvido com o sistema de recompensa. O teste de preferência pela sacarose (SPT) se utiliza de uma característica etológica dos roedores: a natural preferência por soluções e alimentos de sabor adocicado.

O protocolo do SPT consiste em apresentar ao rato duas garrafas, uma contendo água e outra contendo solução de sacarose, por um determinado período de tempo, mensurando-se o consumo das duas soluções naquele período, sendo possível então calcular a preferência do animal pela solução de sacarose (daí o nome do teste). Esse teste foi executado com os animais no biotério onde os mesmos foram mantidos durante o período perinatal, porém os animais foram isolados para que o consumo das soluções fosse mensurado. Foi empregada solução de sacarose a 2%, e garrafas idênticas para água e solução de sacarose. O teste teve duração de 5 dias, dos quais apenas os três últimos foram analisados, pois os dois primeiros dias foram considerados período de habituação dos animais à nova situação ambiental (isolamento em nova gaiola e nova sala do biotério). Os animais foram testados do PND22 ao PND26, para que os dias de teste considerados para análise coincidisse com o PND25±1.

O consumo líquido das duas garrafas foi mensurado através do peso total de cada garrafa, o qual corresponde proporcionalmente ao volume ingerido. O cálculo da preferência pela sacarose foi feito através de um cálculo de porcentagem simples, onde o indicado nos resultados corresponde a porcentagem de *preferência pela solução de sacarose*. Assim, quanto menor a preferência pela sacarose, maior a anedonia daquele animal.

3.4.4 Campo Aberto

O teste de campo aberto (OF) foi aqui utilizado para avaliação de quatro parâmetros complementares à análise comportamental do estudo: locomoção, *rearing* (comportamento exploratório), *grooming* (comportamento de autocuidado) e ansiedade. Esse teste foi conduzido em uma sala com intensidade luminosa baixa (± 10 lux), em um aparato com 58cm de diâmetro circundado por uma parede de acrílico transparente de 52cm de altura (o mesmo aparato utilizado para o OF). O teste foi realizado em uma única sessão de 5min, no período diurno das 0700h às 1100h, e os animais passaram por período de habituação de 1h antes do teste na mesma sala. Os animais foram testados no PND25 \pm 1. As sessões foram registradas em vídeo para posterior análise manual.

Para a avaliação de comportamento ansiedade-símile, foi utilizado como parâmetro o tempo que o animal permaneceu na área central do campo aberto, sendo considerado o tempo de permanência a situação onde o rato se encontrava com mais de 50% do corpo posicionado na zona central da arena. Para a locomoção, foi quantificado o número de quadrantes que o animal atravessou (ou seja, cruzou com as quatro patas) na arena durante o período total de teste. O comportamento de *rearing* se refere a quando o rato se apóia nas patas traseiras e investiga o ambiente com o focinho apontado para cima, sendo quantificado o número de vezes que o animal executa esse comportamento. E por fim, o comportamento de *grooming* foi determinado pelo número de vezes que o animal executou autolimpeza, que pode ser observada quando o animal se curva sobre si mesmo efetuando pequenas mordidas (*nibbles*) e lambidas.

3.5 Imunoistoquímica

Animais infantis (PND25 \pm 1) foram mortos por perfusão transcardíaca com solução fisiológica tamponada (0,9% NaCl + Tampão Fosfato a 0,1M), seguida de perfusão com solução de paraformaldeído 2% resfriada a 1 \approx 4°C, também contendo Tampão Fosfato a 0,1M, e os cérebros foram coletados e pós-fixados na mesma solução de paraformaldeído por 4-6h. Após esses procedimentos, os cérebros foram armazenados em solução de sacarose a 30% em 1 \approx 4°C por 2-3 dias, e então cortados em micrótomo, gerando cortes coronais de 30 μ m. Os

cortes foram então lavados (3x de 5min em Tampão Fosfato 0,1M) e incubados por 20±2h, com os anticorpos primários. Para TREK-1, foi utilizado o anticorpo monoclonal sc-398449 (SantaCruz®), feito em camundongo tendo como epítipo a sequência de aminoácidos das posições 354-380 do carboxi-terminal de TREK-1 humano; e para 5HT_{1A}, foi utilizado o anticorpo policlonal ab85615 (abcam®), feito em coelho e tendo como epítipo um peptídeo sintético correspondente ao receptor 5HT_{1A} de ratos. Ambos os anticorpos foram empregados nas diluições de 1:500.

Na sequência, os cortes foram novamente lavados como descrito anteriormente, e então incubados com anticorpos secundários respectivos aos primários utilizados, por 2h. Após esse período, os cortes foram lavados e incubados em solução ABC (Kit Elite ABC®) por mais 2h. Todas as incubações foram realizadas em temperatura ambiente, em um aparato de agitação leve e contínua. Finalmente, os cortes foram mais uma vez lavados, incubados em solução de diaminobenzidina a 5% por 5min, e a reação enzimática para produção de coloração foi iniciada com a adição de H₂O₂ a 3%. Com o desenvolvimento da coloração adequada (usualmente dentro de 7-10min), a reação foi interrompida com a transferência dos cortes para Tampão Fosfato 0,1M. Os cortes foram lavados na sequência, da mesma forma descrita anteriormente.

Os cortes foram armazenados nesse mesmo tampão até a execução das etapas posteriores do protocolo, que consistiram na montagem dos cortes em lâminas gelatinizadas para posterior desidratação padrão em histologia (bateria progressiva de álcool e xilol). As lâminas foram analisadas em microscópio ótico comum. A análise foi feita com o auxílio de *software* (ImageJ 1.51k, NIH), onde foram ajustados os níveis de contraste e o *background* das imagens foi subtraído, e um *threshold* adequado (de acordo com contagem manual preliminar) foi definido. Também foram definidos parâmetros para a contagem, como área e esfericidade, para assegurar a contagem apenas de células com dimensões de neurônio (avaliadas de acordo com a contagem manual preliminar) e positivas para TREK-1 ou 5HT_{1A}. Nessa tese, os resultados da imunoistoquímica foram tratados como indicadores de quantidade (expressão) das proteínas investigadas, porém é importante ressaltar essa técnica, conforme realizada nesse trabalho, determina o número de células que apresentam a expressão de TREK-1 ou 5HT_{1A} a partir de um certo nível. Sendo assim, se um aumento de células positivas para TREK-1 é observado na imunoistoquímica, esse resultado pode indicar

um aumento do número de células que passaram a expressar o canal, de onde se infere que houve um aumento da expressão do canal.

3.6 Western-blot (SDS-PAGE)

Após eutanásia dos filhotes em PND25±1 por decapitação sob anestesia, imediatamente foram coletadas amostras frescas do cérebro e congeladas imediatamente em nitrogênio líquido. As áreas coletadas foram o PFC, o hipocampo e a amígdala. O PFC foi definido como a porção frontal do cérebro, excluindo-se o bulbo olfatório e efetuando o corte no início do estriado (\approx bregma +2,5mm). Após a coleta, as amostras foram mantidas congeladas em freezer a -70°C.

Todas as amostras foram extraídas em tampão RIPA (contendo deoxicolato de sódio, SDS e Triton-X como detergentes) por 5min em ultrasonicador, sendo subsequentemente centrifugadas a 15.000rpm por 15min, para coleta do sobrenadante. Alíquotas foram extraídas nessa etapa, para dosagem de proteínas pelo método de Bradford, utilizando-se o kit de dosagem da BioRad®. Após determinação da concentração de proteína das amostras, as mesmas foram misturadas a tampão desnaturante “Laemmli”, contendo SDS e ditioneitol (que tem a função de auxiliar na desnaturação das proteínas ao permitir a quebra de pontes dissulfeto), e foram aquecidas por 5min a 100°C para desnaturação completa das proteínas. As amostras foram carregadas em gel de poliacrilamida, montado em sistema da BioRad® (*mini-gel*), no modelo de gel descontínuo de Laemmli (SDS-PAGE), sendo carregado um volume de 30µL em cada poço, contendo 10µg de proteína por amostra. A concentração de proteína necessária foi determinada anteriormente por testes prévios de padronização da técnica para este trabalho. O primeiro poço sempre ficou reservado para o carregamento de uma amostra de padrão de peso molecular Kaleidoscope (BioRad®), para visualização do peso das bandas posteriormente.

A eletroforese foi executada mantendo-se voltagem constante em 80V, até a entrada das proteínas no *resolving gel*, e então a voltagem foi alterada para 120V e mantida constante por aproximadamente 2h. Os géis eram então transferidos por 35min a 15V para membranas de nitrocelulose (0,45nm de porosidade), e a qualidade da transferência era checada na sequência utilizando-se corante de Ponceau. As membranas foram lavadas 3-5x de 5min cada

em TBS-T (Tampão Salina-Tris com adição do detergente Tween-20), até a remoção de todo o corante, antes de serem incubadas por 2h para bloqueio em 5% de leite desnatado preparado em TBS (Tampão Salina-Tris).

Após o bloqueio e lavagens em TBS-T, as membranas foram incubadas por 48h com anticorpo primário para TREK-1 SantaCruz® (anticorpo monoclonal sc-398449, feito em camundongo tendo como epítipo a sequência de aminoácidos das posições 354-380 do carboxi-terminal de TREK-1 humano), ou incubadas por 24h com o anticorpo primário para 5HT_{1A} abcam® (anticorpo policlonal ab85615, feito em coelho e tendo como epítipo um peptídeo sintético correspondente ao receptor 5HT_{1A} de ratos). Os anticorpos primários foram os mesmos que os utilizados para a imunistoquímica. Ambos os anticorpos foram empregados nas diluições de 1:500. Na sequência, após lavagens em TBS-T as membranas foram incubadas com anticorpo secundário adequado para cada tipo de anticorpo (anti-*mouse* para TREK-1 e anti-*rabbit* para 5HT_{1A}) em diluição 1:10.000, junto com o anticorpo secundário do sistema Kaleidoscope da Biorad®. Após 2h de incubação, as membranas eram novamente lavadas em TBS-T, e então era acrescentado o reagente de luminol+substrato para revelação nas membranas, preparado de acordo com as instruções do fabricante (BioRad®). Após a revelação dos resultados, as membranas eram novamente lavadas 3-5x de 5min cada em TBS-T e reincubadas por 24h com anticorpo primário para GAPDH SantaCruz® (anticorpo monoclonal feito em *mouse*) em diluição 1:20.000, e na sequência eram incubadas com o anticorpo secundário adequado e depois reveladas, seguindo as mesmas etapas descritas anteriormente.

Logo após 5min de incubação em aparato protegido da luz, as membranas eram então lidas em aparelho próprio para leitura de sinal de quimiluminescência (Licor®), sendo as imagens capturadas para posterior análise no *software* ImageJ (ImageJ 1.51k, NIH). A densidade integrada das bandas foi analisada, e cada banda foi corrigida pela sua correspondente em GAPDH. Após essa correção, os valores foram normalizados pelo grupo $\bar{\mu}$ CON, para a análise estatística e confecção dos gráficos.

3.7 Estudo Eletrofisiológico em *brain slices*

Para avaliar a plasticidade sináptica, um estudo eletrofisiológico em *brain slices* foi realizado para esse trabalho. Todos os experimentos do estudo eletrofisiológico foram realizados em animais na idade PND25±1. Para reduzir o número de animais utilizados, os grupos foram formados com animais machos e fêmeas (é comum nos trabalhos com eletrofisiologia em *brain slices* a utilização de ambos os sexos para os experimentos), sendo as análises feitas para comparar situações experimentais diferentes e grupos CON e MS. O estudo foi conduzido no córtex pré-límbico, sendo registrados os neurônios piramidais da camada V.

3.7.1 Preparo de cortes de cérebro (*brain slices*)

Os cortes de cérebro foram preparados utilizando um vibrátomo (VT1200S Leyca®). Ao colocar a lâmina no vibrátomo, uma calibração era realizada utilizando-se o *vibracheck* (uma peça associada ao equipamento), que tem a função de corrigir vibrações excessivas da lâmina que podem prejudicar a viabilidade dos cortes. Após essa calibração (realizada toda vez que era necessário preparar cortes de cérebro), ratos em PND25±1 foram anestesiados com isoflurano e decapitados, e o cérebro foi removido e coletado em um recipiente contido em gelo com tampão de dissecação contendo (em mM): 206 sacarose, 25 NaHCO₃, 2,5 KCl, 10 MgCl₂, 1,45 NaH₂PO₄, 0,5 CaCl₂, e 11 D-glucose. Esse tampão era previamente oxigenado com carbogênio (5% CO₂-95%CO₂) por pelo menos 20min, e mantido refrigerado a 0-4°C. Um corte coronal ao meio do cérebro foi feito para permitir que a parte frontal do cérebro fosse colada em uma plataforma, que foi então colocada em um recipiente próprio do vibrátomo, mantendo o cérebro submerso no mesmo tampão de dissecação, com oxigenação constante.

Cortes de 300µm referentes a região do PL (bregma +3,0mm a +4,0mm) foram então obtidos no vibrátomo e transferidos para outro recipiente, contendo uma solução de aCSF (*artificial cerebrospinal fluid*) que continha (em mM): 126 NaCl, 26 NaHCO₃, 2,5 KCl, 1,45 NaH₂PO₄, 1 MgCl₂, 2 CaCl₂, e 9 D-glucose. Esse aCSF era mantido sob oxigenação constante, e os cortes eram mantidos por pelo menos 1h nesse recipiente antes do início dos experimentos. Os cortes obtidos dessa forma permaneciam viáveis para experimentação por

até 12h após a coleta. Para cada cérebro era possível obter até 8 cortes, sendo a coleta interrompida quando era possível visualizar o fim do PL no cérebro colado na plataforma. A **Figura 8** ilustra a região do PL utilizada nos experimentos.

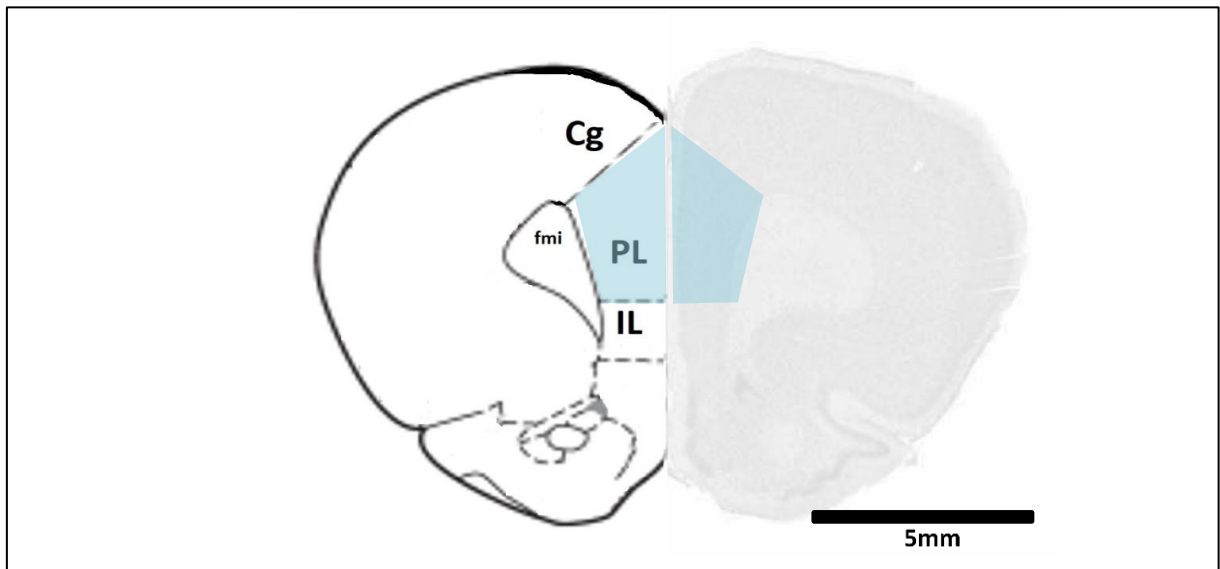


Figura 8. Ilustração da região do mPFC utilizada no estudo eletrofisiológico. Cg = córtex cingulado. PL = córtex pré-límbico. IL = córtex infralímbico. fmi = *fórcex minor*. Área colorida em azul corresponde à extensão da região utilizada para o estudo eletrofisiológico. Somente neurônios localizados nessa região foram registrados.

3.7.2 Micropipetas

As pipetas utilizadas foram sempre feitas no dia dos experimentos utilizando um *puller* (P-97, Sutter Instruments®), a partir de capilares de borosilicato, com resistência de ~6-8MΩ, e preenchidas com a seguinte solução intracelular (valores em mM): 117 K-gluconato, 10 HEPES, 2 Na₂ATP, 0,4 Na₃GTP e 0,1 EGTA, com pH de 7,3 e ≈300mOsm. A solução intracelular era aliquoteada e mantida congelada a -20°C até o dia do experimento. Durante o experimento, essa solução era mantida no gelo para o preenchimento das micropipetas que iam sendo utilizadas durante o experimento.

3.7.3 Registro Eletrofisiológico

Os cortes foram colocados em uma câmara de submersão para registro sob um aparato montado em uma mesa antivibratória, acoplado a um microscópio de contraste de interferência diferencial (E600FN Eclipse, Nikon®) com transmissão de imagem para um

monitor via câmera de vídeo, e mantidos em 30°C com perfusão constante (utilizando uma bomba peristáltica) de aCSF oxigenada (a mesma utilizada na manutenção dos cortes, conforme descrito na **seção 3.7.1**). O sistema de perfusão era previamente lavado com água destilada por pelo menos 10min, depois o aCSF era colocado em circulação sob oxigenação constante e aquecimento, usando um aquecedor TC-324B (Warner Instruments Corporation®) por pelo menos 20min antes do início dos registros, para garantir que a solução de perfusão estivesse bem oxigenada e na temperatura correta no momento de adicionar os cortes na câmara de registro. Os cortes de cérebro eram mantidos nessas condições ao longo de todo o experimento, sendo o sistema de perfusão sempre lavado com água destilada ao final do experimento.

A região do PL foi identificada no corte utilizando-se o *fórceps minor* como guia anatômico (**Figura 8**), e as camadas do PL foram identificadas no microscópio visualmente: a camada 2/3 pode ser reconhecida por se localizar entre as camadas 1 e 5, sendo que a camada 1 é facilmente localizada por ser aneuronal e bastante fina, enquanto a camada 5 possui alta densidade de corpos celulares neuronais. Com o auxílio de um micromanipulador (MPC-200, Sutter Instruments®), um eletrodo bipolar concêntrico foi colocado na camada 1 para a estimulação elétrica do corte, pois a mesma se comunica diretamente com a camada 5. A estimulação foi aplicada utilizando um estimulador A365 (World Precision Instruments®), que permite a regulação analógica da intensidade do estímulo aplicado. A micropipeta era aproximada dos neurônios da camada V utilizando um segundo canal do micromanipulador, em sensibilidade moderada (número 4 no MPC-385 da Sutter Instruments®), guiando-se pela visualização do corte no monitor e movendo a mesa antivibratória quando necessário para visualizar a micropipeta e a célula a ser registrada. A **Figura 9** ilustra uma configuração padrão para a execução dos experimentos.

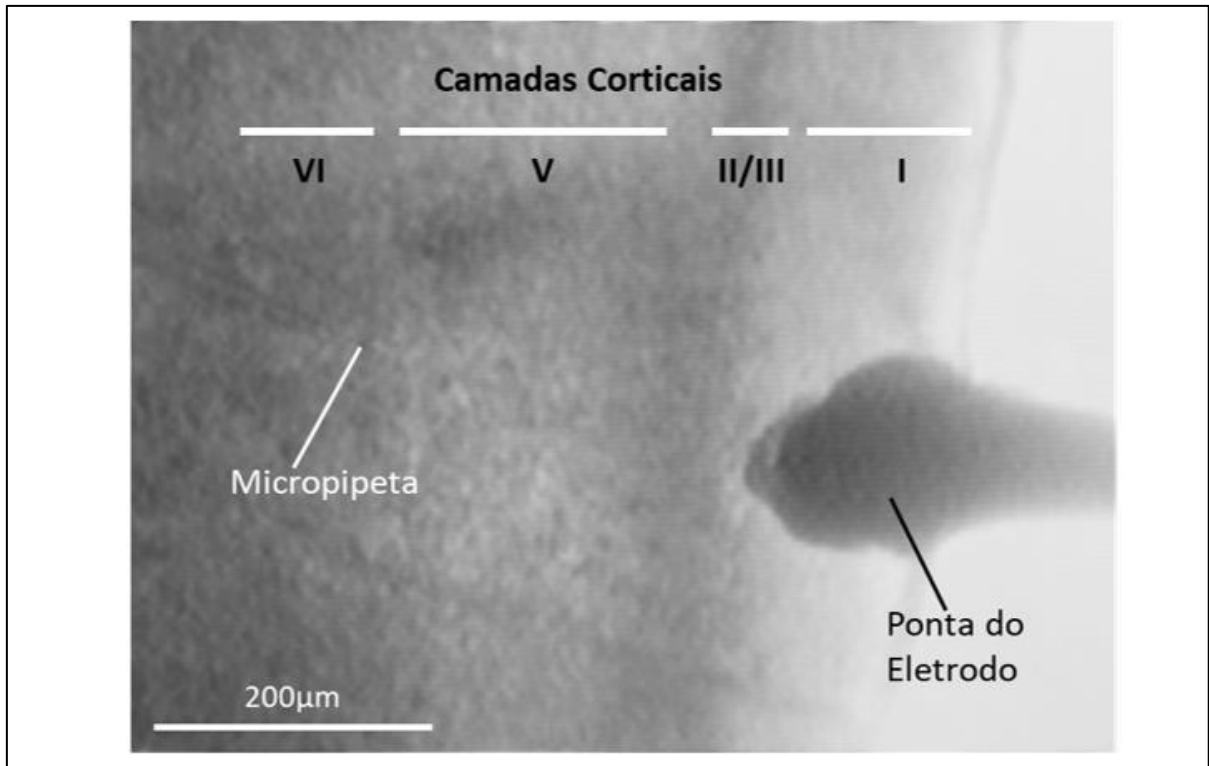


Figura 9. Foto de um corte de cérebro preparado para iniciar o *patch-clamp* e registro eletrofisiológico. A extensão de cada camada do PL está indicada nas barras acima da imagem, e é notável o contraste entre as camadas II/III e a camada V. A micropipeta é visível na imagem, bem como o eletrodo no ponto em que toca o tecido na camada I. Não há camada IV nessa região do córtex de ratos.

As células selecionadas para o experimento eram escolhidas baseado em parâmetros visuais, tais como tamanho adequado ($\approx 20\mu\text{M}$) e brilho (brilhantes e não escuras), que indicam células potencialmente saudáveis para o registro (**Figura 10**). A micropipeta é acoplada a um sistema de pressão, o que permite a realização do *patch-clamp* na membrana da célula. Após a obtenção do *patch*, a membrana era rompida por sucção e se obtinha uma configuração de *whole-cell*, permitindo o registro de parâmetros eletrofisiológicos da célula tais como potenciais de ação. Todos os registros foram feitos em modo *current clamp*, sendo registradas as variações no potencial de membrana em todos os casos. A **Figura 11** mostra um registro de potenciais de ação típico de um neurônio excitatório piramidal da camada V do PL. Células que após o *patch* não apresentavam esse tipo de registro eram excluídas, pois a ausência desse padrão de potenciais de ação pode ser indicativa de neurônios não-excitatórios.

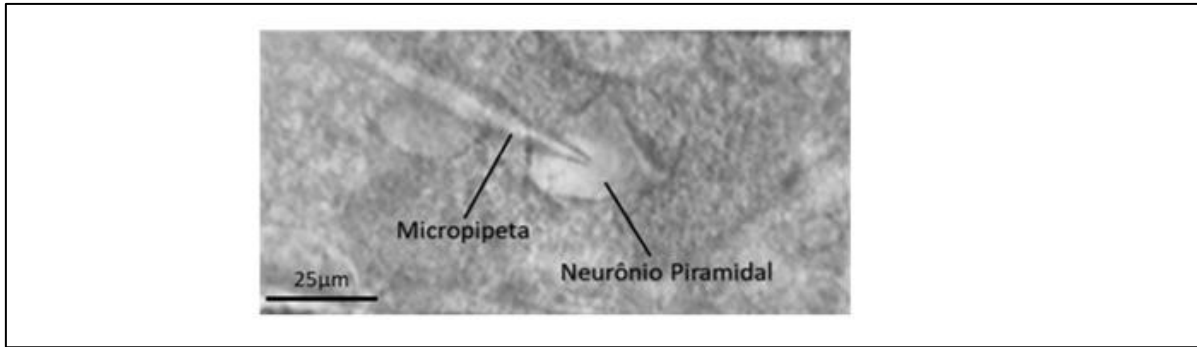


Figura 10. Exemplo de neurônio piramidal saudável no momento do *patch*. Nessa foto é possível observar a característica membrana brilhante e com bom contraste de um neurônio viável para experimentação. O formato da célula também corresponde ao formato clássico de neurônios piramidais. É possível observar também uma “mancha” escura ao lado inferior esquerdo do neurônio onde está sendo feito o *patch*, que indica provavelmente uma célula morta.

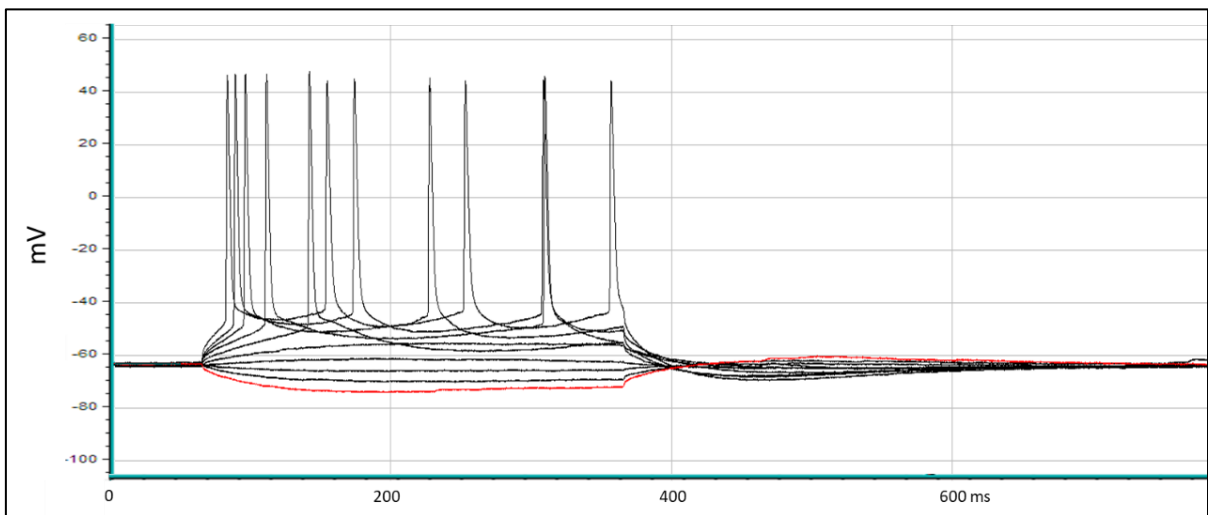


Figura 11. Registro de potenciais de ação de um neurônio piramidal da camada V do PL. Notam-se os potenciais de ação regulares, evocados pela injeção de corrente despolarizante diretamente na célula em *whole-cell patch*. Nessa imagem também pode-se observar o potencial de membrana em repouso desses neurônios, de ≈ -65 mV.

Os registros foram obtidos em *whole-cell*, usando um amplificador Multiclamp 700B, Digidata 1322A e *software* pClamp (Axon Instruments®). A viabilidade das células foi avaliada pela capacidade de geração de potenciais de ação após a injeção de corrente, e por apresentar durante todo o experimento parâmetros de resistência de membrana acima de $100 \text{ M}\Omega$, e resistência de acesso entre $10\text{-}30 \text{ M}\Omega$. Células fora destes parâmetros foram excluídas das análises. O n experimental do estudo eletrofisiológico sempre corresponde ao número de células registradas, sendo também indicado o número total de animais utilizado para cada experimento.

3.7.4 Estimulação Elétrica e Protocolo de *theta burst*

Respostas sinápticas (potenciais excitatórios pós-sinápticos, ou EPSPs) foram evocadas através da estimulação da camada 1, com a intensidade de estimulação ajustada para causar respostas na faixa de 2-5mV. A intensidade da corrente aplicada variou entre 100µA a 1mA, e um estímulo a cada 10s era aplicado. Uma *baseline* era registrada, após a obtenção do *whole-cell patch*, até que fosse obtido um registro com no mínimo 10min de estabilidade de respostas, definida como uma variação menor que 2mV entre uma resposta e outra. Após a obtenção do registro de *baseline*, a intervenção experimental era realizada (conforme descrito a seguir). O registro em *whole-cell* era mantido por 30 a 40min, dependendo do experimento, após o registro da *baseline*.

O protocolo de *theta burst* utilizado nesse trabalho consistiu da aplicação de 13 trens de 4 pulsos a 100Hz, na frequência de 5Hz, repetidos 3x a intervalos de 1min. A **Figura 12** ilustra com mais detalhes o protocolo de *theta burst* utilizado. Essa estimulação era aplicada pelo mesmo eletrodo bipolar concêntrico localizado na camada I utilizado para as demais estimulações.

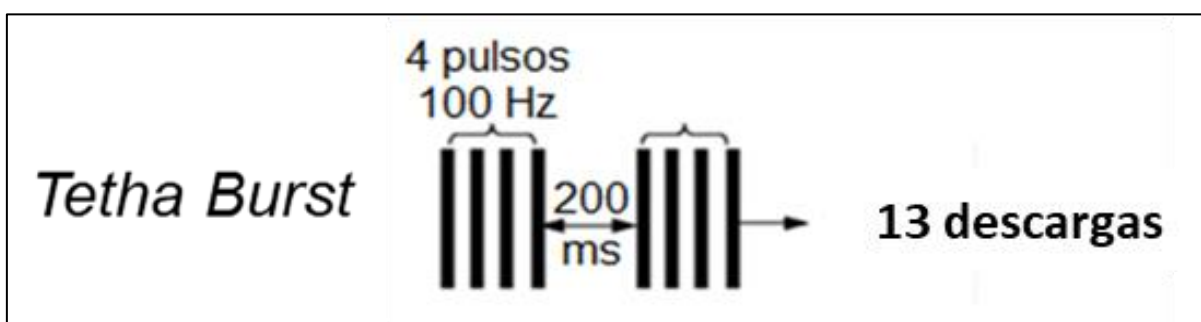


Figura 12. Protocolo de *theta burst* empregado no estudo eletrofisiológico. O protocolo aqui ilustrado era repetido três vezes, em intervalos de 1min.

3.7.5 Drogas

As drogas utilizadas foram: spadin (5594, *batch* nº4, Tocris®), um peptídeo bloqueador de TREK-1 bastante potente ($IC_{50} = 71nM$) e seletivo [150]; Serotonina (H9523, Sigma®), um neurotransmissor de ocorrência natural em mamíferos; e 8-hidróxi-2-(di-n-propilamino)-tetralina, abreviada como 8-OH-DPAT (H8520, Sigma®), um agonista potente e seletivo para receptores de serotonina do tipo 1, com alta afinidade para o subtipo 5HT_{1A}. As doses

empregadas foram: spadin – 100nM, 5-HT – 50 μ M, e 8-OH-DPAT – 1 μ M. As doses foram baseadas em outros estudos da literatura empregando *patch-clamp* [150, 177].

Todas as drogas foram preparadas por diluição em água. Soluções estoques eram preparadas, alíquotadas e armazenadas a -20°C até o momento da utilização. A concentração das drogas nas alíquotas era calculada para se obter a concentração final desejada nos experimentos. Não houve dificuldades especiais no preparo das drogas utilizados, sendo possível diluir todas em água com agitação simples. A spadin tem a aparência de um disco de isopor pequeno dentro do frasco, sendo necessário injetar água destilada dentro do frasco no volume calculado para a concentração desejada, para preparar a solução estoque.

3.7.6 Desenho Experimental do Estudo Eletrofisiológico

Para testar se a 5-HT, TREK-1 ou 5HT_{1A} modulam a plasticidade sináptica no PL, a *baseline* das células foi registrada conforme descrito na **seção 3.7.3**, e após 10min de registro estável, foi adicionado ao banho de perfusão dos cortes cerebrais a droga a ser testada. Após a aplicação da droga o registro foi continuado por 30min. Após o término do experimento, o corte era removido e o sistema de perfusão lavado com água destilada por pelo menos 30min para assegurar a remoção da droga. Foram testadas isoladamente, dessa forma, Spadin (100nM), 8-OH-DPAT (1 μ M) e 5-HT (50 μ M).

Em seguida, foi realizado um experimento para testar se ocorriam interações entre 5HT_{1A} e TREK-1. Para isso, os cortes cerebrais eram colocados no *setup* para registro e spadin 0,1 μ M era adicionada ao banho. Para garantir que a droga bloqueasse os canais TREK-1 de maneira estável, a perfusão do corte com spadin era mantida por pelo menos 30min antes que fosse realizado o *whole-cell patch*. Após esse período, neurônios da camada V do PL eram registrados para *baseline*, e depois da obtenção de 10min de registro estável de *baseline*, 8-OH-DPAT a 1 μ M foi adicionado ao banho. Seguiu-se o registro por 30min após a aplicação de 8-OH-DPAT, e após o término do experimento o corte era removido e o sistema de perfusão lavado.

Nos experimentos que investigaram a ação de *theta burst*, após o registro da *baseline* a estimulação *theta burst* era aplicada, num protocolo de 2min de duração no total (conforme descrito na **seção 3.7.4**). Após a aplicação de *theta burst*, o registro era retomado e mantido

por 40min. Em experimentos com objetivo de avaliar se a presença de outros moduladores alterava a ação de *theta burst* na plasticidade sináptica, os cortes eram colocados no *setup* sob perfusão constante em banho contendo a droga a ser testada (5-HT, 8-OH-DPAT ou Spadin, nas doses mencionadas anteriormente) por pelo menos 30min antes do *whole-cell patch*. Após esse período, neurônios da camada V do PL eram registrados para *baseline*, e então *theta burst* era aplicado. Na sequência, o registro era retomado e mantido por 40min. Durante todo o registro a solução de perfusão permanecia com a droga. Após o término do experimento, o corte era removido e o sistema de perfusão lavado com água destilada.

3.7.7 Pulso Pareado

Os experimentos de pulso pareado consistiram na aplicação de 4 pulsos sequenciais, na frequência de 10Hz, a intervalos de 10s. Esse protocolo era repetido 5x, antes do registro da *baseline* e ao final do registro após a aplicação das drogas ou *theta burst*, para avaliar se a intervenção experimental realizada tinha algum efeito sobre o pulso pareado. Esse tipo de experimento pode revelar se a resposta na plasticidade sináptica observada apresenta algum componente pré-sináptico, pois alterações no pulso pareado evidenciam alterações na liberação de neurotransmissores sobre o neurônio que está sendo registrado [178]. Normalmente, esse experimento é executado efetuando dois pulsos sequenciais, porém nesse estudo foi optado por realizar quatro pulsos para uma melhor definição dos resultados, como um protocolo alternativo; assim, embora nessa tese se use o termo “pulso pareado” como é de praxe na literatura em eletrofisiologia, um termo mais adequado seria “pulso tetrareado”, uma vez que foram feitos 4 pulsos sequenciais como descrito aqui.

O resultado desses experimentos foi analisado da seguinte forma: o pico do EPSP evocado pelo primeiro pulso é considerado a resposta basal (100%), e é calculada uma razão entre o pico dos demais pulsos em relação a essa resposta basal. Dessa forma, se obtém a variação de resposta entre o primeiro pulso e os demais, podendo-se observar o aparecimento de uma facilitação ou depressão pré-sináptica: quando a razão do quarto pulso é maior que 1, houve um aumento da resposta em relação ao primeiro pulso, o que se interpreta como uma menor probabilidade de liberação de neurotransmissores pelo terminal pré-sináptico, uma vez que o quarto pulso ainda foi capaz de evocar um EPSP maior que o primeiro pulso;

quando a razão do quarto pulso é menor que 1, houve uma diminuição da resposta em relação ao primeiro pulso, indicando uma maior probabilidade de liberação de neurotransmissores pelo terminal pré-sináptico, uma vez que o primeiro pulso provavelmente induziu a liberação de boa parte dos neurotransmissores armazenados, de forma que o quarto pulso ao chegar no botão sináptico já não encontra muitas vesículas prontas a serem liberadas.

3.7.8 Análise de Dados Eletrofisiológicos

Todos os dados obtidos nos registros eletrofisiológicos foram analisados pela extração do pico de resposta médio a cada minuto (cada minuto compreendendo 5 respostas, considerando que os estímulos testes eram realizados a cada 10s) pelo *software* Clampfit 11.1 (Axon Instruments®). Os dados eram normalizados pela média da *baseline*, de forma que as respostas são apresentadas como % de EPSP (Potencial Excitatório Pós-Sináptico), sendo 100% a resposta média da *baseline*.

Para o pulso pareado, a análise foi feita normalizando os pulsos em relação ao pico do primeiro pulso, e calculando-se a razão entre o segundo, terceiro e quarto pulsos em relação ao primeiro. Dessa forma as respostas são apresentadas como “Razão de Pulso Pareado”, onde uma razão maior significa que o pulso foi maior que o primeiro (considerado basal), indicando uma facilitação sináptica (menor probabilidade de liberação de neurotransmissores), enquanto uma razão menor significa que o pulso foi menor que o primeiro, indicando uma depressão sináptica (maior probabilidade de liberação de neurotransmissores). Ambos os fenômenos indicam a existência de componentes pré-sinápticos na resposta de plasticidade sináptica observada no experimento.

3.8 Estatística

Os resultados foram submetidos a uma análise estatística descritiva inicial, onde foi avaliada a homogeneidade de variância pelo teste de Levene, e foi gerado um modelo de regressão linear com resíduos *studentizados* e calculado o valor da distância de Cook. Esses dados foram utilizados para análise de normalidade, utilizando o teste de Shapiro-Wilk, e para análise de *outliers*, onde apenas foram excluídos os valores que apresentaram resíduo acima

de 3, combinados com distância de Cook acima de 0,3. Esses valores foram determinados por análises prévias de dados obtidos em estudos piloto para esse trabalho, embora poucos *outliers* foram de fato removidos das análises aqui apresentadas. Quando os dados não se apresentaram normais e/ou homogêneos, transformações matemáticas (raiz quadrada, raiz cúbica, recíproca ou logaritmo neperiano) foram empregadas para adequar os dados à homogeneidade e normalidade, permitindo a análise paramétrica quando possível.

Análises paramétricas (ANOVAs) foram empregadas na maior parte dos experimentos desse estudo, sendo o *design* estatístico mais comum o ANOVA *two way*, avaliando como fatores principais a MS e o Sexo; porém, em alguns casos foram utilizados *Mixed* ANOVAs (quando houve medidas repetidas em conjunto com fatores dentre grupos) e RMANOVA. Teste *t* de *Student* também foi empregado em alguns experimentos. Nos casos de ANOVA *two way*, testes subsequentes de efeito principal simples foram executados de acordo com cada resultado (ou seja, de acordo com a presença ou não de significância para a interação entre os dois fatores analisados). Para interação significativa, ou nos casos de tendência à significância para a interação (definida como $0,05 < p < 0,1$), seguiu-se a análise com comparações *pairwise* utilizando o ajuste de Bonferroni, pois o mesmo é considerado mais efetivo para análises contendo poucos grupos experimentais para evitar erros do tipo I (falso positivo), que é o caso desse desenho experimental [179]. Para interação não significativa, os efeitos principais são apresentados.

Análises não paramétricas foram empregadas nas ocasiões em que os dados não cumpriram os requisitos para ANOVA, e nesse trabalho foi optado pelo teste *U* de *Mann-Whitney* como escolha de análise não paramétrica para grupos independentes. Todas as análises não paramétricas incluíram *outliers*, pois diferentemente dos testes paramétricos esses testes não são afetados significativamente pela presença de *outliers*. Porém, todos os dados são apresentados como média \pm epm (erro padrão da média), com a finalidade de manter clareza e padronização na apresentação dos resultados do trabalho, embora a forma mais adequada de apresentar resultados por análises não paramétricas seja a apresentação por posto médio ou mediana \pm máximo/mínimo, dependendo da distribuição dos dados. Também foi empregado o Teste Exato de Fisher para análises de população, no estudo eletrofisiológico.

O nível de significância adotado foi de 95%. Os dados são apresentados na forma de $média \pm epm$, referentes aos dados originais (não transformados), em todos os casos. O sinal ‘*’ indica diferenças significativas ($p < 0,05$) nas comparações *pairwise* (*post-hoc* Bonferroni) ou para os efeitos principais. Nesse trabalho, os valores de p são reportados de maneira exata. O valor de p vem sendo considerado como insuficiente para tomada de decisão em relação as análises estatísticas [180], portanto outros parâmetros estatísticos tais como o poder da análise e o η^2 (tamanho do efeito) também foram calculados, embora não sejam apresentados aqui. As legendas apresentam os detalhes da análise estatística executada para cada experimento realizado. Todas as análises foram conduzidas no *software* SPSS® (IBM) e Excel® (Microsoft).

4 RESULTADOS

Os resultados aqui descritos se referem, quando não indicado de outra forma, aos experimentos efetuados em ratos infantis (PND25±1). Os dados estão organizados de acordo com as técnicas realizadas. Detalhes sobre o resultado das análises estatísticas estão contidos nas legendas de cada Gráfico.

4.1 *Alterações comportamentais em animais infantis MS*

Como o protocolo de MS pode levar a várias alterações comportamentais e de desenvolvimento do sistema nervoso, foi avaliado o comportamento alimentar dos filhotes em ≈PND25 em um grupo experimental separado, e também foi medido o ganho de peso de todas as ninhadas utilizadas nos experimentos, durante o período de amamentação. Os **Gráficos 1A** e **1B** mostram que não houve efeito da MS nesses parâmetros, assegurando que o protocolo de MS não induziu toxicidade aparente nos filhotes, o que poderia introduzir algum viés na interpretação dos resultados de testes de comportamento. Após a obtenção desses dados, seguiu-se a execução dos demais testes comportamentais com o objetivo de avaliar comportamentos relacionados à depressão.

4.1.1 Fêmeas são mais vulneráveis ao desespero comportamental induzido pela MS

Para os ratos infantis (≈PND25), o FST resultou em comportamento depressivo-símile apenas nas fêmeas MS (**Gráfico 2A**). O mesmo teste foi conduzido em ratos adultos (≈PND100) e observou-se comportamento depressivo-símile para animais MS de ambos os sexos (**Gráfico 2B**), portanto validando o modelo de MS como um modelo animal de depressão utilizado nesse trabalho para ambos os sexos. O efeito da MS em induzir desespero comportamental, que é o parâmetro avaliado no FST, foi bastante notável: fêmeas infantis MS foram duas vezes mais imóveis que as controles (média de 83s para CON e 200s para MS), bem como os machos adultos foram duas vezes mais imóveis que os controles (média de 43s para CON e 100s para MS).

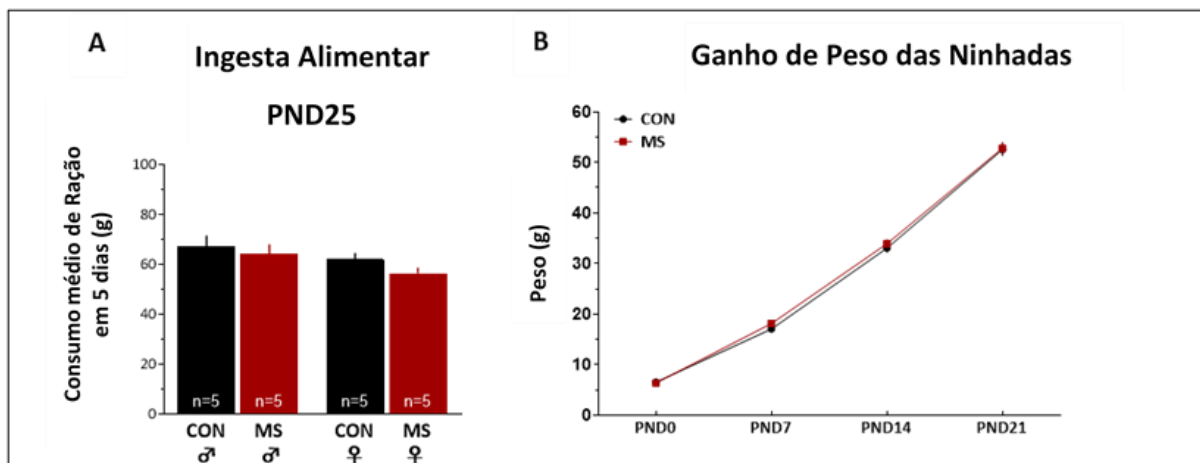


Gráfico 1. A Separação Materna não prejudica o crescimento dos filhotes. A) ANOVA *two way* mostrou que não houve interação ($F_{3,16}=0,155$, $p=0,699$) nem efeito principal da MS ($F_{1,16}=1,697$, $p=0,211$). Tendência a significância estatística foi observada para efeito principal de Sexo ($F_{1,16}=4,120$, $p=0,059$), e, portanto, uma análise *post hoc pairwise* foi feita, resultando em nenhuma diferença significativa entre os grupos ($p>0,10$, Bonferroni). **B)** RMANOVA para interação não foi significativa ($F_{3,93}=0,387$, $p=0,670$) e efeito principal da MS não foi detectado ($F_{1,31}=0,437$, $p=0,513$). Peso entre os PNDs foi significativo estatisticamente ($F_{3,93}=1958,36$, $p<0,0005$) para ambas ninhadas CON e MS, indicando o ganho de peso esperado pelo crescimento dos animais. O tamanho da amostra para o ganho de peso foi de 15 ninhadas CON e 18 ninhadas MS. Dados são média±epm. O tamanho da amostra para a ingesta alimentar está indicado dentro das barras. CON = grupo Controle, MS = grupo de Separação Materna. PND = Dia Pós-natal (idade dos animais).

Surpreendentemente, um efeito da idade dependente do sexo também foi observado: machos adultos foram menos imóveis que machos infantis, enquanto fêmeas adultas mostraram maior imobilidade que fêmeas infantis (**Gráficos 2A e B**). Esse resultado indica a existência de importantes diferenças no fenótipo comportamental e na resposta ao estresse entre os sexos, visto que o desespero comportamental aqui observado foi induzido por um protocolo de estresse pós-natal, a MS. Animais machos parecem ter uma relativa resiliência à depressão, uma vez que apresentaram desespero comportamental somente na idade adulta enquanto nenhum efeito aparece na infância. Por outro lado, as fêmeas apresentam comportamento depressivo-símile já na infância, o qual persiste até a idade adulta, sugerindo que as fêmeas são em geral mais suscetíveis ao estresse pós-natal do que os machos.

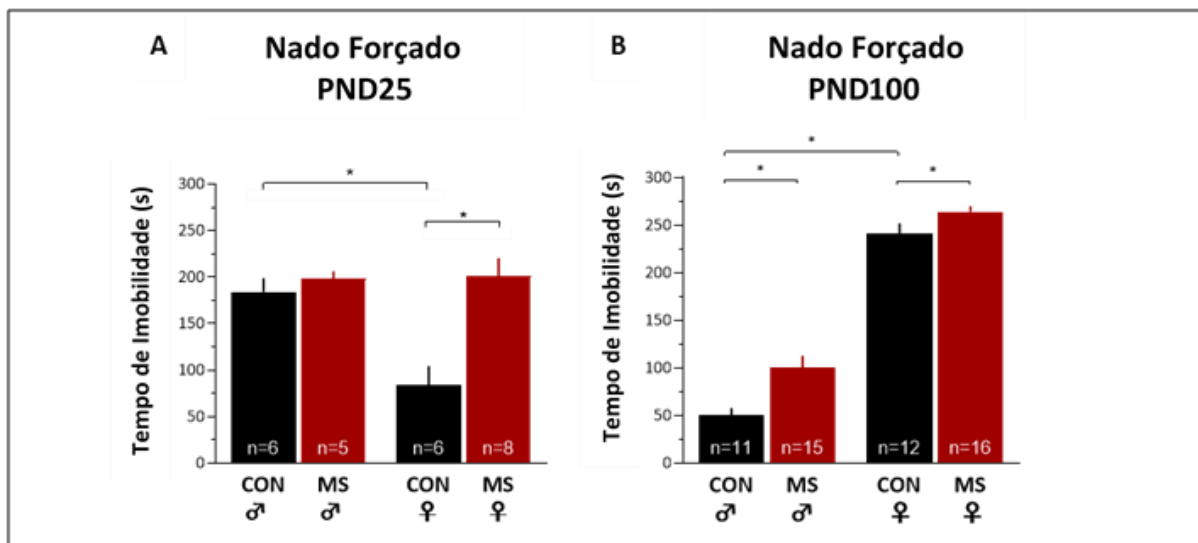


Gráfico 2. Indução de comportamento depressivo-símil pela MS é dependente do sexo e da idade. A) ANOVA *two way* detectou interação ($F_{3,21}=7,956$, $p=0,010$), efeito principal da MS ($F_{1,21}=12,922$, $p=0,002$) e efeito principal do Sexo ($F_{1,21}=7,131$, $p=0,014$). Bonferroni *post hoc* mostrou diferenças para $\text{♂CON} \times \text{♀CON}$ ($p=0,001$) e $\text{♀CON} \times \text{♀MS}$ ($p<0,001$). B) *Mann Whitney U test* detectou diferenças significativas para as comparações $\text{♂CON} \times \text{♂MS}$ ($U=135$, $p=0,005$) e $\text{♀CON} \times \text{♀MS}$ ($U=140$, $p=0,042$), indicando, portanto, um efeito da MS para ambos os sexos. A comparação entre $\text{♂CON} \times \text{♀CON}$ também foi significativa ($U=132$, $p<0,001$). Dados são média \pm epm. O tamanho amostral para cada grupo está indicado dentro das barras. CON = grupo Controle, MS = grupo de Separação Materna. PND = Dia Pós-natal (idade dos animais). * = $p<0,05$.

4.1.2 A impulsividade não é afetada pela MS, e fêmeas são mais impulsivas que machos

O NSF é um teste que envolve um conflito entre a tomada de decisão e um componente emocional (medo de áreas abertas, para roedores), e por essa razão é considerado como um teste para avaliar o comportamento de tomada de decisão, bem como impulsividade, apesar de ser classicamente considerado um teste de ansiedade por ser sensível à drogas ansiolíticas. Nesse estudo, o NSF foi empregado em um esforço para avaliar a impulsividade, e foi encontrado que a MS não exerceu efeito sobre esse componente comportamental em ratos infantis (**Gráfico 3**). No entanto, novamente foi detectada uma diferença entre os sexos: as fêmeas CON foram mais impulsivas que os machos CON nesse teste. Esse resultado sugere que, possivelmente, as fêmeas executem diferentes estratégias comportamentais quando comparadas aos machos ao enfrentar um determinado conflito.

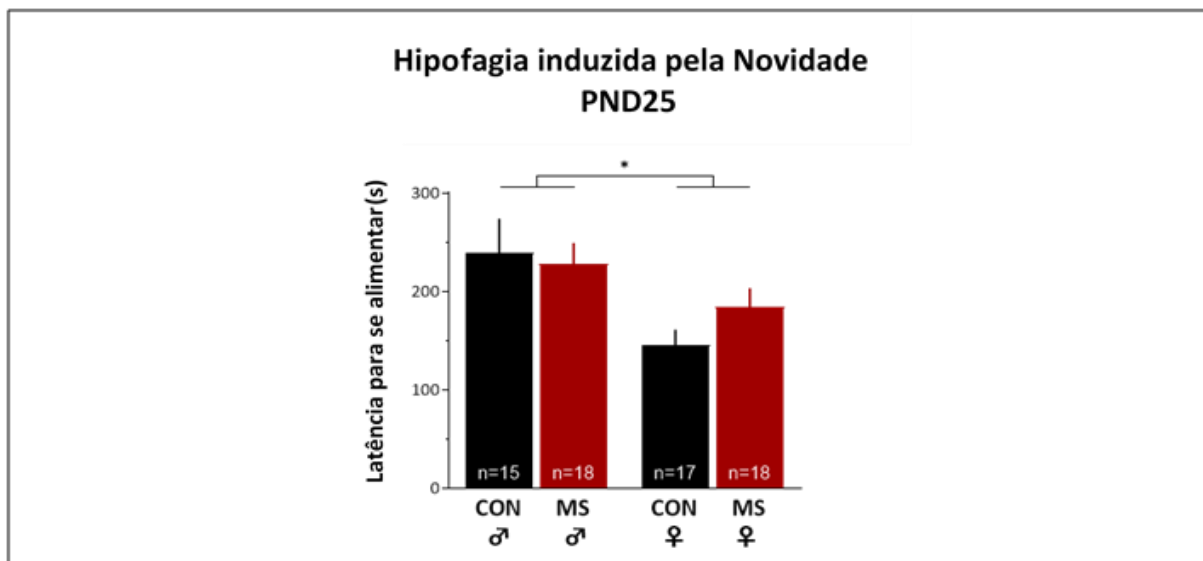


Gráfico 3. Fêmeas infantis são mais impulsivas que machos, e a MS não altera a impulsividade. ANOVA *two way* não foi significativa para interação ($F_{3,64}=0,648$, $p=0,424$) nem efeito principal da MS ($F_{1,64}=0,145$, $p=0,232$). Efeito principal do Sexo foi significativo ($F_{1,64}=7,745$, $p=0,007$). Dados são média \pm epm. O tamanho amostral para cada grupo está indicado dentro das barras. CON = grupo Controle, MS = grupo de Separação Materna. PND = Dia Pós-natal (idade dos animais). * = $p<0,05$.

4.1.3 Anedonia não é induzida em ratos infantis pela MS, mas o autocuidado é reduzido

Para avaliar o desenvolvimento de anedonia, um sintoma comum da depressão, foi utilizado o SPT, um teste capaz de reproduzir (ao menos parcialmente) anedonia em roedores. Nenhuma diferença significativa entre os grupos foi identificada no resultado (**Gráfico 4A**), de forma que o protocolo de MS provavelmente não induziu anedonia em ratos infantis. Na sequência, também foi avaliado o comportamento de *grooming* (autolimpeza), considerado um indicador de autocuidado, o qual se encontra diminuído em modelos animais de depressão [181]. O **Gráfico 4B** apresenta os dados da contagem de episódios de *grooming* observados no teste do campo aberto, onde pode ser observado que a MS induziu uma diminuição significativa do comportamento de autocuidado em animais infantis de ambos os sexos. Esse achado indica que a MS é capaz de reproduzir alguns aspectos da anedonia, mas não todos, visto que não houve diferença no SPT.

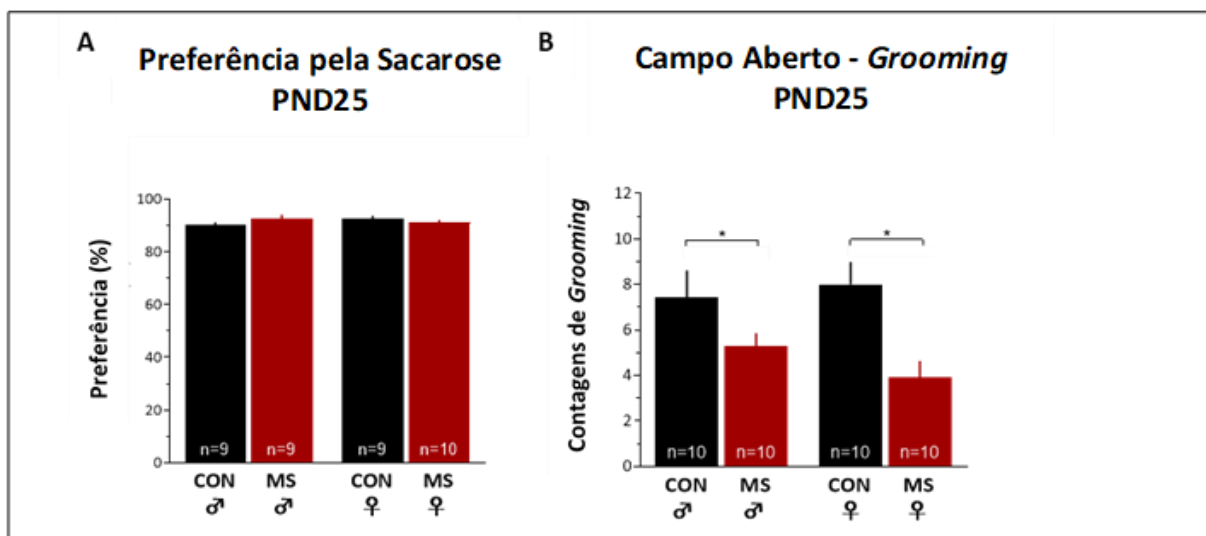


Gráfico 4. Anedonia não está presente em animais infantis MS, mas o autocuidado é reduzido em animais MS de ambos os sexos. **A)** ANOVA *two way* não indicou interação ($F_{3,33}=3,235$, $p=0,081$), não houve efeito principal da MS ($F_{1,33}=0,254$, $p=0,617$) nem do Sexo ($F_{1,33}=0,145$, $p=0,706$). Como houve tendência à significância para a interação, uma análise *post hoc* foi feita (Bonferroni) e não encontrou nenhuma diferença significativa nas comparações entre os grupos ($p>0,10$). **B)** ANOVA *two way* não mostrou interação ($F_{3,36}=1,202$, $p=0,280$). Efeito principal da MS foi significativo ($F_{1,36}=11,555$, $p=0,002$), e o fator Sexo não foi estatisticamente significativo ($F_{1,36}=0,192$, $p=0,664$). Dados são média±epm. O tamanho amostral para cada grupo está indicado dentro das barras. CON = grupo Controle, MS = grupo de Separação Materna. PND = Dia Pós-natal (idade dos animais). * = $p<0,05$.

4.1.4 A MS não altera a locomoção nem o comportamento exploratório

A avaliação da locomoção é feita como um controle padrão em baterias de testes comportamentais, e por ser executada por meio do OF nesse estudo, também foi possível avaliar outros parâmetros tais como o *grooming* (seção 4.1.3), *rearing* (comportamento exploratório) e tempo na área central, que é uma medida de ansiedade. A análise estatística da locomoção e do *rearing* mostrou nenhum efeito da MS (Gráfico 5A e B), mas uma tendência estatística foi observada para uma redução na locomoção em animais MS ($p = 0,07$). Além disso, a análise do tempo na área central também indicou uma tendência à significância estatística para as fêmeas MS ($p = 0,079$) no sentido de uma redução na ansiedade (Gráfico 5C), o que também pode ser interpretado como um estado de maior impulsividade nas fêmeas, que passariam mais tempo na arena central por terem menos medo e talvez um prejuízo na tomada de decisão.

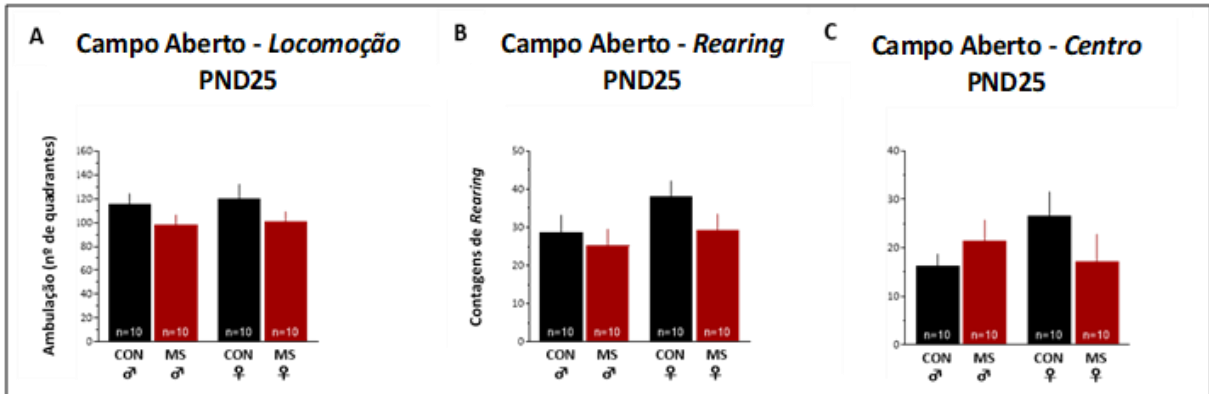


Gráfico 5. O comportamento exploratório não é alterado pela MS. **A)** ANOVA *two way* mostra ausência de interação ($F_{3,36}=0,01$, $p=0,920$). Efeito principal da MS teve tendência a significância ($F_{1,36}=3,425$, $p=0,072$), e efeito principal de Sexo não foi observado ($F_{1,36}=0,133$, $p=0,718$). Análise *post hoc* foi feita para checar a tendência para o efeito principal da MS, e todas as comparações entre os grupos foram não significativas ($p>0,10$, Bonferroni). **B)** ANOVA *two way* mostrou ausência de interação ($F_{3,36}=0,407$, $p=0,528$), nenhum efeito principal da MS ($F_{1,36}=2,146$, $p=0,152$) ou Sexo ($F_{1,36}=2,506$, $p=0,122$). **C)** ANOVA *two way* indicou uma tendência para interação ($F_{3,36}=3,016$, $p=0,091$), não houve efeito principal de Sexo ($F_{1,36}=0,07$, $p=0,793$) nem da MS ($F_{3,36}=0,678$, $p=0,416$). Análise *post hoc* realizada na sequência apontou comparações não significantes ($p>0,10$, Bonferroni) sendo a comparação ♀ CON x ♀ MS resultando em $p=0,079$. Dados são média \pm epm. O tamanho amostral foi de 10 animais para cada grupo, conforme indicado dentro das barras. CON = grupo Controle, MS = grupo de Separação Materna. PND = Dia Pós-natal (idade dos animais).

4.1.5 Quadro geral de alterações comportamentais induzidas pela MS

Em conjunto, os resultados obtidos nesse estudo demonstram alterações comportamentais sexo-dependentes em animais infantis e adultos. As conclusões obtidas dos dados estão sumarizadas na **Figura 13**.

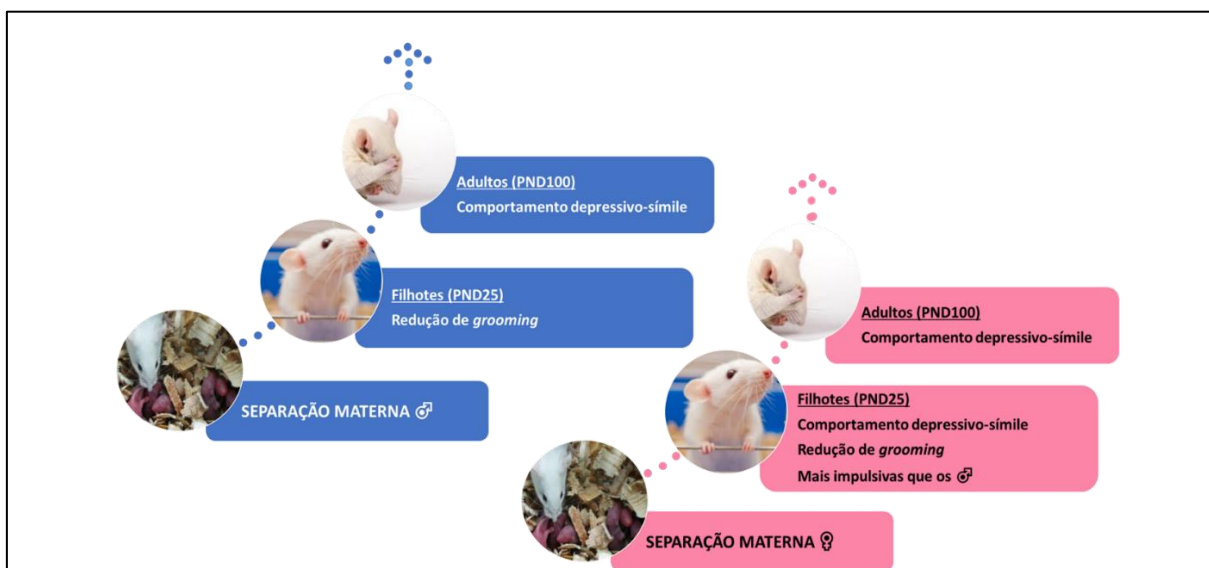


Figura 13. Resumo dos efeitos comportamentais induzidos pela MS em machos e fêmeas. Embora ambos os sexos desenvolvam comportamento depressivo-símile na idade adulta, as alterações comportamentais observadas na infância são mais proeminentes nas fêmeas.

4.2 Imunoistoquímica para TREK-1 e 5HT_{1A}

Para avaliar se a MS causa algum tipo de alteração na quantidade de canais TREK-1 e receptores 5HT_{1A} presentes nas células neuronais, a imunoistoquímica foi utilizada, tendo como alvo quatro áreas centrais específicas envolvidas na circuitaria corticolímbica: a divisão pré-límbica do mPFC (PL), a amígdala basolateral (BLA), o córtex entorrinal lateral (ERh), e o giro denteado do hipocampo (GD).

4.2.1 Imunomarcção para TREK-1 está em geral aumentada em animais MS

O padrão de imunomarcção para TREK-1 foi, na maior parte, com localização na membrana plasmática do soma e no axônio dos neurônios (**Figura 14**). Imunomarcção de menor intensidade também pode ser observada nos dendritos.

O resultado dos experimentos mostra que a MS aumentou significativamente a quantidade de TREK-1 no PL em ambos os sexos (**Gráfico 6**), enquanto na BLA esse aumento foi visto apenas nas fêmeas (**Gráfico 7**). Os machos pareceram ser menos afetados pela MS, apresentando um menor aumento de imunomarcção para TREK-1 no PL e nenhuma alteração na BLA. Similarmente ao visto nos testes comportamentais, as fêmeas foram mais afetadas pela MS em relação a esse parâmetro.

A MS reduziu a imunomarcção para TREK-1 no ERh apenas em machos (**Gráfico 8**). No hipocampo foi observado um aumento de imunomarcção para TREK-1 no GD em animais MS de ambos os sexos (**Gráfico 9**). De forma geral, os resultados sugerem um quadro onde o estresse pós-natal afeta a BLA e o ERh de maneira dependente do sexo, ao passo que afeta o PL e o GD de forma independente do sexo.

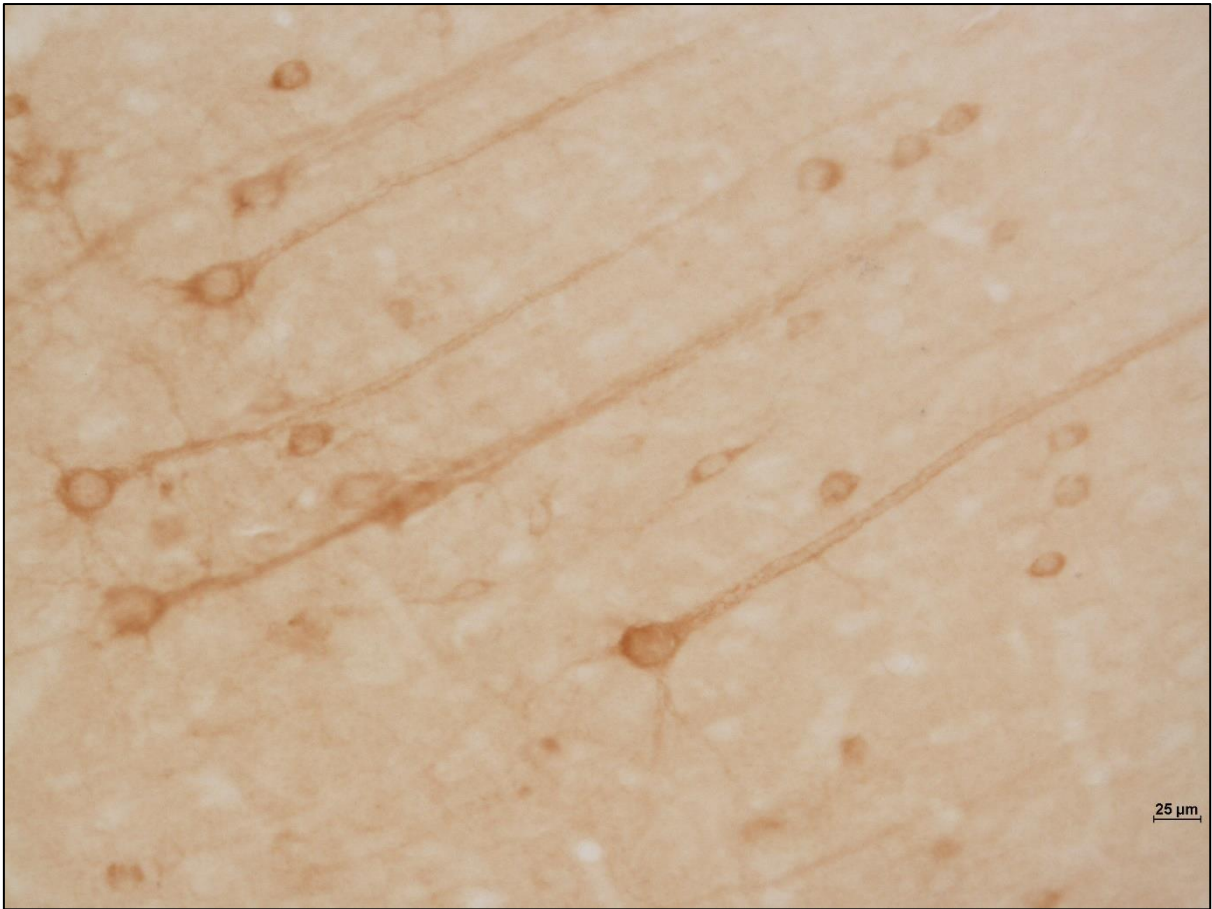


Figura 14. Padrão de imunomarcção para TREK-1 em áreas corticais (córtex somatossensorial). Observa-se expressão do canal ao longo da membrana do soma e ao longo dos axônios. Também há expressão nos dendritos, embora aparentemente em menor intensidade.

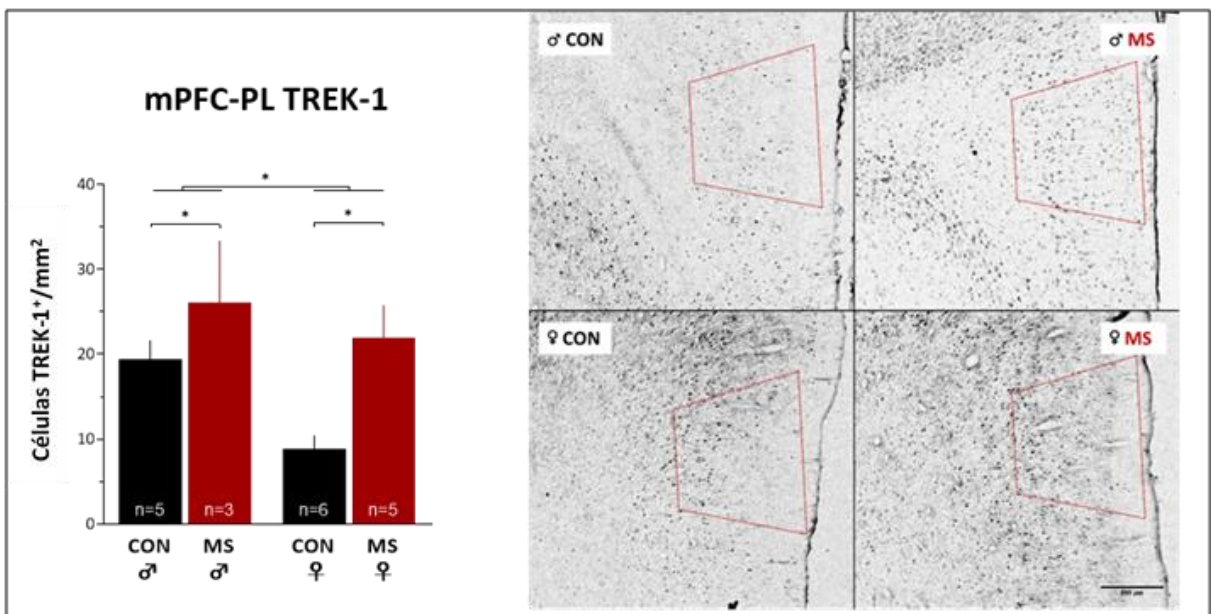


Gráfico 6. A MS aumenta a quantidade de TREK-1 no PL em ambos os sexos. ANOVA *two way* apontou ausência de interação ($F_{3,15}=0,893$, $p=0,360$), efeito principal de Sexo ($F_{1,15}=4,650$, $p=0,048$) e da MS ($F_{1,15}=8,410$, $p=0,011$). Dados são média±epm. Escala = 500μm. O tamanho amostral está indicado dentro das barras. Painel representativo: bregma +2,5 a +4,1mm, com área marcada correspondendo ao PL. * = $p<0,05$.

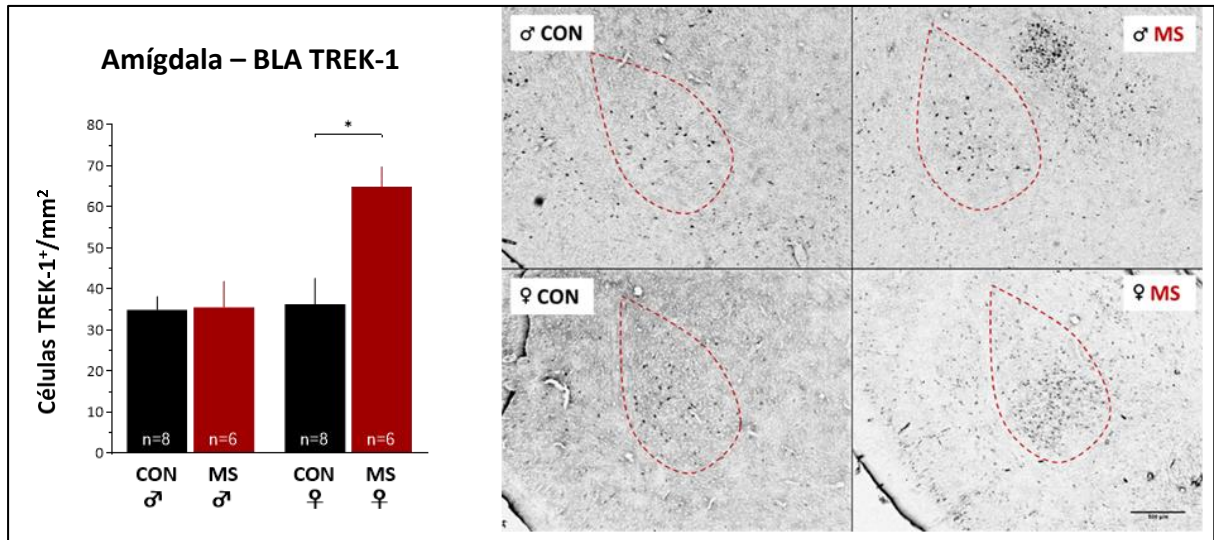


Gráfico 7. MS aumenta a quantidade de TREK-1 na BLA de forma sexo-dependente. ANOVA *two way* mostrou interação significativa ($F_{3,24}=6,901$, $p=0,015$), efeito principal de Sexo ($F_{1,24}=8,258$, $p=0,008$) e MS ($F_{1,24}=7,514$, $p=0,011$). Análise *post hoc* detectou diferença significativa para a comparação ♀ CON x ♀ MS ($p=0,001$, Bonferroni). Dados são média±epm. Escala = 500µm. O tamanho amostral está indicado dentro das barras. Painel representativo: bregma -3,1 a -2,1mm, com área marcada correspondendo à BLA. * = $p<0,05$.

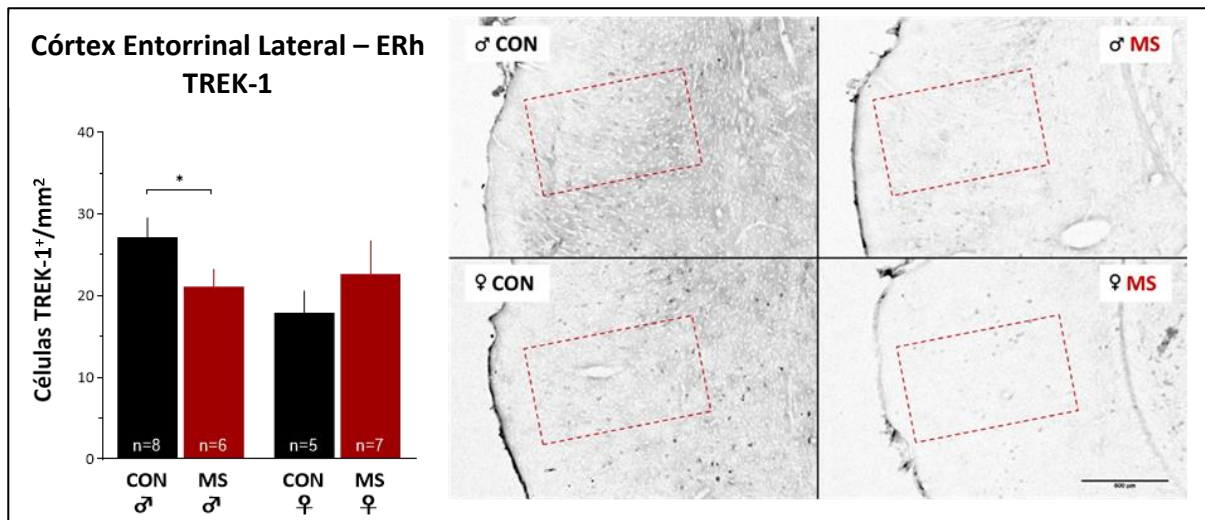


Gráfico 8. MS reduz imunomarcção para TREK-1 no ERh de machos infantis, mas não em fêmeas. ANOVA *two way* mostrou tendência para uma interação significativa ($F_{3,22}=3,189$, $p=0,088$) e nenhum efeito principal foi observado, de Sexo ($F_{1,22}=0,048$, $p=0,829$) ou de MS ($F_{1,22}=1,621$, $p=0,216$). Seguindo análise *post hoc* foi identificada diferença significativa somente para a comparação ♂ CON x ♀ MS ($p=0,044$, Bonferroni). Dados são média±epm. Escala = 500µm. O tamanho amostral está indicado dentro das barras. Painel representativo: bregma -3,9 a -4,9mm, com área marcada correspondendo ao ERh. * = $p<0,05$.

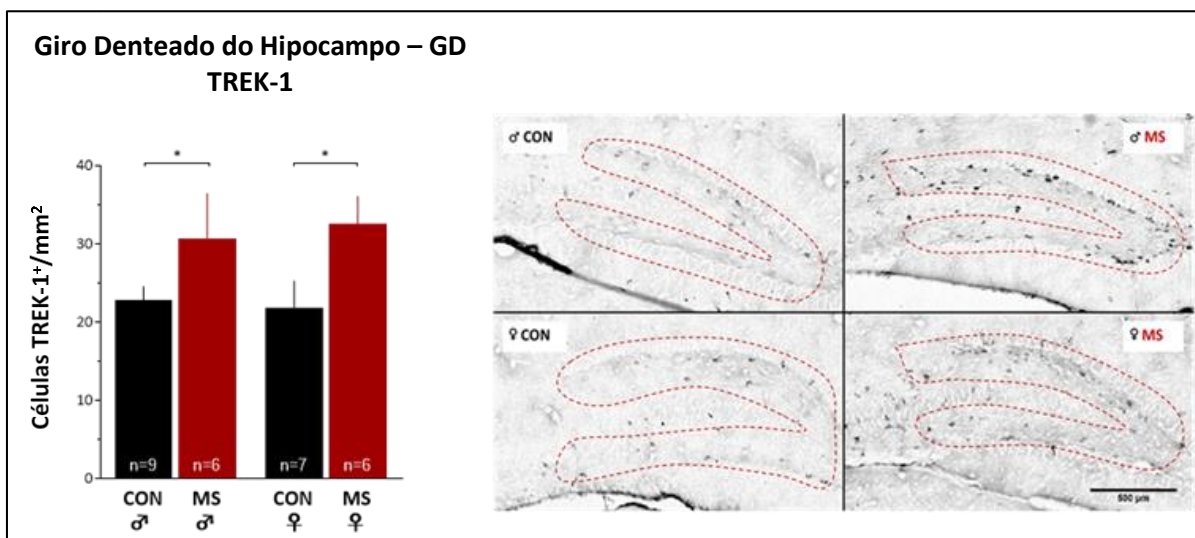


Gráfico 9. Aumento da quantidade de TREK-1 é induzido pela MS no GD de ambos os sexos. ANOVA *two way* não detectou interação ($F_{3,24}=0,164$, $p=0,689$), efeito principal da MS foi significativo ($F_{1,24}=6,872$, $p=0,015$) e de Sexo foi não significativo ($F_{1,24}=0,017$, $p=0,898$). Dados são média±epm. Escala = 500 μ m. O tamanho amostral está indicado dentro das barras. Painel representativo: bregma -4,0 a -2,4mm, com área marcada correspondendo ao GD. * = $p<0,05$.

4.2.2 A MS modifica a quantidade de 5HT_{1A} de forma sexo- e área-dependente, em geral

A **Figura 15** ilustra o padrão obtido pela imunistoquímica para 5HT_{1A}. Observa-se expressão do receptor no citoplasma e membrana plasmática, com fraca imunomarcagem também presente nos dendritos.

Para o circuito PL-BLA, nenhuma alteração significativa em 5HT_{1A} foi evocada pela MS no PL (**Gráfico 10**), onde uma variabilidade alta de resposta foi encontrada nos grupos, mas na BLA pôde ser observada uma elevada imunomarcagem para 5HT_{1A} em machos MS, enquanto as fêmeas foram iguais ao grupo controle (**Gráfico 11**). A MS reduziu a imunomarcagem para 5HT_{1A} no ERh de ambos os sexos (**Gráfico 12**), e no GD a MS também diminuiu a imunomarcagem para 5HT_{1A} apenas nas fêmeas (**Gráfico 13**). Por fim, uma diferença entre os sexos pode ser observada no GD para a quantidade de 5HT_{1A}, onde as fêmeas apresentaram maior quantidade que os machos (**Gráfico 13**). Em geral, os resultados mostram um quadro complexo da imunomarcagem para 5HT_{1A} nas áreas analisadas, onde a MS pode induzir aumento ou redução dependendo da área e do sexo.

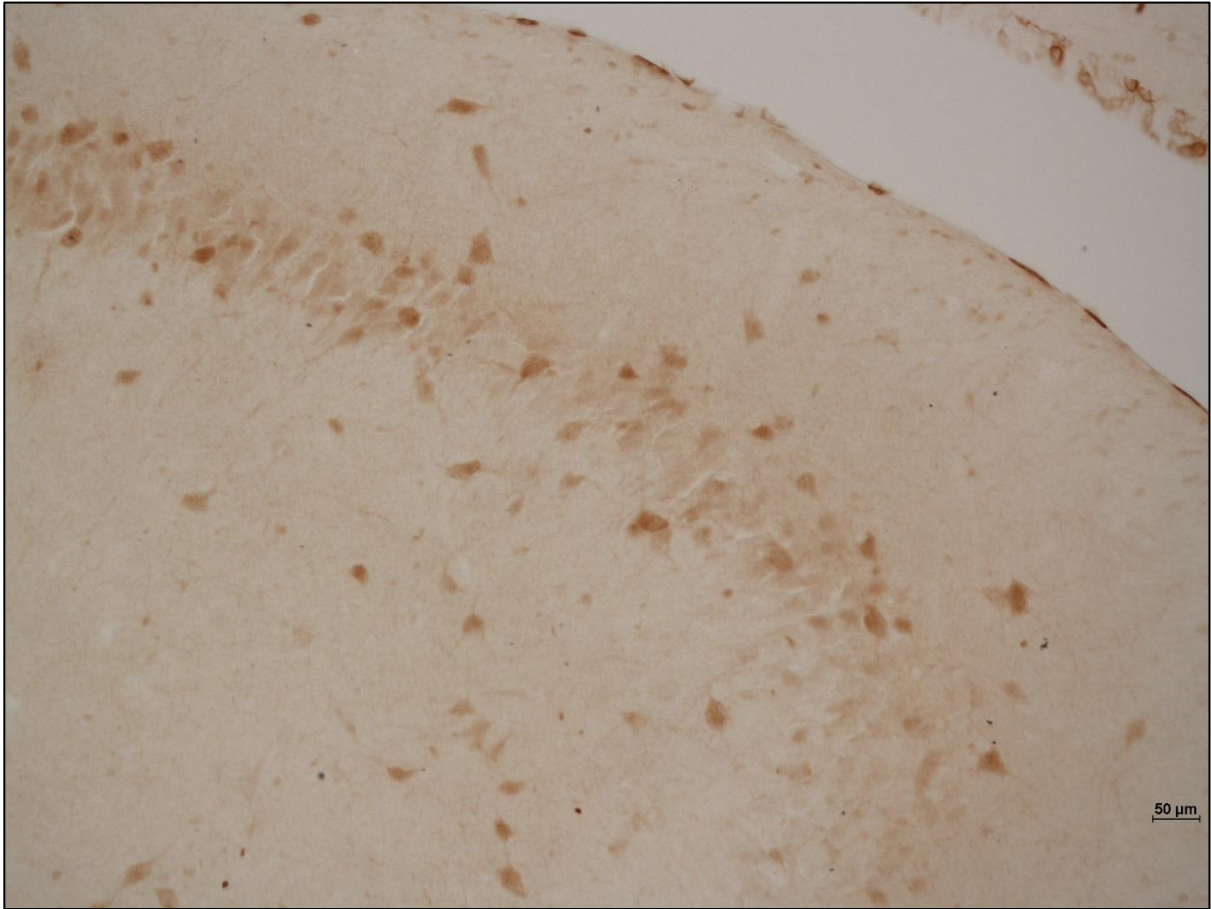


Figura 15. Padrão de imunomarcção para 5HT_{1A} no hipocampo (CA1). Observa-se um padrão de localização na membrana plasmática e também no citoplasma, possivelmente indicando uma alta produção do receptor em neurônios hipocámpais, onde é conhecido que há alta expressão desse receptor.

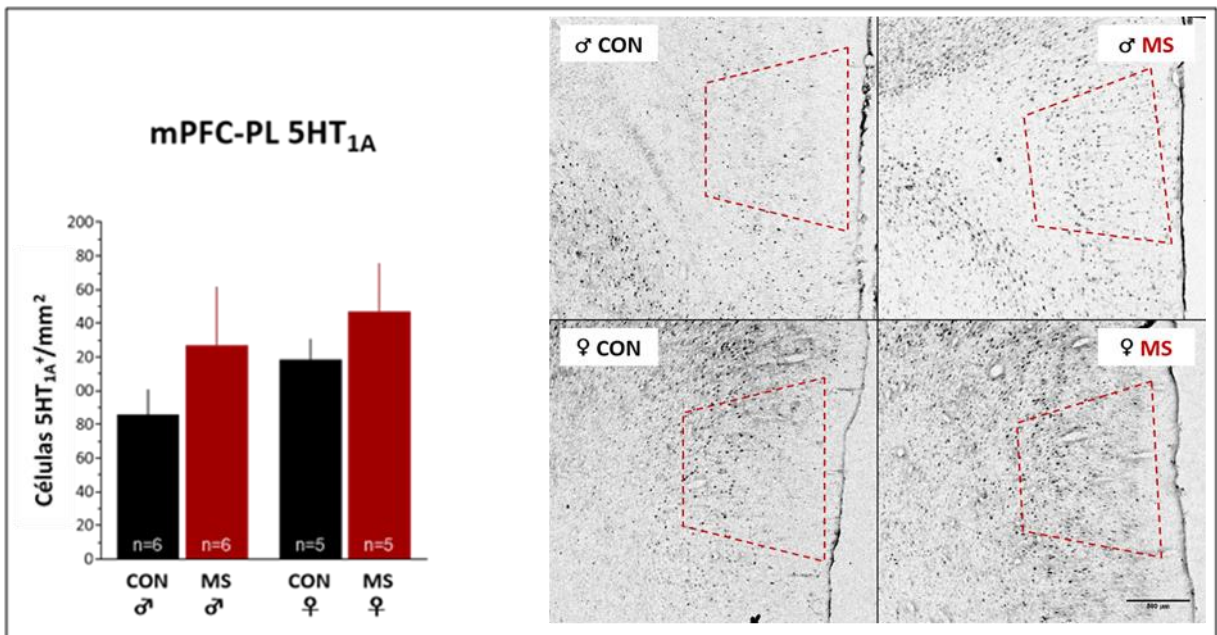


Gráfico 10. A MS não tem impacto na imunomarcção para 5HT_{1A} no PL. ANOVA *two way* não detectou interação ($F_{3,18}=0,115$, $p=0,738$), nem tampouco efeito da MS ($F_{1,18}=0,934$, $p=0,347$) ou de Sexo ($F_{1,18}=2,039$, $p=0,170$). Dados são média±epm. Escala = 500μm. O tamanho amostral está indicado dentro das barras. Painel representativo: bregma +2,5 a +4,1mm, com área marcada correspondendo ao PL.

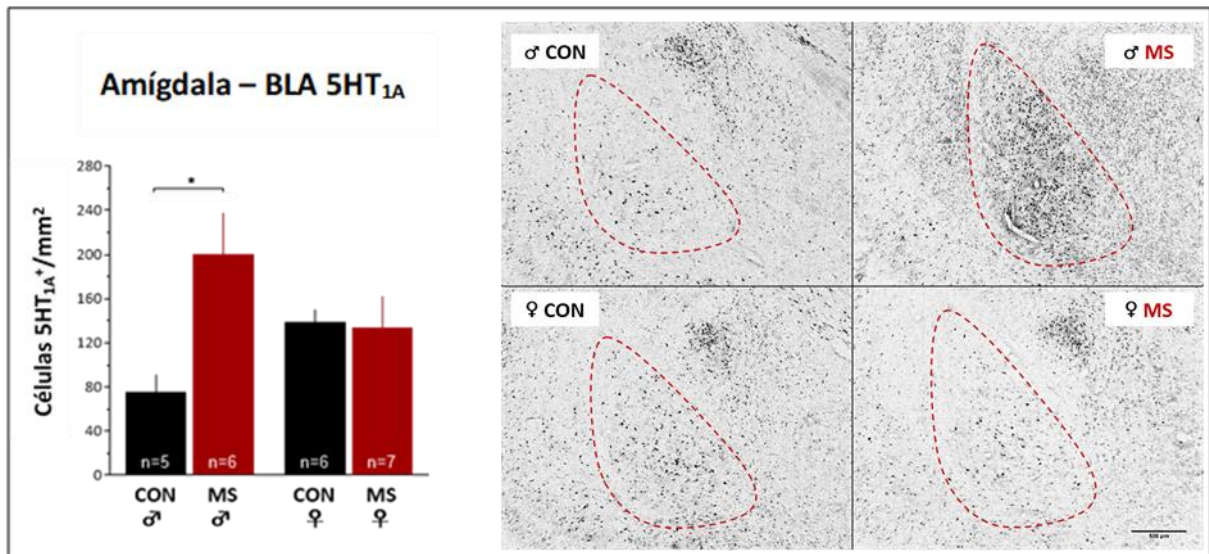


Gráfico 11. MS aumenta a quantidade de 5HT_{1A} na BLA de forma sexo-dependente. ANOVA two way apontou interação ($F_{3,20}=6,021$, $p=0,023$) e efeito principal da MS ($F_{1,20}=5,122$, $p=0,035$), enquanto o fator Sexo não foi significativo ($F_{1,20}=0,004$, $p=0,949$). Análise *post hoc* apontou significância para a comparação ♂CON x ♂MS ($p=0,004$, Bonferroni). Dados são média±epm. Escala = 500µm. O tamanho amostral está indicado dentro das barras. Painel representativo: bregma -3,1 a -2,1mm, com área marcada correspondendo à BLA. * = $p < 0,05$.

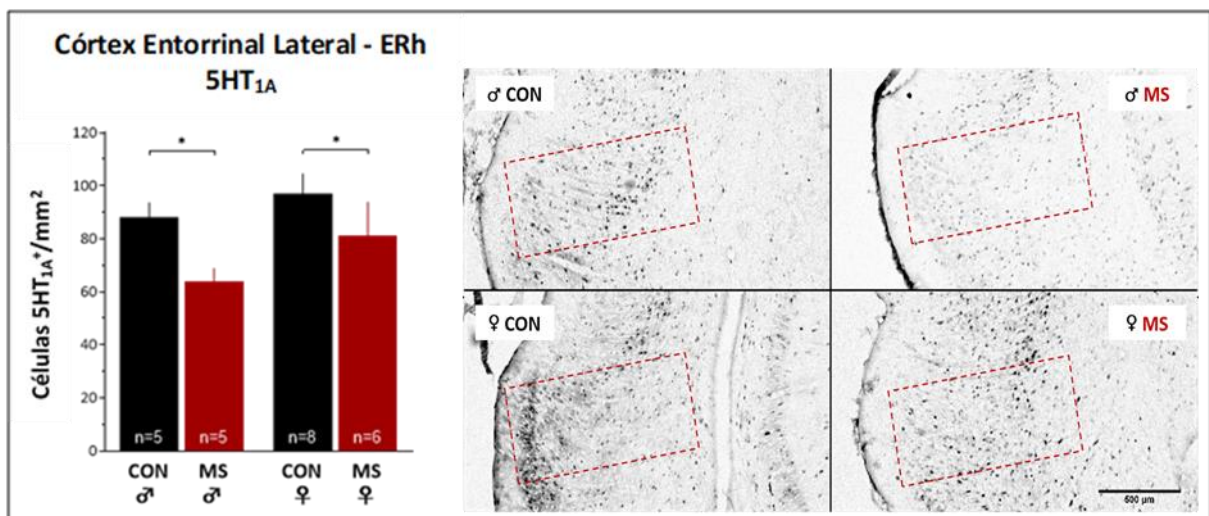


Gráfico 12. Redução da imunomarcção para 5HT_{1A} é observada no ERh em animais MS de ambos os sexos. ANOVA two way mostrou ausência de interação ($F_{3,20}=0,228$, $p=0,638$), efeito principal da MS ($F_{1,20}=5,238$, $p=0,033$) e nenhum efeito principal de Sexo ($F_{1,20}=2,230$, $p=0,151$). Dados são média±epm. Escala = 500µm. O tamanho amostral está indicado dentro das barras. Painel representativo: bregma -3,9 a -4,9mm, com área marcada correspondendo ao ERh. * = $p < 0,05$.

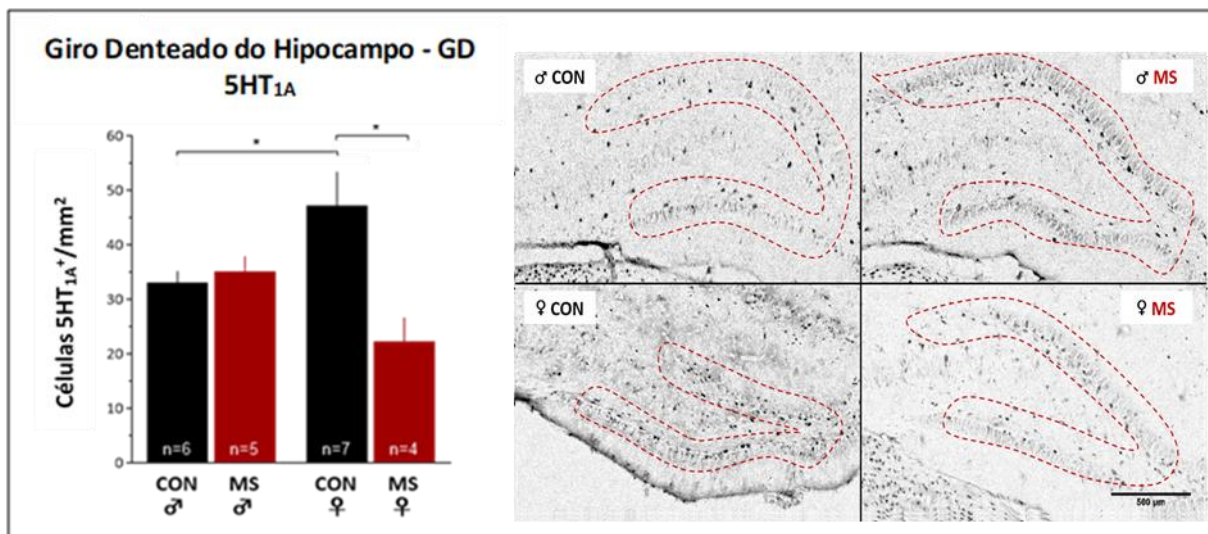


Gráfico 13. MS aumenta a quantidade de 5HT_{1A} no GD de forma independente do sexo. ANOVA two way mostrou interação ($F_{3,18}=9,850$, $p=0,006$), efeito principal da MS ($F_{1,18}=7,167$, $p=0,015$) e ausência de efeito principal de Sexo ($F_{1,18}=0,079$, $p=0,782$). Análise *post hoc* apontou diferenças significativas nas comparações ♂CON x ♀CON ($p=0,038$, Bonferroni) e ♀CON x ♀MS ($p=0,001$, Bonferroni). Dados são média±epm. Escala = 500μm. O tamanho amostral está indicado dentro das barras. Pannel representativo: bregma -4,0 a -2,4mm, com área marcada correspondendo ao GD. * = $p<0,05$.

4.2.3 Correlações nos efeitos da MS sobre o 5HT_{1A} e TREK-1 ocorrem no ERh e GD

Analisando a imunomarcção para 5HT_{1A} nas mesmas áreas cerebrais analisadas para TREK-1, é possível estabelecer possíveis correlações paralelas nas alterações induzidas pela MS em ambas as moléculas. Nenhuma correlação entre TREK-1 e 5HT_{1A} foi vista no circuito PL-BLA (**Gráficos 6 e 10**). Uma correlação foi observada para o ERh em machos: a MS reduziu a imunomarcção para 5HT_{1A} em machos MS (**Gráfico 12**), de forma similar a redução observada para TREK-1 (**Gráfico 8**). Finalmente, no GD uma correlação inversa foi observada nas fêmeas: a MS reduziu a imunomarcção para 5HT_{1A} (**Gráfico 13**) enquanto a aumentou para TREK-1 (**Gráfico 7**). No entanto, essas são correlações paralelas, pois nesse trabalho não foi feita uma análise estatística de correlação.

Diferença entre os sexos também foi vista para 5HT_{1A}, sendo que as fêmeas controles parecem ter uma maior quantidade desses receptores do que os machos controles. Um resumo das alterações encontradas nos experimentos de imunistoquímica é apresentado na **Figura 16**.

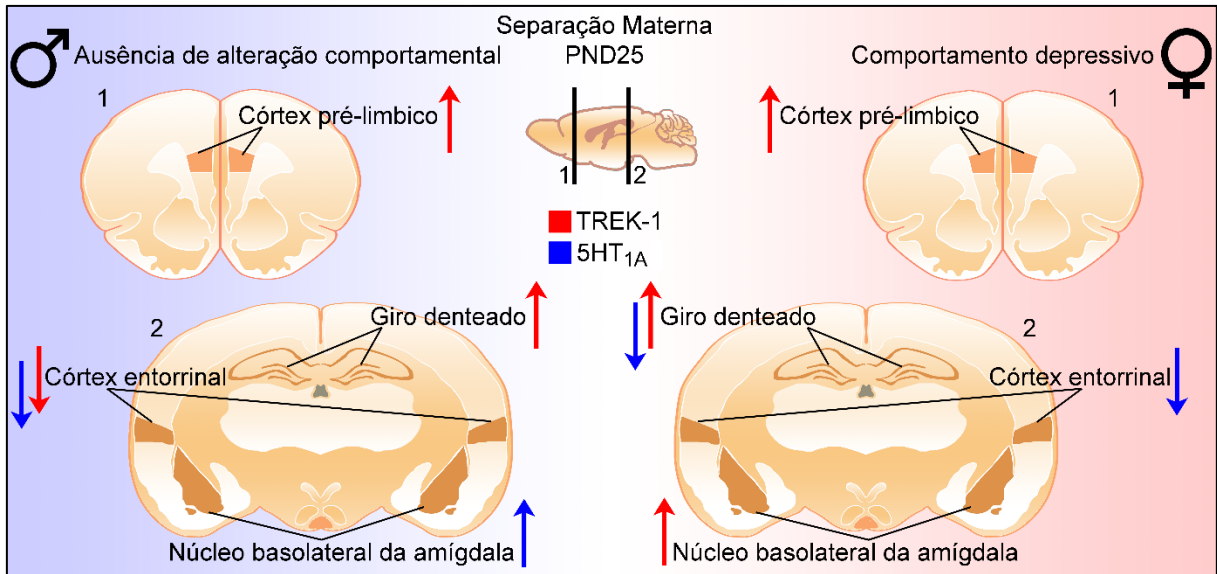


Figura 16. Síntese das alterações na imunomarcagem para 5HT_{1A} e TREK-1 induzidas pela MS na circuitaria de estresse. Nota-se que as alterações nas duas moléculas de interesse se correlacionam no ERh para os machos, e no GD para as fêmeas. O sentido das setas indica aumento (para cima) ou diminuição (para baixo). Crédito da figura: Guilherme S. V. Higa.

4.3 Western-blot para TREK-1 e 5HT_{1A}

O objetivo dos experimentos utilizando esta técnica foi verificar se as possíveis alterações encontradas em animais MS são mais ou menos específicas das áreas cerebrais que compõem a circuitaria envolvida na resposta de estresse, uma vez que a imunistoquímica permite uma análise mais específica das regiões cerebrais, enquanto o *western-blot* é mais abrangente. Aqui as regiões analisadas foram o hipocampo (total), o PFC (o qual inclui o PL entre outras regiões tais como o córtex cingulado, orbitofrontal e infralímbico) e a amígdala (incluindo todos os núcleos além da BLA). Os resultados não apontaram nenhuma diferença significativa entre os grupos (**Gráficos 14 a 19**).

O blot para 5HT_{1A} gerou bandas em ≈51kDa, sendo o tamanho previsto para essa molécula de 46kDa. Para TREK-1, as bandas foram registradas em ≈40kDa, sendo o peso molecular previsto para TREK-1 entre 45-56kDa. GAPDH foi observado com o peso esperado de 37kDa.

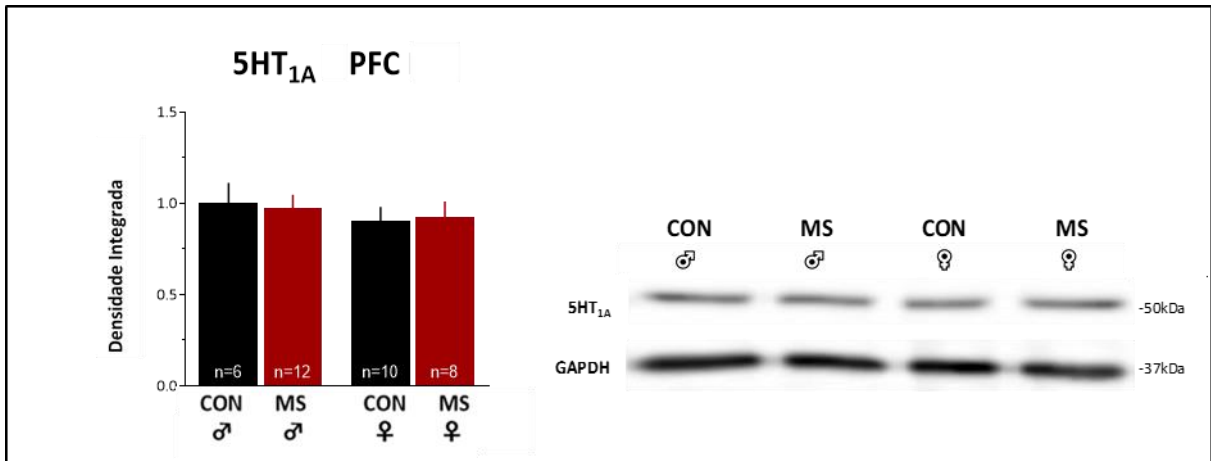


Gráfico 14. MS não altera a quantidade de 5-HT_{1A} no PFC, conforme avaliada por *western-blot*. ANOVA *two way* mostrou ausência de interação ($F_{3,32}=0,081$, $p=0,777$), ausência de significância para MS ($F_{1,32}=0,002$, $p=0,964$) e ausência de significância para Sexo ($F_{1,32}=0,657$, $p=0,424$). Dados normalizados pelo grupo ♂ CON. Dados são médias ± epm. O tamanho amostral está indicado dentro das barras.

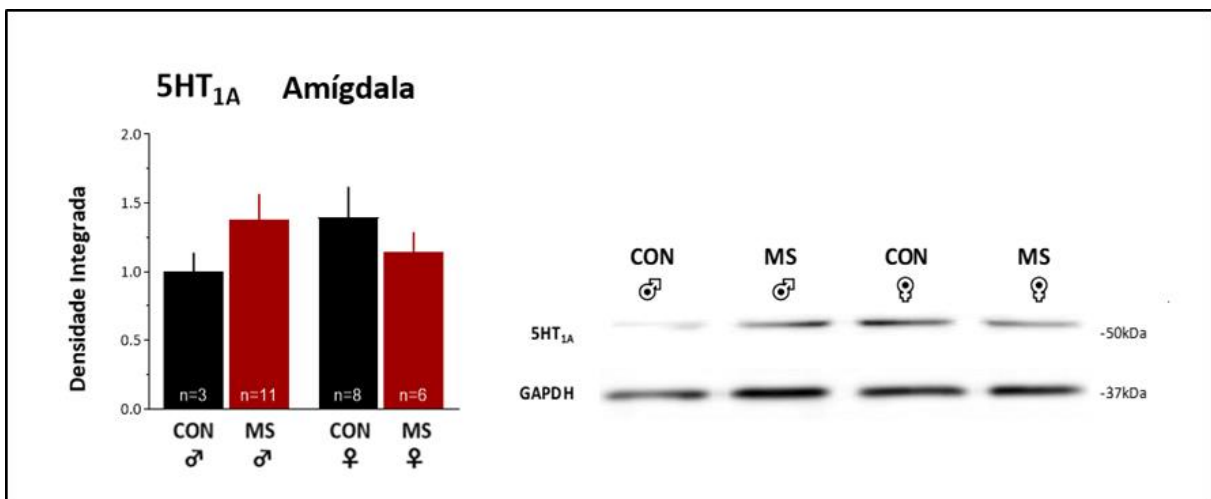


Gráfico 15. MS não altera a quantidade de 5-HT_{1A} na Amígdala, conforme avaliada por *western-blot*. ANOVA *two way* mostrou ausência de interação ($F_{3,24}=1,850$, $p=0,186$), ausência de significância para MS ($F_{1,24}=0,069$, $p=0,794$) e ausência de significância para Sexo ($F_{1,24}=0,114$, $p=0,739$). Dados normalizados pelo grupo ♂ CON. Dados são médias ± epm. O tamanho amostral está indicado dentro das barras.

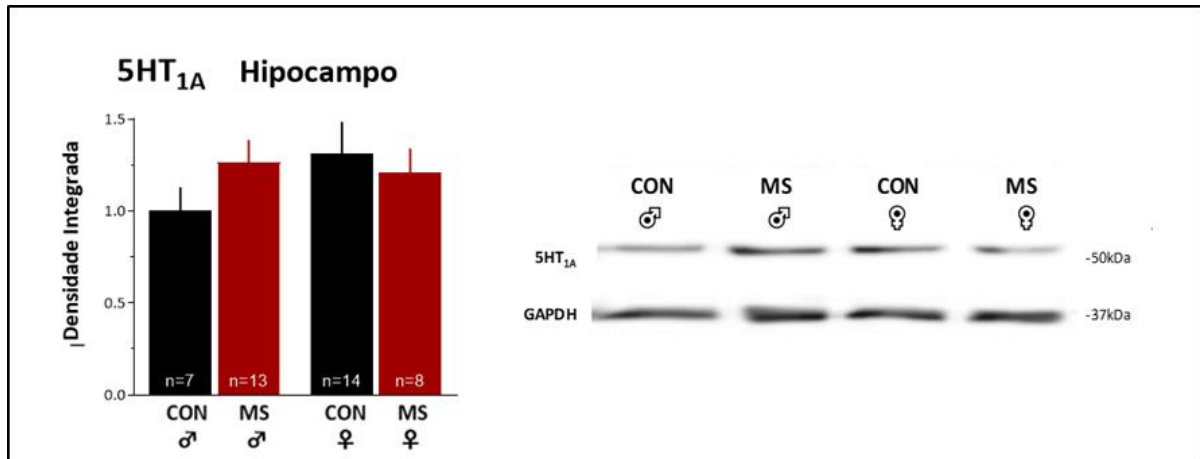


Gráfico 16. MS não altera a quantidade de 5-HT_{1A} no Hipocampo, conforme avaliada por *western-blot*. ANOVA *two way* mostrou ausência de interação ($F_{3,38}=1,303$, $p=0,261$), ausência de significância para MS ($F_{1,38}=0,249$, $p=0,621$) e ausência de significância para Sexo ($F_{1,38}=0,637$, $p=0,430$). Dados normalizados pelo grupo ♂ CON. Dados são médias \pm epm. O tamanho amostral está indicado dentro das barras.

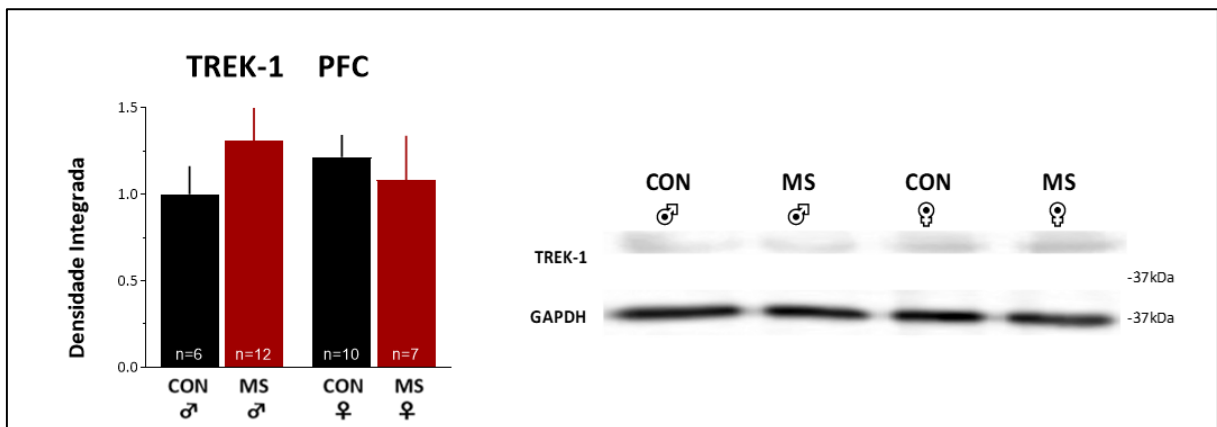


Gráfico 17. MS não altera a quantidade de TREK-1 no PFC, conforme avaliada por *western-blot*. ANOVA *two way* mostrou ausência de interação ($F_{3,31}=1,275$, $p=0,267$), ausência de significância para MS ($F_{1,31}=0,206$, $p=0,653$) e ausência de significância para Sexo ($F_{1,31}=0,001$, $p=0,978$). Dados normalizados pelo grupo ♂ CON. Dados são médias \pm epm. O tamanho amostral está indicado dentro das barras.

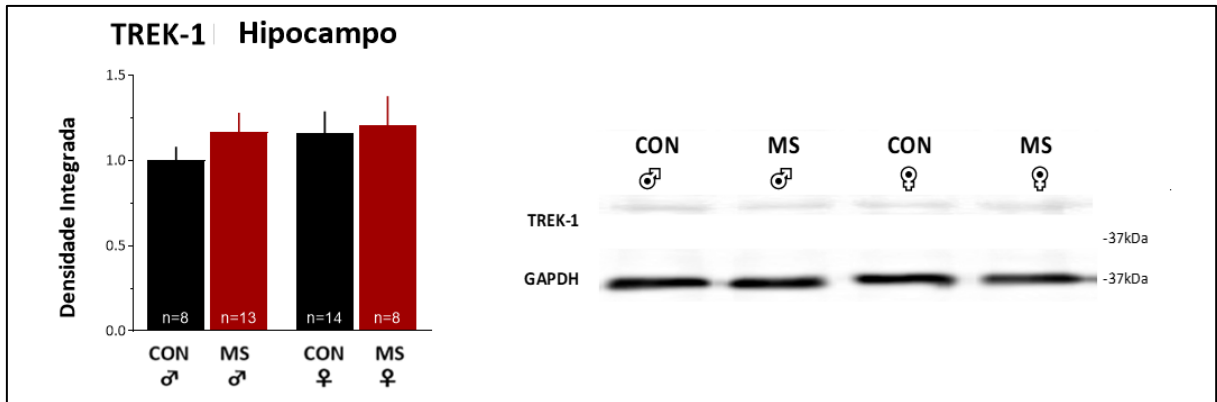


Gráfico 18. MS não altera a quantidade de TREK-1 no Hipocampo, conforme avaliada por *western-blot*. ANOVA *two way* mostrou ausência de interação ($F_{3,39}=0,203$, $p=0,655$), ausência de significância para MS ($F_{1,39}=0,640$, $p=0,429$) e ausência de significância para Sexo ($F_{1,39}=0,543$, $p=0,466$). Dados normalizados pelo grupo CON. Dados são médias \pm epm. O tamanho amostral está indicado dentro das barras.

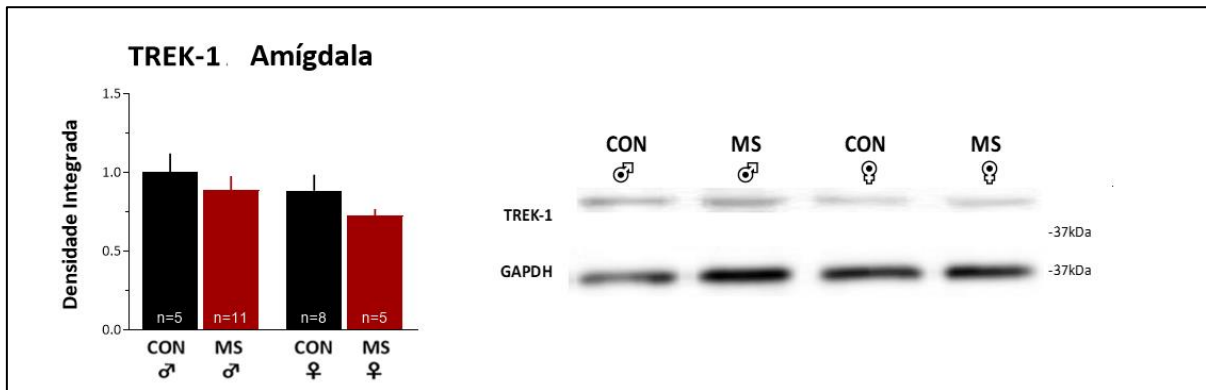


Gráfico 19. MS não altera a quantidade de TREK-1 na Amígdala, conforme avaliada por *western-blot*. ANOVA *two way* mostrou ausência de interação ($F_{3,25}=0,045$, $p=0,834$), ausência de significância para MS ($F_{1,25}=1,656$, $p=0,210$) e ausência de significância para Sexo ($F_{1,25}=1,731$, $p=0,200$). Dados normalizados pelo grupo CON. Dados são médias \pm epm. O tamanho amostral está indicado dentro das barras.

4.4 Estudo eletrofisiológico da plasticidade sináptica no córtex pré-límbico

O PL foi selecionado como a região de escolha para o estudo da plasticidade sináptica nesse trabalho, uma vez que se configura como uma região chave na regulação de várias circuitarias envolvidas na resposta de estresse. Os resultados aqui apresentados sempre se referem a plasticidade sináptica registrada a partir de neurônios piramidais na camada V do PL, de ratos infantis, conforme descrito na **seção 3.7**. Foram incluídos nos grupos experimentais CON e MS animais de ambos os sexos, o que é comum em trabalhos que empregam a eletrofisiologia em *brain slices* como técnica.

Iniciou-se o estudo da modulação serotoninérgica da plasticidade sináptica no PL com experimentos aplicando 5-HT e um agonista 5HT_{1A}. Na sequência, foram feitos experimentos bloqueando TREK-1, e verificando se ocorria alguma interação entre TREK-1 e 5HT_{1A}. E por fim, foi avaliado também o efeito da aplicação de *theta burst* no PL, considerando possíveis interações com TREK-1 e 5HT_{1A}.

4.4.1 5-HT é suficiente para induzir LTD no PL

A aplicação de 5-HT a 50 μ M promove uma marcante LTD no PL, com um rápido decaimento da resposta sináptica logo após a adição da droga na preparação (**Gráficos 20A e B**). Esse efeito foi bastante consistente, com poucas células da amostra não apresentando LTD (**Gráficos 20C e E**). Experimentos de pulso pareado revelaram um componente pré-sináptico envolvido nessa resposta (**Gráfico 20D**), onde células de animais CON e MS apresentaram uma facilitação pré-sináptica evidenciada pelo aumento significativo na razão entre o quarto pulso antes e após a aplicação de 5-HT, indicando que a serotonina poderia estar modulando a liberação de neurotransmissores nas células piramidais em ordem a promover a LTD observada. Não houve diferença significativa entre animais CON e MS.

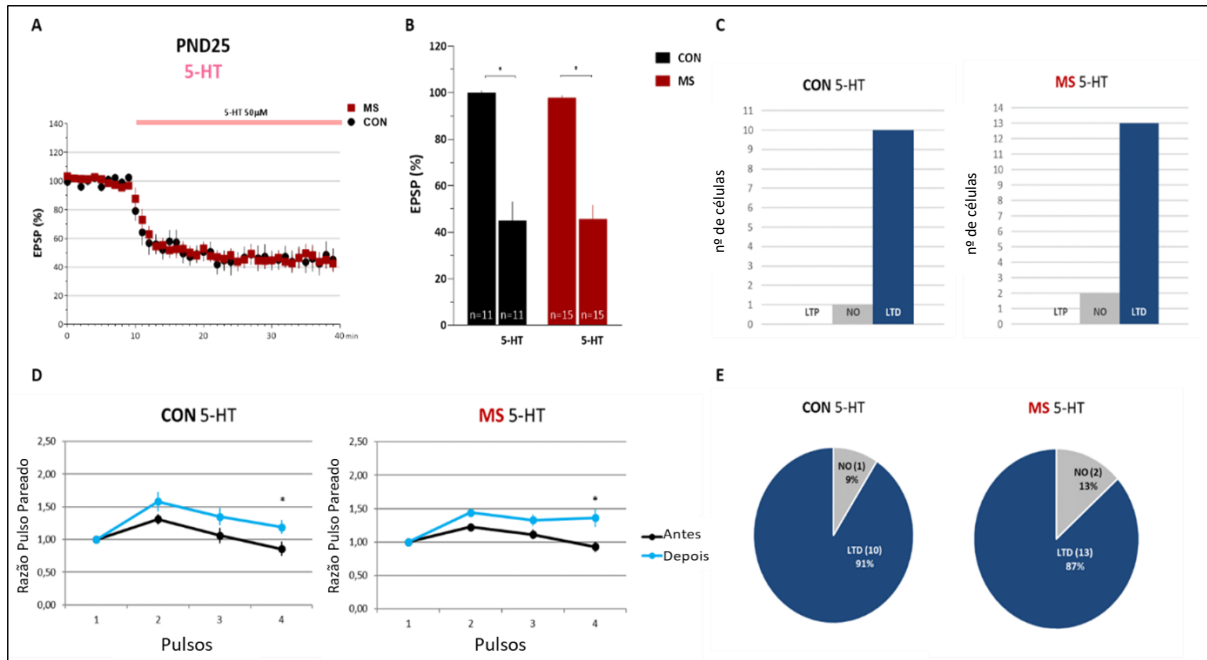


Gráfico 20. 5-HT induz uma marcante LTD no PL com um componente pré-sináptico. A) Curva temporal das mudanças no EPSP após a aplicação de 5-HT a 50µM no banho. **B)** Comparação da média dos últimos 5min da *baseline* com a média dos últimos 5min de registro após a aplicação da droga. RMANOVA para interação: $F_{1,24} = 0,086$, $p=0,772$, e para efeito da 5-HT: $F_{1,22} = 123,869$, $p<0,0005$. **C e E)** Frequência do tipo de plasticidade na amostra de células analisadas. Teste Exato de Fisher: $\chi^2(2) = 0,112$, $p=1,000$. **D)** Pulso pareado para o efeito da 5-HT. RMANOVA mostrou que não há interação para o grupo CON ($F_{3,27} = 2,990$, $p=0,095$), mas o efeito principal da 5-HT é significativo ($F_{1,27} = 15,588$, $p=0,003$). Para o grupo MS, há interação ($F_{3,39} = 6,030$, $p=0,002$) e efeito principal da 5-HT ($F_{1,39} = 9,607$, $p=0,008$), com análise *post-hoc* detectando diferenças significativas entre a *baseline* e após aplicação de 5-HT para o quarto pulso ($p=0,008$, Bonferroni). Dados foram coletados de 8 animais CON de 4 ninhadas diferentes (11 células, 7 ♂ e 4 ♀) e 9 animais MS de 8 ninhadas diferentes (15 células, 6 ♂ e 9 ♀), no PND24-26. Dados são média±epm. O tamanho amostral está indicado dentro das barras, sendo n = número de células registradas. * = $p<0,05$. EPSP = Potencial Excitatório Pós-Sináptico. NO = célula que não expressou plasticidade. LTP = Potenciação de Longo Prazo. LTD = Depressão de Longo Prazo.

4.4.2 Sinalização por 5HT_{1A} ou bloqueio de TREK-1 induz LTD no PL

A aplicação de 1µM de 8-OH-DPAT, uma droga considerada um agonista seletivo para 5HT_{1A}, foi suficiente para induzir LTD em ambos animais CON e MS (**Gráfico 21**). A LTD induzida pelo 5HT_{1A} tem um decurso temporal diferente daquela induzida pela 5-HT, e não alcança a mesma magnitude (reduz a resposta a cerca de 60%, enquanto a 5-HT reduz para 40%). Os resultados do pulso pareado demonstraram ausência de um componente pré-sináptico para esta LTD (**Gráfico 21D**), indicando que a LTD induzida pela 5-HT no PL possa estar atuando em múltiplos receptores.

Bloqueando os canais TREK-1 pela aplicação de 0,1µM de spadin também induziu uma LTD significativa (**Gráficos 22A e B**), mas menor que aquela induzida pela 5-HT ou 5HT_{1A}. Resultados de pulso pareado também revelaram um componente pré-sináptico para essa LTD

induzida pela spadin (**Gráfico 22D**), que interessadamente apareceu apenas nos animais MS. A avaliação da população de células utilizadas na amostra para esse experimento dá a entender que a MS faz com que a inibição de TREK-1 seja capaz de fazer com que células que normalmente não apresentam plasticidade sináptica passem a expressar LTD (**Gráficos 22C e E**). No entanto, o Teste Exato de Fisher não apontou diferença significativa entre as populações de células de animais CON e MS.

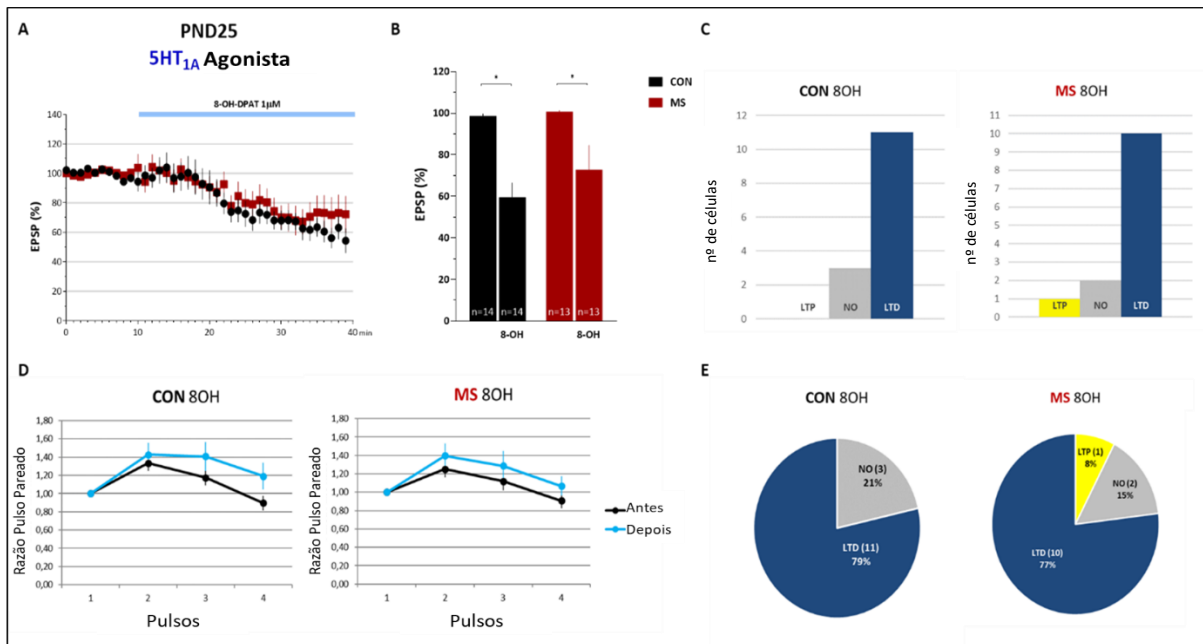


Gráfico 21. Ativação de 5HT_{1A} induz LTD no PL, e a MS não altera esse fenômeno. **A)** Curva temporal de mudanças no EPSP após a aplicação de 8-OH-DPAT a 1µM no banho. **B)** Comparação da média dos últimos 5min da *baseline* com a média dos últimos 5min de registro após a aplicação da droga. RMANOVA para interação: $F_{1,25} = 0,692$, $p=0,414$, e para efeito principal do 8-OH-DPAT: $F_{1,25} = 24,870$, $p<0,0005$. **C e E)** Frequência do tipo de plasticidade em todas as células analisadas. Teste Exato de Fisher: $\chi^2(2) = 1,218$, $p=1,000$. **D)** Pulso pareado para o efeito da ativação de 5HT_{1A}. RMANOVA para interação no grupo CON: $F_{3,42} = 1,709$, $p=0,180$, e para o grupo MS: $F_{3,30} = 0,062$, $p=0,559$. Dados foram coletados de 7 animais CON de 3 ninhadas diferentes (14 células, 7♂ e 7♀) e 6 animais MS de 3 ninhadas diferentes (13 células, 7♂ e 6♀). Dados são média±epm. Tamanho amostral está indicado dentro das barras, sendo n = número de células registradas. * = $p<0,05$. 8OH = 8-OH-DPAT, droga agonista 5HT_{1A}. EPSP = Potencial Excitatório Pós-Sináptico. NO = célula que não expressou plasticidade. LTP = Potenciação de Longo Prazo. LTD = Depressão de Longo Prazo.

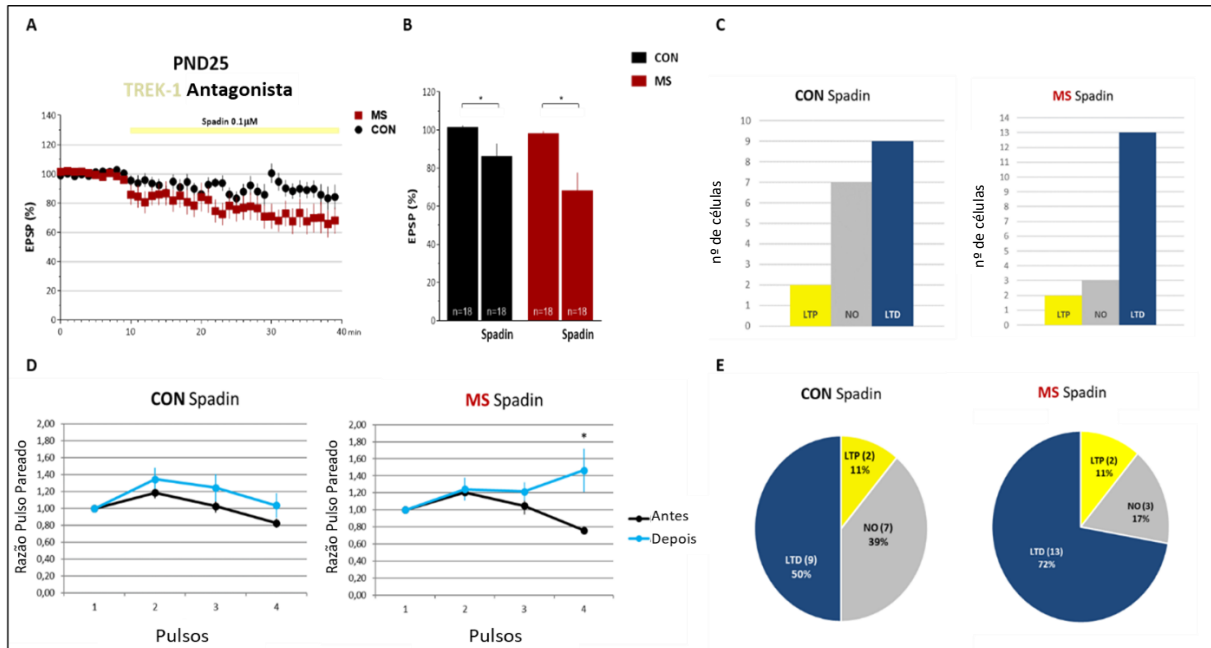


Gráfico 22. Inibição de TREK-1 induz LTD no PL, e animais MS apresentam um componente pré-sináptico para esse efeito. **A)** Curva temporal de mudanças no EPSP após a aplicação de spadin a 0,1µM no banho. **B)** Comparação dos últimos 5min da *baseline* com os últimos 5min de registro após a aplicação de spadin. RMANOVA mostra ausência de interação ($F_{1,34} = 1,934, p=0,173$), e efeito principal da spadin significativo ($F_{1,34} = 17,787, p<0,0005$). **C e E)** Frequência do tipo de plasticidade na amostra de células analisada. Teste Exato de Fisher não aponta diferenças significativas entre CON e MS ($\chi^2(2) = 2,365, p=0,337$). **D)** Pulso pareado mostrando um componente pré-sináptico para a resposta de LTD induzida pela spadin nos animais MS. RMANOVA indica interação para MS ($F_{3,30} = 6,840, p=0,009$), com teste Bonferroni *post-hoc* mostrando diferenças entre o quarto pulso para o grupo MS ($p=0,022$), enquanto o grupo CON não apresenta diferenças estatisticamente significativas (interação para CON: $F_{3,51} = 1,161, p=0,326$). Dados foram coletados de 14 animais CON de 8 ninhadas diferentes (18 células, 15 ♂ e 3 ♀) e 8 animais MS de 4 ninhadas diferentes (18 células, 6 ♂ e 12 ♀). Dados são média±epm. O tamanho amostral está indicado dentro das barras, sendo n = número de células registradas. * = $p<0,05$. EPSP = Potencial Excitatório Pós-Sináptico. NO = célula que não expressou plasticidade. LTP = Potenciação de Longo Prazo. LTD = Depressão de Longo Prazo.

4.4.3 A LTD induzida pela ativação de 5HT_{1A} é prevenida pelo bloqueio de TREK-1

A inibição de TREK-1 pela aplicação prévia de spadin por pelo menos 30min antes do início do registro resultou na abolição da LTD induzida pelo agonista 5HT_{1A} (**Gráficos 23A e B**). Análise de população mostrou que aproximadamente 35% das células expressaram LTD (**Gráfico 23D**), comparado a aproximadamente 80% quando somente o agonista 5HT_{1A} foi aplicado (**Gráfico 21E**). Esse resultado demonstrou que a LTD induzida por 5HT_{1A} no PL envolve a ativação de canais de potássio (não excluindo a possibilidade de outros canais de potássio além de TREK-1 estarem envolvidos). Nesse experimento não foram incluídos animais MS, pois o objetivo era investigar se havia uma interação entre 5HT_{1A} e TREK-1 ocorrendo fisiologicamente nos fenômenos de plasticidade sináptica.

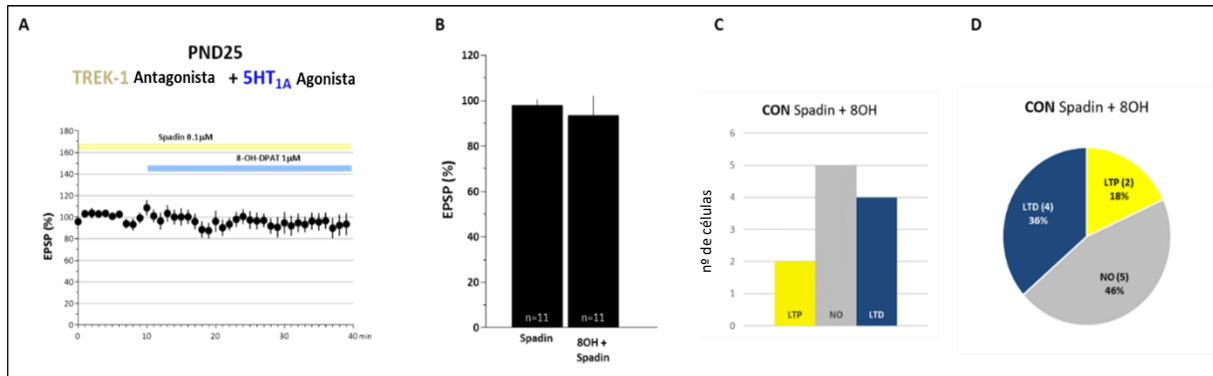


Gráfico 23. A inibição de TREK-1 impede a expressão de LTD pela ativação de 5HT_{1A}. **A)** Curva temporal de mudanças no EPSP após a aplicação de 8-OH-DPAT a 1 μM, na presença contínua de spadin a 0,1 μM no banho. **B)** Comparação da média dos últimos 5min da *baseline* com os últimos 5min após a aplicação de 8OH. Teste *t* de Student mostra nenhuma diferença estatisticamente significativa, com $t(10) = 0,587$, $p=0,570$. **C e D)** Frequência do tipo de plasticidade nas células da amostra analisada. Dados foram coletados de 7 animais CON de 4 ninhadas diferentes (11 células, 7 ♂ e 4 ♀). Dados são média ± epm. O tamanho amostral está indicado dentro das barras, sendo *n* = número de células registradas. EPSP = Potencial Excitatório Pós-Sináptico. NO = célula que não expressou plasticidade. LTP = Potenciação de Longo Prazo. LTD = Depressão de Longo Prazo. 8OH = 8-OH-DPAT, uma droga agonista 5HT_{1A}.

4.4.4 *Theta burst* elicit plasticidade bidirecional no PL

Dando sequência ao estudo eletrofisiológico, foi investigado se a aplicação de estímulo *theta burst*, uma frequência neural que ocorre fisiologicamente *in vivo* durante tarefas cognitivas, é capaz de induzir plasticidade nos neurônios piramidais da camada V do PL. O protocolo de estimulação utilizado é descrito na **seção 3.7.4**. Em um primeiro olhar, nenhuma plasticidade foi evocada por *theta burst* no PL (**Gráficos 24A e B**). Contudo, olhando o resultado da análise de população, foi observado que *theta burst* de fato induziu plasticidade no PL, mas de forma bidirecional, e assim a média do grupo resultou em nenhuma plasticidade (**Gráficos 24C e E**). O efeito é pós-sináptico, como pode se ver nos gráficos de pulso pareado desse experimento, onde não houve diferenças significativas (**Gráfico 24D**). Animais MS não foram diferentes do grupo CON.

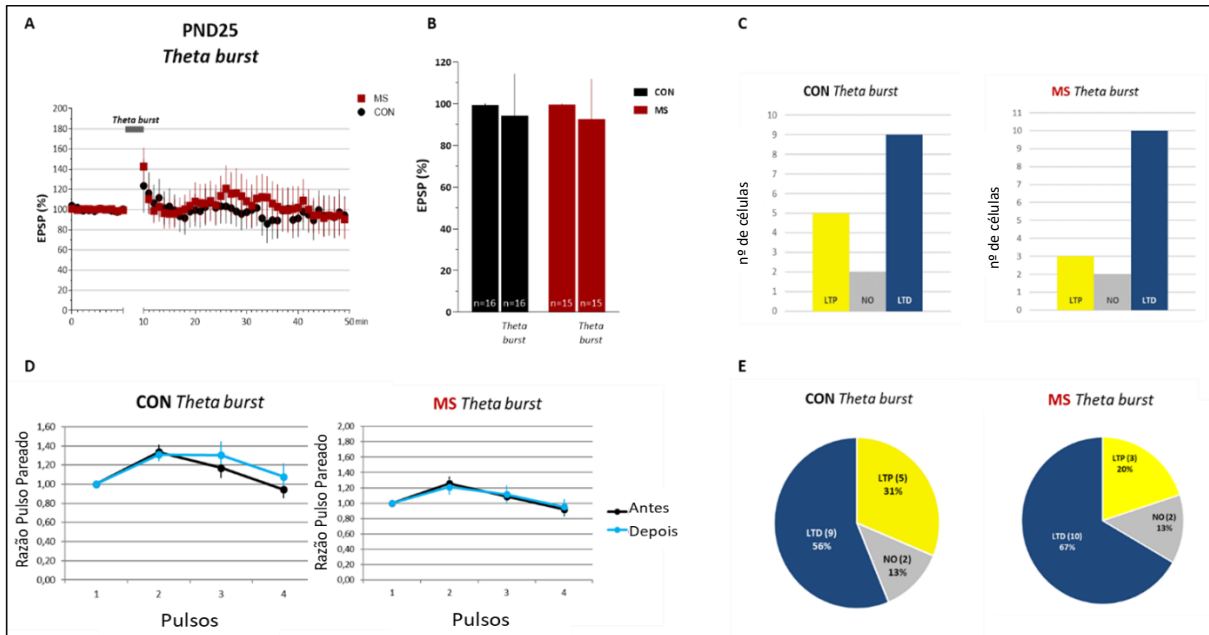


Gráfico 24. *Theta burst* pode induzir tanto LTP quanto LTD no PL, através de mecanismos pós-sinápticos. **A**) Curva temporal das mudanças no EPSP após a aplicação de estímulo *theta burst* na camada I do PL. **B**) Comparação dos últimos 5min da *baseline* com os últimos 5min de registro após a aplicação de *theta burst*. RMANOVA para interação: $F_{1,29} = 0,004$, $p=0,947$. **C e E**) Frequência do tipo de plasticidade na amostra de células analisada. Teste Exato de Fisher: $\chi^2(2) = 0,663$, $p=0,871$. **D**) Pulso pareado para o efeito da estimulação *theta burst*. RMANOVA aponta ausência de interação no grupo CON ($F_{3,45} = 0,683$, $p=0,567$) e no grupo MS ($F_{3,42} = 0,312$, $p=0,817$). Dados foram coletados de 11 animais CON de 6 ninhadas diferentes (16 células, 9 ♂ e 7 ♀) e 9 animais MS de 8 ninhadas diferentes (15 células, 4 ♂ e 11 ♀). Dados são média±epm. Tamanho amostral é indicado dentro das barras, sendo n = número de células registradas. * = $p < 0,05$. EPSP = Potencial Excitatório Pós-Sináptico. NO = célula que não expressou plasticidade. LTP = Potenciação de Longo Prazo. LTD = Depressão de Longo Prazo.

4.4.5 A 5-HT não tem impacto na plasticidade induzida por *theta burst*

Nesse experimento, as fatias de cérebro foram incubadas com 5-HT a 50 μ M por pelo menos 30min antes do início do experimento. Após obtenção do registro de *baseline* foi então aplicado o estímulo *theta burst*, sendo assim possível verificar se a presença de 5-HT no banho modula de alguma forma a plasticidade induzida por *theta burst* no PL. O **Gráfico 25** evidencia a ausência de qualquer efeito da 5-HT sobre a plasticidade induzida por *theta burst*. Nota-se nos **Gráficos 25C e E** que o padrão de indução bidirecional de plasticidade por *theta burst* permanece semelhante ao observado na ausência de 5-HT (**Gráfico 24C**). Animais MS não foram diferentes de animais CON.

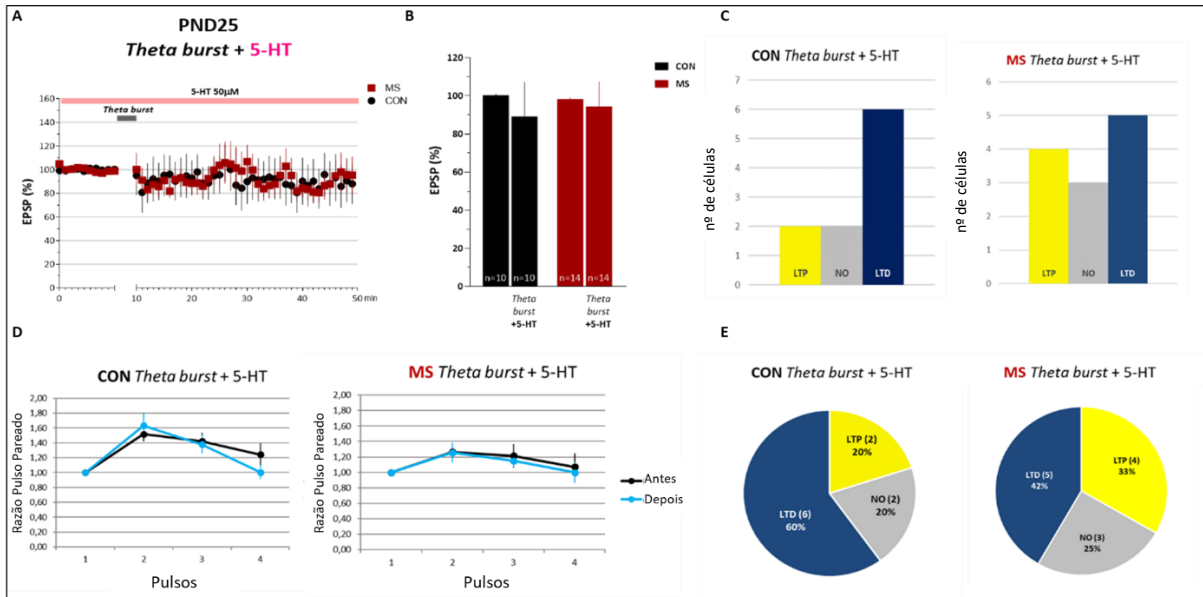


Gráfico 25. 5-HT não altera a plasticidade induzida por *theta burst* no PL. **A)** Curva temporal das mudanças no EPSP após a aplicação de estímulo *theta burst* na camada I do PL, na presença contínua de 5-HT a 50µM no banho. **B)** Comparação dos últimos 5min da *baseline* com os últimos 5min de registro após a aplicação de *theta burst*. RMANOVA para interação: $F_{1,22} = 0,105$, $p=0,749$, e para efeito do *theta burst*: $F_{1,22} = 0,477$, $p=0,497$. **C e E)** Frequência do tipo de plasticidade na amostra de células analisada. Teste Exato de Fisher: $\chi^2(2) = 0,872$, $p=0,857$. **D)** Pulso pareado para o efeito do *theta burst*. RMANOVA para interação no grupo CON: $F_{3,27} = 1,362$, $p=0,281$, e no grupo MS: $F_{3,39} = 0,149$, $p=0,930$. Dados foram coletados de 7 animais CON de 4 ninhadas diferentes (10 células, 5 ♂ e 5 ♀) e 9 animais MS de 8 ninhadas diferentes (14 células, 5 ♂ e 9 ♀), no PND24-26. Dados são média±epm. O tamanho amostral está indicado dentro das barras. * = $p<0,05$. EPSP = Potencial Excitatório Pós-Sináptico. NO = célula que não expressou plasticidade. LTP = Potenciação de Longo Prazo. LTD = Depressão de Longo Prazo. 5-HT = serotonina.

4.4.6 Sinalização via 5HT_{1A} não modula a plasticidade sináptica induzida por *theta burst*

Sob ativação constante de 5HT_{1A}, obtida pela aplicação de 1µM de 8-OH-DPAT por pelo menos 30min antes do início do experimento, *theta burst* induziu a mesma plasticidade bidirecional no PL, sem mudanças significativas entre os grupos CON e MS (**Gráfico 26**), de forma semelhante ao observado quando da aplicação constante de 5-HT (**Gráfico 25**), indicando que a ausência de modulação serotoninérgica sobre o *theta burst* não resulta de uma ação antagonista de diferentes tipos de receptores serotoninérgicos no PL.

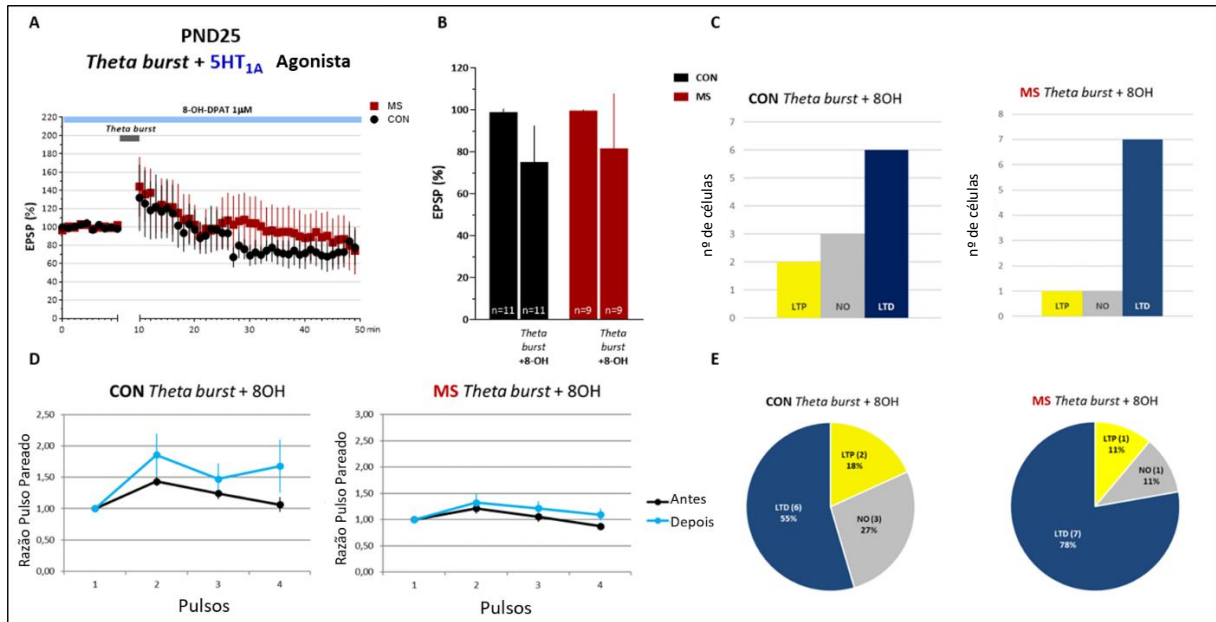


Gráfico 26. 5HT_{1A} não modula a plasticidade induzida por *theta burst*. **A)** Curva temporal das mudanças no EPSP após a aplicação de estímulo *theta burst* na camada I do PL na presença contínua de 8-OH-DPAT a 1µM no banho. **B)** Comparação dos últimos 5min da *baseline* com os últimos 5min de registro após a aplicação de *theta burst*. RMANOVA para interação: $F_{1,18} = 0,036$, $p=0,853$, e para efeito do *theta burst*: $F_{1,18} = 1,867$, $p=0,189$. **C e E)** Frequência do tipo de plasticidade na amostra de células analisada. Teste Exato de Fisher: $\chi^2(2) = 1,260$, $p=0,678$. **D)** Pulso pareado para o efeito do *theta burst*. Nenhuma diferença estatisticamente significativa foi observada. RMANOVA para interação no grupo CON: $F_{3,30} = 0,946$, $p=0,431$, e para o grupo MS: $F_{3,24} = 0,720$, $p=0,490$. Dados foram coletados de 9 animais CON de 3 ninhadas diferentes (11 células, 5 ♂ e 6 ♀) e 5 animais MS de 3 ninhadas diferentes (9 células, 4 ♂ e 5 ♀). Dados são média±epm. O tamanho amostral está indicado dentro das barras, sendo n = número de células registradas. * = $p<0,05$. EPSP = Potencial Excitatório Pós-Sináptico. NO = célula que não expressou plasticidade. LTP = Potenciação de Longo Prazo. LTD = Depressão de Longo Prazo. 8OH = 8-OH-DPAT, droga agonista 5HT_{1A}.

4.4.7 A MS altera a plasticidade induzida por *theta burst* quando TREK-1 é bloqueado

A aplicação de *theta burst* após incubação da fatia com spadin a 0,1µM por pelo menos 30min antes do início do experimento resultou em LTD apenas nos animais MS (**Gráficos 27A e B**). Dados do pulso pareado mostraram que não há componente pré-sináptico para esse efeito (**Gráfico 5D**), contrastando com a LTD induzida pela spadin que apresentou esse componente (**Gráfico 22D**). Esse resultado sugere que o estresse pós-natal resulta em alterações complexas na função de TREK-1 no PL, possivelmente tendo um impacto maior na função e/ou expressão desses canais em terminais pré-sinápticos, alterando a plasticidade sináptica em situações específicas como quando da ocorrência de oscilações *theta burst* nessa região cortical.

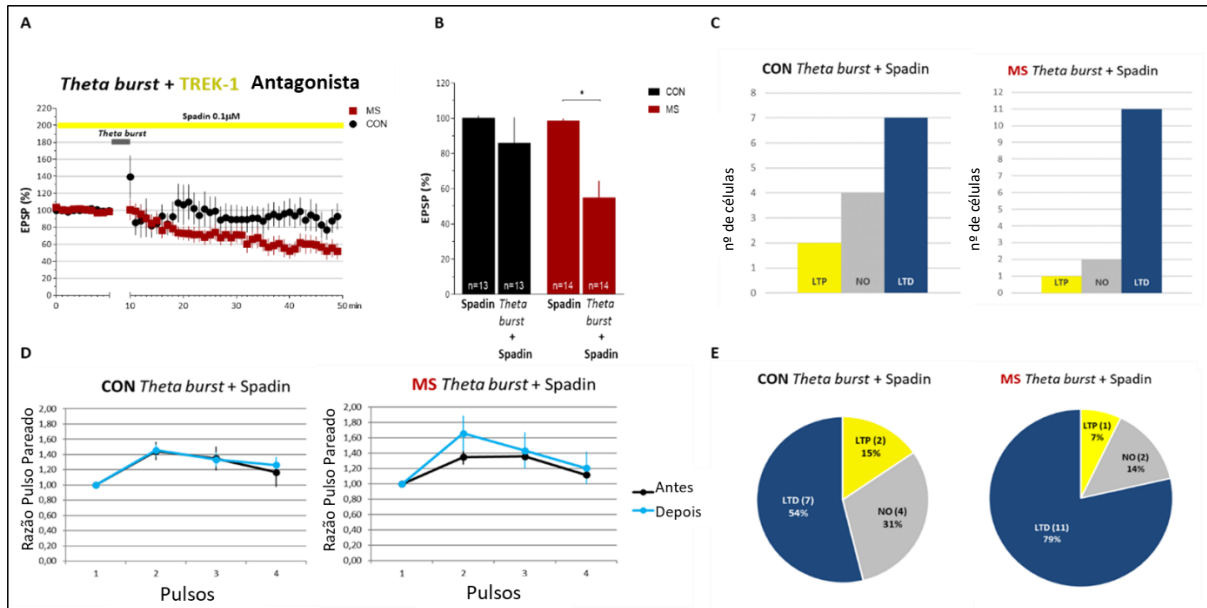


Gráfico 27. A MS faz com que a inibição de TREK-1 direcione a plasticidade induzida por *theta burst* para LTD no PL. A) Curva temporal das mudanças no EPSP após a aplicação de estímulo *theta burst* na camada I do PL na presença contínua de spadin a 0,1µM no banho. B) Comparação dos últimos 5min da *baseline* com os últimos 5min de registro após a aplicação de *theta burst*. RMANOVA não apontou interação ($F_{1,25} = 2,985, p=0,096$), mas há efeito principal significativo para *theta burst* ($F_{1,25} = 11,279, p=0,003$), com testes Bonferroni *post hoc* detectando diferença significativa apenas para animais MS ($p=0,001$). C e E) Frequência do tipo de plasticidade na amostra de células analisada, indicando nenhuma diferença entre animais MS e CON pelo Teste Exato de Fisher: $\chi^2(2) = 1,894, p=0,418$. D) Pulso pareado evidenciando ausência de componentes pré-sinápticos na resposta. RMANOVA para interação para o grupo CON: $F_{3,48} = 0,338, p=0,681$; e interação para o grupo MS: $F_{3,36} = 0,973, p=0,416$. Dados foram coletados de 9 animais CON de 6 ninhadas diferentes (13 células, 9♂ e 4♀), e 7 animais MS de 3 ninhadas diferentes (14 células, 6♂ e 8♀). Dados são média±epm. Tamanho amostral indicado dentro das barras, sendo n = número de células registradas. * = $p<0,05$. EPSP = Potencial Excitatório Pós-Sináptico. NO = célula que não expressou plasticidade. LTP = Potenciação de Longo Prazo. LTD = Depressão de Longo Prazo.

4.4.8 A plasticidade sináptica no PL é influenciada por TREK-1 e 5HT_{1A} através de múltiplos mecanismos

Em conjunto, os resultados obtidos nesse estudo eletrofisiológico evidenciam que neurônios piramidais do PL tem tendência a expressar LTD quando sob ação da 5-HT ou de alterações na função e/ou quantidade de canais TREK-1. O receptor 5HT_{1A} está envolvido nessa modulação, sendo a sua ativação suficiente para promover LTD no PL. A MS aparentemente aumenta a quantidade ou função de TREK-1 em terminais pré-sinápticos, de forma que a LTD induzida pelo bloqueio de TREK-1 começa a apresentar um componente pré-sináptico. A **Figura 13** sumariza os resultados obtidos do estudo da plasticidade sináptica no PL em relação ao efeito da aplicação da 5-HT, da spadin (bloqueador de TREK-1) e do 8-OH-DPAT (agonista 5HT_{1A}).

O *theta burst* induz plasticidade sináptica de forma bidirecional no PL, sendo que a MS torna possível que o bloqueio de TREK-1 direcione a plasticidade induzida por *theta burst* para a expressão de LTD. A **Figura 14** ilustra os efeitos do *theta burst* na plasticidade sináptica no PL em diferentes condições experimentais.

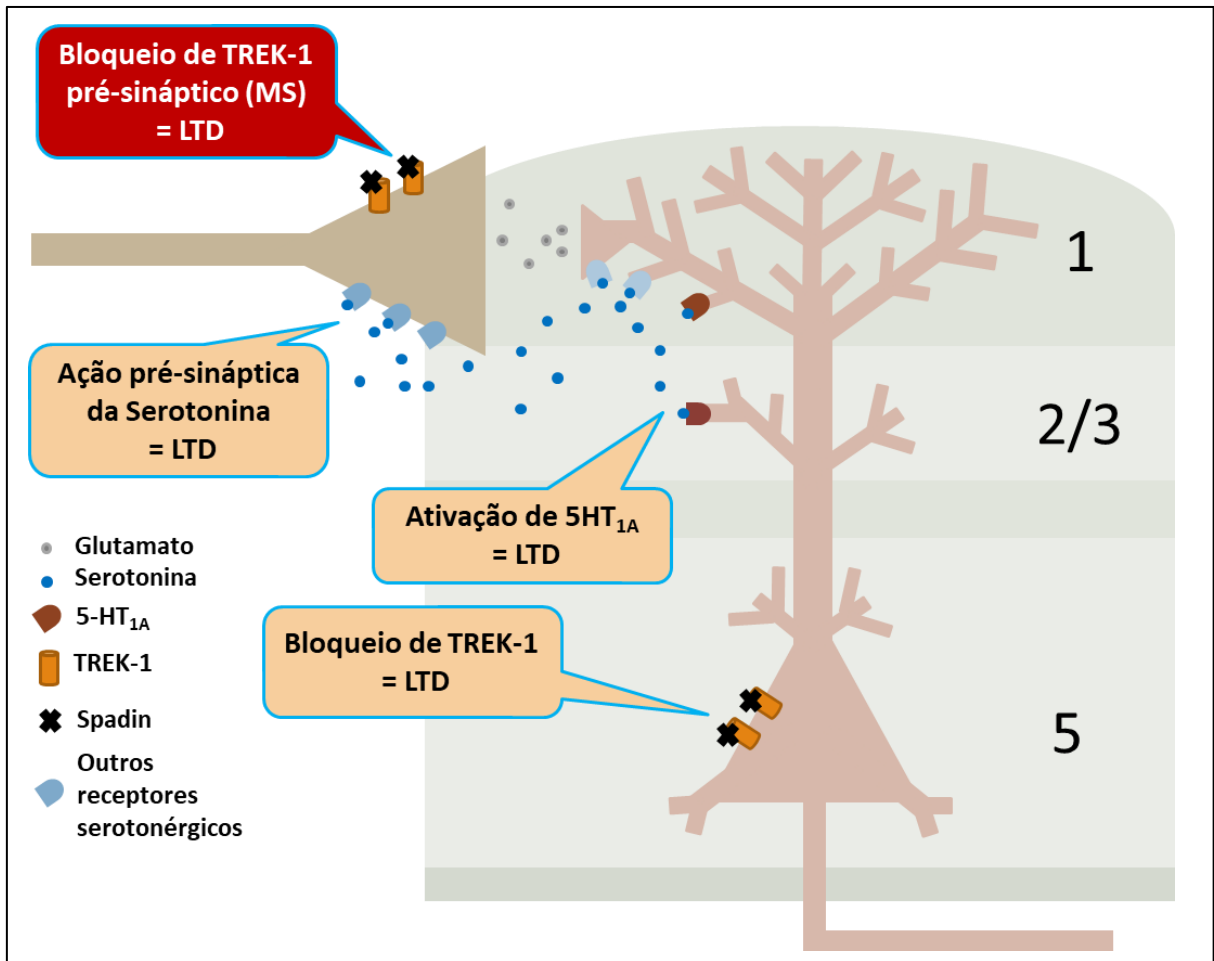


Figura 17. Sumário das alterações na plasticidade sináptica induzidas pela modulação serotoninérgica ou de TREK-1. A 5-HT deve atuar tanto em receptores pré como pós-sinápticos para induzir LTD, ao passo que a ativação de receptores 5HT_{1A} induz uma LTD por mecanismos pós-sinápticos. O bloqueio de TREK-1 também induz LTD, porém a ação pré-sináptica desses canais ocorre somente em animais MS, onde eles podem estar alterando a liberação de glutamato pelos terminais pré-sinápticos de modo a induzir LTD.

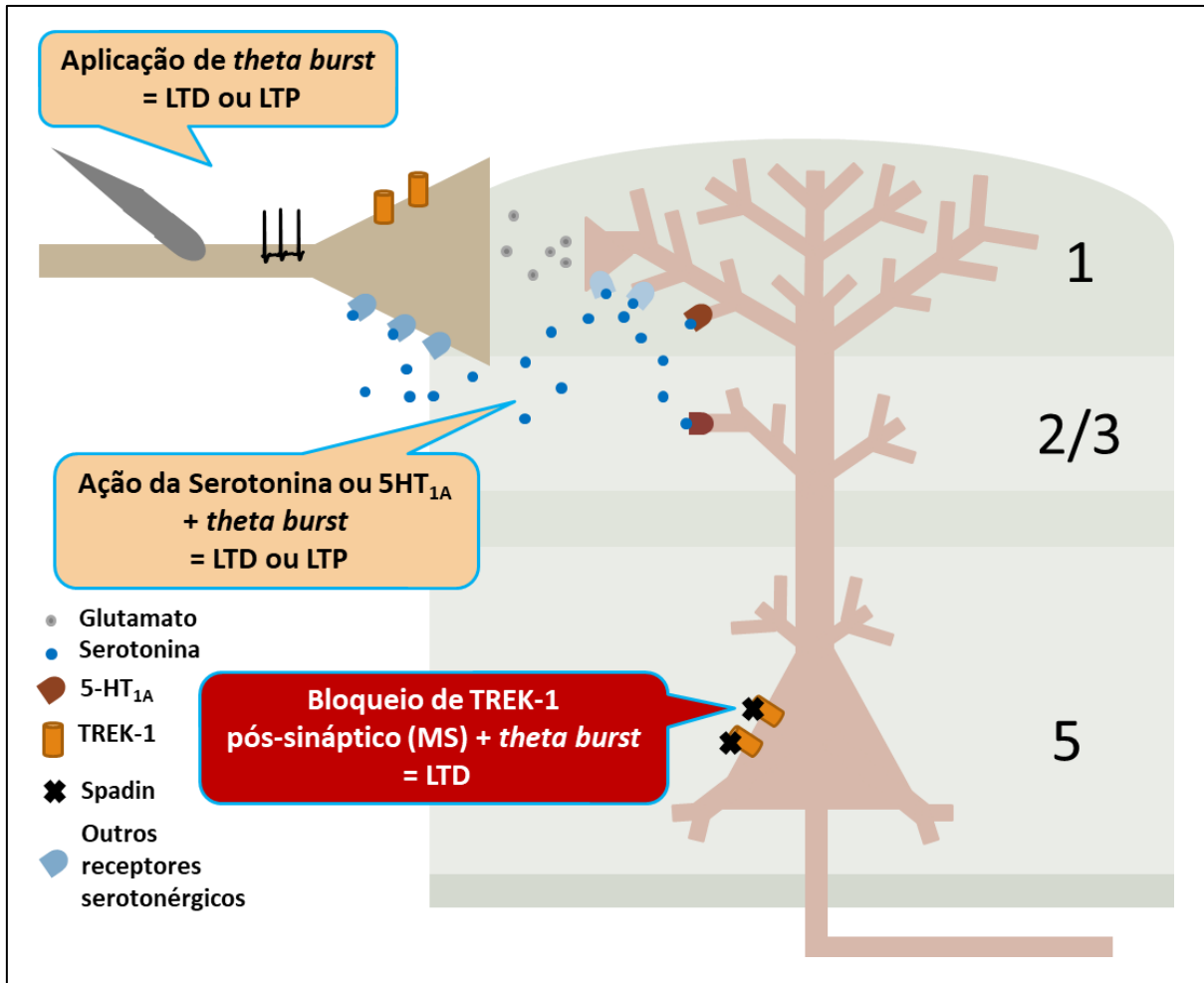


Figura 18. Alterações na plasticidade sináptica induzida por *theta burst* e sua modulação por 5-HT e TREK-1. A aplicação de *theta burst* induz plasticidade sináptica bidirecional no PL, sendo que a ação da serotonina em seus receptores, incluindo 5HT_{1A}, não interage com *theta burst*. No entanto, em animais MS o bloqueio de TREK-1 direciona a plasticidade induzida por *theta burst* para LTD, indicando que o estresse pós-natal induz alterações na quantidade e/ou função de TREK-1 pós-sináptico capazes de alterar a plasticidade sináptica no PL.

5 DISCUSSÃO

O impacto do cuidado materno e da experiência durante o período perinatal sobre o comportamento já era conhecido desde 1957, com o trabalho pioneiro de Levine et. al. utilizando ratos como modelo experimental [182]. Com o desenvolvimento de mais estudos nessa área, modelos de perturbação do comportamento materno começaram a ser propagados para o estudo da etiologia das doenças neuropsiquiátricas [183], pois embora a epidemiologia dessas doenças estivesse claramente ligada a eventos estressores durante o período perinatal e infância [15], os mecanismos neurobiológicos por trás da etiologia e fisiopatologia das mesmas não estava claro (e ainda hoje se encontra um tanto nebuloso). A utilização do modelo de MS é bastante útil para estudar esses mecanismos, visto que oferece a possibilidade de manipulação direta do sistema cerebral por se tratar de um modelo animal, e tem apresentado resultados consistentes com respeito a validade do modelo para várias doenças neuropsiquiátricas, tais como a depressão e ansiedade [158]. O modelo MS tem produzido resultados variados na literatura [184], e a diversidade de protocolos empregados (período em que ocorre a separação, intensidade da separação etc.) pode ser responsável pela produção de resultados algumas vezes paradoxais e contraditórios [28].

5.1 *Comportamento depressivo-símile é induzido pela MS*

Neste trabalho, os resultados mostram que ratas fêmeas infantis apresentam comportamento depressivo-símile, enquanto ratos machos infantis não apresentaram alterações de comportamento observáveis no FST. Uma explicação possível para esse desfecho seria a existência de uma maior reatividade ao estresse nas fêmeas, possivelmente consistindo em uma menor ativação do PL em uma situação estressora como a MS, como sugerido por outros trabalhos utilizando outros protocolos de estresse em animais adultos [168]. Na idade adulta, ambos os sexos apresentaram comportamento depressivo-símile e as fêmeas foram mais imóveis que os machos no FST, um resultado também observado em outros estudos utilizando o mesmo teste [185, 186]. Um outro estudo demonstrou que os machos tem neurônios dopaminérgicos na área tegmental ventral mais resilientes ao efeito do estresse, o que poderia ser um fenômeno subjacente a relativa resiliência à depressão

observada nos machos infantis. Em conjunto, isto indica que o modelo MS de fato induziu um fenótipo depressivo-símile nos animais, e os resultados são consistentes com a literatura.

Interessantemente, diferenças significativas entre machos e fêmeas controles foram detectadas: na infância, fêmeas mostraram menor imobilidade que os machos, ao passo que na idade adulta elas foram mais imóveis que os machos. Consistente com a ideia de diferentes respostas ao estresse em machos e fêmeas, os resultados sugerem um componente dependente do sexo para alterações relacionadas à idade na resposta ao estresse. Durante a adolescência, ambos os sexos possuem uma resposta ao estresse via eixo HPA aumentada [187], de forma que essa diferença comportamental entre os sexos poderia refletir uma maturação diferencial de estruturas da circuitaria de estresse responsáveis por regular a resposta neural ao estresse, mais do que a resposta endócrina via eixo HPA. Em suporte a essa suposição, sabe-se que durante a adolescência ocorre poda sináptica e outras mudanças estruturais na circuitaria de estresse [188], o que poderia estar relacionado a diferenças entre os sexos na resposta a estímulos estressores. Baseando-se nos dados desse estudo e na literatura, uma hipótese é que conforme a circuitaria de estresse amadurece, as fêmeas mudam de uma estratégia ativa de lidar com o estresse para uma mais passiva, enquanto os machos fariam o oposto.

5.2 A vulnerabilidade aos efeitos do estresse pós-natal é sexo-dependente

Mesmo que a MS não foi capaz de induzir diferenças comportamentais no NSF, ratas infantis fêmeas tiveram uma latência para se alimentar reduzida, comparadas aos machos. Esse teste pode ser interpretado de algumas formas, considerando que consiste em um paradigma de tomada de decisão, além de ser utilizado para mensurar comportamento ansiedade-símile e impulsividade. Assim, uma redução na latência para se alimentar no NSF pode significar aumento de impulsividade, tomada de decisão prejudicada ou redução de ansiedade. Além disso, como o NSF é um teste que envolve comportamento de ingestão alimentar, a avaliação do consumo de alimento é essencial para evitar um possível viés na interpretação dos dados. Nesse estudo foi avaliado o consumo de alimento em um grupo separado de animais, e nenhuma alteração induzida pela MS foi observada, bem como nenhuma diferença entre os sexos em relação ao consumo de alimento. Adicionalmente,

nenhuma alteração no ganho de peso dos filhotes também foi observada, durante todo o período de amamentação, corroborando o resultado da análise de consumo de alimento de que a MS não induziu alterações no comportamento alimentar dos animais. É conhecido que neurotransmissores como a 5-HT e dopamina estão envolvidos no controle da impulsividade, e embora as evidências disponíveis na literatura não são conclusivas, é claro que o PFC está envolvido [189-191]. Aqui, a interpretação adotada desse resultado é que a MS não afeta a impulsividade, porém ratas infantis fêmeas são mais impulsivas que os machos, sugerindo novamente um componente comportamental dependente do sexo.

Considerando em conjunto os dados do FST e do NSF, postula-se que as fêmeas teriam um PFC mais imaturo na infância, e, portanto, um controle *top-down* reduzido sobre o DRN e outras estruturas do tronco encefálico responsáveis pela liberação de monoaminas no cérebro. Nesse sentido, as fêmeas apresentariam prejuízo da tomada de decisão, assumindo mais riscos na tarefa colocada pelo NSF na infância. Não há muitos estudos na literatura que corroborem essa ideia, já que poucos estudos utilizando animais infantis e/ou fêmeas têm sido conduzidos, portanto mais estudos são necessários para entender essa diferença entre os sexos identificada nesse estudo. Contudo, alguns estudos na literatura reportam reduzida ansiedade em fêmeas adultas após MS [192] e em animais infantis no PND20 [193] usando os testes do labirinto em cruz elevado e campo aberto, resultados esses que poderiam estar correlacionados a reduzida latência para se alimentar no NSF vista nesse estudo para as fêmeas, apesar da ausência de efeitos induzidos pela MS. Apesar dos protocolos de MS serem muito variáveis na literatura e resultados contraditórios serem relatados com frequência [194], estudos incluindo fêmeas tem indicado uma interação muito clara entre gênero, idade e estresse para os efeitos comportamentais induzidos pela MS [193, 195, 196].

No modelo de MS empregado nesse estudo, também foi observado redução do comportamento de autolimpeza (*grooming behavior*) em animais infantis MS, evidenciando comportamento depressivo-símile em conjunto com os dados do FST. O OF não mostrou nenhuma diferença de comportamento exploratório (*rearing behavior*), apesar de animais MS apresentarem uma tendência a ambulação reduzida nesse teste. Outros estudos usando animais em outras idades, e o modelo de privação materna (que emprega um protocolo similar à MS), encontraram locomoção prejudicada em animais que passaram por estresse nas fases iniciais da vida [197-199], indo de encontro aos resultados obtidos nesse estudo. Já o

SPT não resultou em diferenças estatisticamente significativas, levando à conclusão que o protocolo de MS utilizado aqui não induziu anedonia em ratos infantis.

Agregando os resultados dos testes de comportamento obtidos nesse estudo, conclui-se que: (1) há diferenças de sexo nos componentes comportamentais de ratos infantis, sendo as fêmeas aparentemente mais vulneráveis ao estresse pós-natal; (2) MS leva a comportamento depressivo-símile na infância de forma dependente do sexo; e (3) MS afeta alguns componentes comportamentais enquanto poupa outros. Baseado nessas conclusões derivadas dos resultados, sugere-se que o estresse pós-natal na circuitaria neuronal têm um impacto na inibição *top-down* da resposta ao estresse, provavelmente por afetar o PFC, resultando em aumento do desespero comportamental (visto no FST) e prejuízo do autocuidado (visto na redução de *grooming* no OF), mas não afeta o sistema de recompensa (como determinado pela ausência de anedonia no SPT) e controle da impulsividade (observado no NSF).

5.3 Alterações Neurobiológicas em *TREK-1* e *5HT_{1A}* pela MS

Estresse não controlável pode modular a liberação de 5-HT e dopamina no mPFC [200], e também levar à ativação de células serotoninérgicas no DRN [201], evidenciando um circuito neuroanatômico para modular a liberação de 5-HT no mPFC. A maioria dos neurônios que se projetam para o DRN estão na camada V do PL, e nessa camada neurônios projetando para a BLA podem ser encontrados também [202]. O estresse também estimula um aumento abrupto de 5-HT na BLA [203]. Como o receptor *5HT_{1A}* é um dos mais expressos no mPFC [40] e tem sido implicado na ansiedade e depressão [95, 204, 205], um dos objetivos desse estudo foi a avaliação de possíveis alterações na expressão desse receptor no modelo MS.

5.3.1 A MS induz aumento da imunomarcação para *5HT_{1A}* na BLA, resultando em fenótipo relativamente resiliente à depressão em machos, mas não em fêmeas

Os resultados apontaram que não há diferenças significativas na imunomarcação para *5HT_{1A}* no PL. Nas últimas décadas, o estudo de fatores para resiliência a depressão começou a ser investigado, e desde a década de 70 pesquisas em humanos indicaram que alguns

indivíduos são “resistentes ao estresse” e não desenvolvem doenças neuropsiquiátricas relacionadas ao estresse, um achado que tem sido replicado em modelos animais [206]. Evidências mais recentes de alterações neuroquímicas relacionadas à resiliência incluem variações na expressão de 5HT_{1A} na circuitaria de estresse, e inclusive esse receptor tem sido apontado como um potencial marcador biológico para o entendimento da vulnerabilidade à depressão [207].

Na BLA, aumento na imunomarcação de 5HT_{1A} foi encontrado apenas em machos infantes MS. Durante o desenvolvimento, a conectividade funcional entre mPFC e amígdala é positiva, o que significa que um infante é mais reativo emocionalmente que um adulto, e esse fenótipo muda para uma conectividade negativa na adolescência, uma característica considerada como resultado do amadurecimento de circuitos inibitórios que aumentam o controle *top-down* do estresse e regulam respostas de medo [208]. A MS acelera esse processo de amadurecimento, uma conclusão baseada em estudos com animais [209] e humanos [210], e há evidência convincente de que este processo é dependente de corticosteroides, que sabidamente se encontram alterados na depressão (via alterações no eixo HPA). Aqui se apresenta evidências sugestivas de que 5HT_{1A} desempenha um papel nesse processo de maturação de forma dependente do sexo, o que é consistente com a ideia do estresse perinatal aumentar a vulnerabilidade à depressão posteriormente na vida, uma vez que o aumento da quantidade de 5HT_{1A} na amígdala pode ser associado com um aumento da vulnerabilidade à depressão nos machos, visto que eles apresentaram desespero comportamental quando adultos. Também é possível que um aumento de 5HT_{1A} na BLA possa estar associado à uma relativa resiliência ao desespero comportamental na infância, já que os machos não apresentaram alterações no FST nessa idade. Ainda, essas interpretações podem estar ligadas à poda sináptica que ocorre na adolescência: se a conectividade funcional mPFC-amígdala tem seu processo de maturação acelerado pela MS, o impacto na plasticidade sináptica relacionado à formação de conexões na circuitaria de estresse seria importante, podendo conduzir a alterações na resposta ao estresse em fases posteriores da vida e predispondo o indivíduo ao desenvolvimento de doenças como depressão e ansiedade na idade adulta.

Apesar da robusta inervação serotoninérgica que a amígdala recebe e do conhecimento a respeito da modulação do medo e de processos de memória mediados pela amígdala, as

ações da 5-HT na amígdala ainda não são claras. Receptores 5HT_{1A} são expressos tanto em neurônios excitatórios como inibitórios na amígdala, e outros receptores como 5HT_{2A} e 5HT_{3A} são expressos também, tornando o estudo da modulação serotoninérgica na amígdala difícil de ser executado [211]. Contudo, existem alguns estudos que concordam com os achados deste trabalho. Camundongos machos tratados com um agonista 5HT_{1A} durante PND1-21 apresentam comportamento depressivo-símile na idade adulta [212], sugerindo que um aumento de sinalização via 5HT_{1A} está implicado no desenvolvimento de depressão posteriormente na vida. Um agonista 5HT_{1A} é capaz de inibir a LTP na amígdala lateral [213]. O bloqueio desse receptor na BLA de ratos machos adultos previne problemas de memória causados por estresse [214]. Em geral, a literatura sustenta que há um papel na regulação do estresse para os receptores 5HT_{1A} na BLA, e esse estudo apresenta evidências de um possível componente dependente do sexo na modulação serotoninérgica pelo estresse pós-natal.

5.3.2 5HT_{1A} e TREK-1 são modulados de forma correlacionada pela MS no ERh e GD de forma sexo-dependente

Alta expressão de 5HT_{1A} é observada no ERh e GD do hipocampo [215]. No ERh, a 5-HT inibe a excitabilidade neuronal através do 5HT_{1A}, o qual leva à ativação de canais de potássio do tipo TWIK-1 [132, 216]. Curiosamente, nesse estudo foi observada uma redução da imunomarcagem para 5HT_{1A} no ERh dos animais MS, a qual foi acompanhada por uma redução da imunomarcagem para TREK-1 em machos, sugerindo que essas alterações podem estar ligadas de alguma forma. Schiller et. al encontrou o mesmo resultado para o ERh em camundongos adultos submetidos a isolamento social [217], apesar de que em seu estudo ele também mostrou uma diminuição da expressão de 5HT_{1A} na BLA e GD, sugerindo que as alterações encontradas em animais infantes podem levar ao desenvolvimento de outras mudanças na idade adulta. Como discutido anteriormente, mesmo alterações que não persistem até a idade adulta podem ter um impacto significativo na vulnerabilidade ao desenvolvimento de doenças neuropsiquiátricas.

Dando apoio a hipótese da neurogênese na patofisiologia da depressão, elegantes estudos foram conduzidos para demonstrar que o efeito antidepressivo de drogas como a fluoxetina requer a ocorrência de neurogênese no GD, sendo que esse efeito é ausente em

animais nocaute para 5HT_{1A} e pode ser mimetizado pelo tratamento com um agonista 5HT_{1A} [218, 219]. Portanto, mesmo considerando que o conhecimento a respeito dos mecanismos da modulação serotoninérgica no hipocampo e na formação para-hipocampal ainda são elusivos, se propõe aqui que o estresse pode levar a depressão por impedir a habilidade da 5-HT de induzir neurogênese no GD, potencialmente por alterar a expressão e/ou função dos receptores 5HT_{1A}. Os dados mostram que a MS reduziu a imunomarcagem para 5HT_{1A} no GD de animais infantis, de onde se pode deduzir um potencial prejuízo para a neurogênese nessa região, já que se sabe que os receptores 5HT_{1A} são importantes para esse processo. Ainda, essa redução na quantidade de 5HT_{1A} no GD foi observada apenas nas fêmeas, além de uma diferença entre os sexos também ter sido observada, onde as fêmeas infantis controles apresentaram maior imunomarcagem para 5HT_{1A} no GD que os machos controles. Assim, pode-se argumentar o seguinte: o estresse pós-natal causa uma redução na quantidade de 5HT_{1A} no GD mais significativa nas fêmeas que nos machos, uma vez que as fêmeas já partem de uma maior quantidade de 5HT_{1A} do que os machos, de forma que eventos estressores nas primeiras fases da vida teriam um impacto maior nas fêmeas, o que pode explicar a maior vulnerabilidade das fêmeas ao desenvolvimento de depressão.

5.3.3 A MS causa desbalanço excitação/inibição no circuito PL-BLA em machos e fêmeas através do aumento da quantidade de TREK-1

Os canais TREK-1 são expressos em muitas áreas cerebrais, e evidências apontam que esse canal é expresso principalmente em neurônios GABAérgicos [126]. O papel fisiológico de TREK-1 em neurônios está atualmente sob investigação, pois interesse no estudo do papel neuronal desse canal tem surgido apenas recentemente, após estudos com camundongos nocautes para TREK-1 demonstrarem que esse canal está envolvido na depressão e outras doenças neurológicas, despontando como um alvo terapêutico em potencial para o desenvolvimento de novos fármacos para o tratamento de doenças neuropsiquiátricas [125, 148, 220]. O estresse na idade adulta parece aumentar a quantidade de TREK-1 no PFC [134], sugerindo que esse canal possa ter algum papel na fisiopatologia da depressão. Os dados desse estudo mostram um aumento na imunomarcagem para TREK-1 no PL de animais infantis

MS, independente do sexo, sugerindo que o estresse pós-natal também é capaz de aumentar a expressão de TREK-1 nessa subdivisão do mPFC.

Uma função comumente proposta para TREK-1 em neurônios é a regulação dos potenciais de membrana em repouso, e conseqüentemente a modulação da excitabilidade neuronal [143], pois há vários mecanismos intra e extracelulares pelos quais esse canal pode ser modulado em neurônios [131, 142]. Combinando essa ideia com os resultados desse trabalho, uma interpretação seria que o estresse aumenta a possibilidade da modulação do potencial de membrana em neurônios GABAérgicos no PL, uma vez que a MS causou um aumento na imunomarcção para TREK-1 no PL, e em consequência disso um prejuízo no balanço excitatório/inibitório iria ocorrer nessa área. Isso poderia perturbar a regulação das respostas ao estresse e induzir comportamento depressivo-símile. Outra possibilidade é que um aumento na quantidade de TREK-1 no PL induzido por estresse potencializaria a resposta ao estresse, considerando que um aumento na liberação de 5-HT (o qual ocorre após certos estímulos estressores) poderia ativar mais canais TREK-1 em neurônios GABAérgicos, hiperpolarizando a rede inibitória de forma a permitir que mais sinais excitatórios sejam integrados nessa região cortical. Claramente, mais estudos são necessários para averiguar se de fato esses fenômenos ocorrem, uma vez que amplas alterações neurobiológicas são induzidas pelo estresse, e nesse trabalho não foram realizados experimentos específicos para neurônios GABAérgicos para averiguar as hipóteses levantadas aqui.

Adicionalmente, se mostra que fêmeas controles também apresentam menos imunomarcção para TREK-1 no PL que os machos. Esses resultados apontam para mais uma diferença neurobiológica entre os sexos. A MS induziu um aumento significativo de imunomarcção para TREK-1 na BLA apenas nas fêmeas, levando a suspeita de que um aumento na quantidade de TREK-1 na BLA pode ser um fenômeno subjacente à maior vulnerabilidade à depressão vista nas fêmeas. Um fato curioso acerca desse resultado é que a BLA de animais CON parece apresentar poucos neurônios expressando TREK-1 [126], uma característica também observada nesse estudo (painel do **Gráfico 7**), e portanto se especula que a MS poderia ter um impacto maior na BLA das fêmeas por induzir um estado de excitabilidade bastante diferente do fisiológico nessa região. Se acumulam evidências de estudos com humanos e animais que mostram que uma disruptura no controle GABAérgico da BLA está correlacionada à estados emocionais disfuncionais em muitas doenças

neuropsiquiátricas [221-223], corroborando esta interpretação dos resultados. Finalmente, o circuito PL-BLA parece envolver uma comunicação bastante complexa entre as duas regiões, utilizando circuitos de inibição *feedforward* recíprocos, onde o GABA é um dos neurotransmissores principais [43], e portanto estudos futuros que avaliem de forma funcional e específica o impacto da 5-HT e TREK-1 em neurônios GABAérgicos nesse circuito precisam ser executados.

5.3.4 Mudanças na expressão de TREK-1 no ERh e GD gera hiperexcitabilidade desse circuito nos machos

Em relação ao córtex entorrinal, essa é uma região para-hipocampal conhecida por processar a memória espacial e reconhecimento de objetos [224], mas evidências recentes indicam que ela também é importante na depressão [225, 226]. O ERh processa a informação vinda do neocórtex, enviando essa informação processada para o GD através da via perfurante [227, 228]. Aqui, observa-se um aumento na imunomarcção para TREK-1 no GD para ambos os sexos, e um efeito sexo-dependente aparece nos resultados, que mostram uma redução de imunomarcção para TREK-1 apenas em machos MS. Portanto, para os machos, a MS induziu um efeito contrastante em TREK-1 nessa circuitaria hipocampal: um aumento ocorre no ERh, enquanto uma diminuição aparece no GD. Assumindo que esses resultados indicam uma maior ou menor quantidade de TREK-1 em neurônios GABAérgicos como discutido anteriormente, os dados sugerem que o estresse pós-natal induz um aumento na excitabilidade do ERh, enquanto que a diminuição de TREK-1 no GD poderia prejudicar a modulação da excitabilidade por neurotransmissores, a qual é importante nessa região [229], resultando em uma circuitaria que se excita de forma anômala. Como o ERh também se projeta para o mPFC em uma alça de *feedback* [228], e neurônios GABAérgicos no circuito ERh-GD parecem estar envolvidos em oscilações *theta* durante a comunicação entre o PFC e o hipocampo [230], em conjunto os resultados aqui apresentados permitem postular que a MS induz uma desregulação no processamento de informação no circuito ERh-GD por induzir um estado de hiperexcitabilidade, que é sexo-dependente ocorrendo somente nos machos. Entretanto, esse estado de hiperexcitabilidade parece não induzir alterações

comportamentais nos machos infantes, e pode ser um efeito mais relacionado à relativa resiliência a depressão vista nos machos infantes.

O significado da disfunção no circuito ERh-GD induzido pela MS para a depressão ainda não é claro, uma vez que informações acerca do papel do ERh na depressão ainda são esparsas. Um trabalho recente indicou que a estimulação do ERh pode ter um efeito antidepressivo [226], dando suporte à hipótese aqui levantada de que um aumento na excitabilidade do ERh levaria a um quadro de relativa resiliência à depressão.

5.3.5 O estresse pós-natal pela MS induz alterações em sub-regiões específicas da circuitaria de estresse

Na análise da quantidade de TREK-1 e 5HT_{1A} feita pelo método de *western-blot* foram empregadas regiões cerebrais mais abrangentes, enquanto a imunistoquímica permitiu uma análise mais específica das áreas possivelmente afetadas pela MS. Os resultados do *western-blot* demonstraram ausência de efeitos estatisticamente significativos, o que sugere que as alterações promovidas pela MS são específicas a nível de sub-região cerebral. Essa interpretação também sugere que os efeitos promovidos pela MS sobre a quantidade de TREK-1 e 5HT_{1A} na circuitaria de estresse são complexos, podendo ocorrer aumento ou diminuição dessas proteínas dependendo da sub-região investigada. Essa ideia encontra respaldo nos próprios resultados de imunistoquímica aqui apresentados, onde aumento e diminuição de TREK-1 e 5HT_{1A} são dependentes da região cerebral analisada.

5.4 A plasticidade sináptica no PL pode ser modulada por 5HT_{1A} e TREK-1

Um corpo significativo de evidências demonstram que a plasticidade sináptica no mPFC desempenha um papel importante na depressão, com estudos relatando que na depressão ocorrem distúrbios na expressão de receptores NMDA, *downregulation* de proteínas relacionadas a sinapses GABAérgicas (o que indica também uma perturbação do balanço excitação/inibição) e hiperatividade no mPFC [231]. Suporte adicional para essa ideia pode ser encontrado na investigação recente dos efeitos antidepressivos da quetamina, uma droga que aumenta a quantidade de proteínas envolvidas na sinalização da plasticidade

sináptica e o número e função de novas sinapses no PFC de ratos [232]. Como a quetamina é um inibidor de receptores NMDA, outros agentes glutamatérgicos estão sendo considerados como potenciais drogas antidepressivas [233]. Contudo, detalhes a respeito de mudanças na plasticidade sináptica no PFC e como isso poderia se correlacionar com outras teorias da depressão, como a teoria monoaminérgica, ainda são largamente desconhecidos.

5.4.1 Ativação de 5HT_{1A} ou bloqueio de TREK-1 induz LTD no PL

O estudo eletrofisiológico conduzido nesse trabalho mostra que a 5-HT induz uma LTD no PL, e a ativação de receptores 5HT_{1A} no PL é suficiente para induzir LTD nessa região. Gullledge et. al. relatou uma diminuição na atividade elétrica de neurônios piramidais da camada V do PFC em camundongos após a aplicação de 5-HT, e esse efeito foi abolido por um antagonista 5HT_{1A}, sendo que nesse mesmo estudo esse grupo demonstrou a existência de subpopulações de neurônios no PFC que pode ser diferenciada pelas respostas à aplicação de 5-HT [177]. Neurônios do PFC, por exemplo, podem apresentar apenas 5HT_{1A} ou 5HT_{2A}, ou ambos, e 5HT_{1A} é localizado no soma e no segmento inicial dos axônios [123], de forma que a aplicação de 5-HT pode levar a diferentes respostas dependendo do padrão de receptores serotoninérgicos expressos. Além disso, esses dois tipos de receptores estão distribuídos por todas as camadas corticais no PFC com exceção da camada I, e são expressos tanto em neurônios glutamatérgicos quanto GABAérgicos [40]. Adicionalmente, receptores do tipo 5HT₃ também estão presentes no PFC, e parecem ser expressos quase exclusivamente em neurônios GABAérgicos nos limites da camada I [40, 123]. Toda essa complexidade torna a investigação da modulação serotoninérgica uma tarefa árdua, o que pode explicar parcialmente a falta de mais estudos sobre esse tópico na literatura.

Embora a investigação do papel fisiológico dos receptores 5HT_{1A} no córtex cerebral ter gerado dados contraditórios, a hipótese mais defendida afirma que a ativação de 5HT_{1A} na circuitaria límbica (a qual inclui o PL) leva a uma redução da resposta de estresse, da impulsividade e da agressão, e portanto aumenta a resiliência e tolerância ao estresse, resultando-se em uma ação benéfica para o tratamento da depressão [234]. Portanto, aqui se postula que 5HT_{1A} é capaz de suscitar essas respostas através da indução de LTD no PL. Os resultados aqui apresentados indicam que esse efeito é mediado por receptores 5HT_{1A} pós-

sinápticos, como pode ser observado nos resultados descritos para os experimentos de pulso pareado usando o agonista 5HT_{1A} 8-OH-DPAT. Além disso, a LTD induzida pela ativação de 5HT_{1A} foi a mesma para animais CON e MS, sugerindo que o estresse pós-natal não altera o efeito da 5-HT sobre a plasticidade sináptica no PL.

O bloqueio de TREK-1 no PL também é, por si só, suficiente para induzir uma LTD de magnitude menor que a induzida apenas pelo 5HT_{1A}. Apesar de poucos estudos terem avaliado esse canal como um possível fator envolvido na plasticidade sináptica, geralmente se assume que esse seria o caso pela possibilidade de TREK-1 em modular o potencial de membrana em repouso [143], e foi observado que o bloqueio de TREK-1 preveniu a potenciação da transmissão sináptica no hipocampo induzida pela inibição de CaMKII [235]. Os resultados aqui apresentados demonstram que a inibição de TREK-1 induz uma LTD no PL, confirmando que de fato esse canal está envolvido na modulação da plasticidade sináptica. Isso corrobora a hipótese de que a indução de LTD no PL seria um mecanismo antidepressor importante, e que poderia ser explorado para o desenvolvimento de novos fármacos, uma vez que é conhecido que a spadin e 8-OH-DPAT induzem efeitos antidepressivos *in vivo* [133, 236, 237] e ambas as drogas produziram uma LTD quando aplicadas no PL, conforme demonstrado aqui. É intrigante que os experimentos de pulso pareado demonstraram uma facilitação sináptica pela inibição de TREK-1 apenas nos animais MS, o que sugere que de alguma forma o estresse pós-natal altera a função e/ou expressão de TREK-1 nos terminais pré-sinápticos no PL. Apesar disso, esse efeito parece não impactar a plasticidade sináptica de forma muito significativa, já que ambos animais controles e MS apresentaram uma LTD induzida pelo bloqueio de TREK-1.

5.4.2 A LTD induzida por 5HT_{1A} no PL depende da ativação de TREK-1

Um dos objetivos desse trabalho foi verificar uma possível interação entre o sistema serotoninérgico e os canais de potássio TREK-1. Receptores de serotonina agindo em canais de potássio não é algo inédito, pois estudos da década de 90 e outros mais recentes determinaram que eles podem ativar correntes de potássio em neurônios de diferentes áreas cerebrais [216, 238-240]. No entanto, nesse trabalho foi avaliado o impacto da possível

interação entre 5HT_{1A} e TREK-1 diretamente na *plasticidade sináptica*, utilizando a eletrofisiologia em *brain slices* como método.

Como TREK-1 sofre modulação por PKA e PKC [131], se pode deduzir que a 5-HT irá alterar a atividade de TREK-1 através da ativação de tais vias de sinalização celular (que podem ser evocadas pela ativação de 5HT_{1A} e 5HT_{2A}, por exemplo), e alguns estudos relataram interações entre receptores serotoninérgicos e TREK-1 [240, 241]. Quando o bloqueio de TREK-1 foi efetuado antes da aplicação do agonista 5HT_{1A}, a LTD induzida pela ativação de 5HT_{1A} desaparece. Este resultado é um claro indicador de que o mecanismo pelo qual 5HT_{1A} induz LTD no PL é a abertura de TREK-1, que pode ocorrer pela diminuição da ativação da PKA, uma vez que se sabe que a PKA pode fosforilar TREK-1 de forma a inibir sua atividade (**Figura 19**) [131, 144]. Outro trabalho demonstrou uma interação paradoxal entre 5HT₄ e TREK-1 no PFC sobre a excitabilidade dos núcleos dorsais da rafe, onde os resultados mostraram que tanto um agonista 5HT₄ (que leva ao aumento de ativação da PKA) quanto a inibição de TREK-1 pela spadin promoveram um aumento da taxa de disparo nos núcleos dorsais da rafe, mas a administração de ambos resultou em nenhum efeito significativo [242]. Isto vai de encontro aos resultados aqui obtidos, evidenciando mais uma vez a existência de uma interação entre o sistema serotoninérgico e TREK-1 em outras circuitarias encefálicas.

5.5 A frequência theta induz plasticidade bidirecional no PL

Após a aplicação de *theta burst* na camada I do PL, se obteve LTP em um terço das células utilizadas no experimento, e LTD em cerca de 60% das células (**Gráfico 24E**). Esse foi o mesmo resultado obtido por um estudo anterior usando estimulação de alta frequência no PFC para induzir plasticidade [243], indicando que nesta região os neurônios piramidais da camada V apresentam uma plasticidade bidirecional quando estimuladas. De fato, outros autores tem encontrado o mesmo resultado, e hipotetizado que a presença de neuromoduladores no PL seria necessária para direcionar a plasticidade induzida por *theta burst* no PL [244, 245].

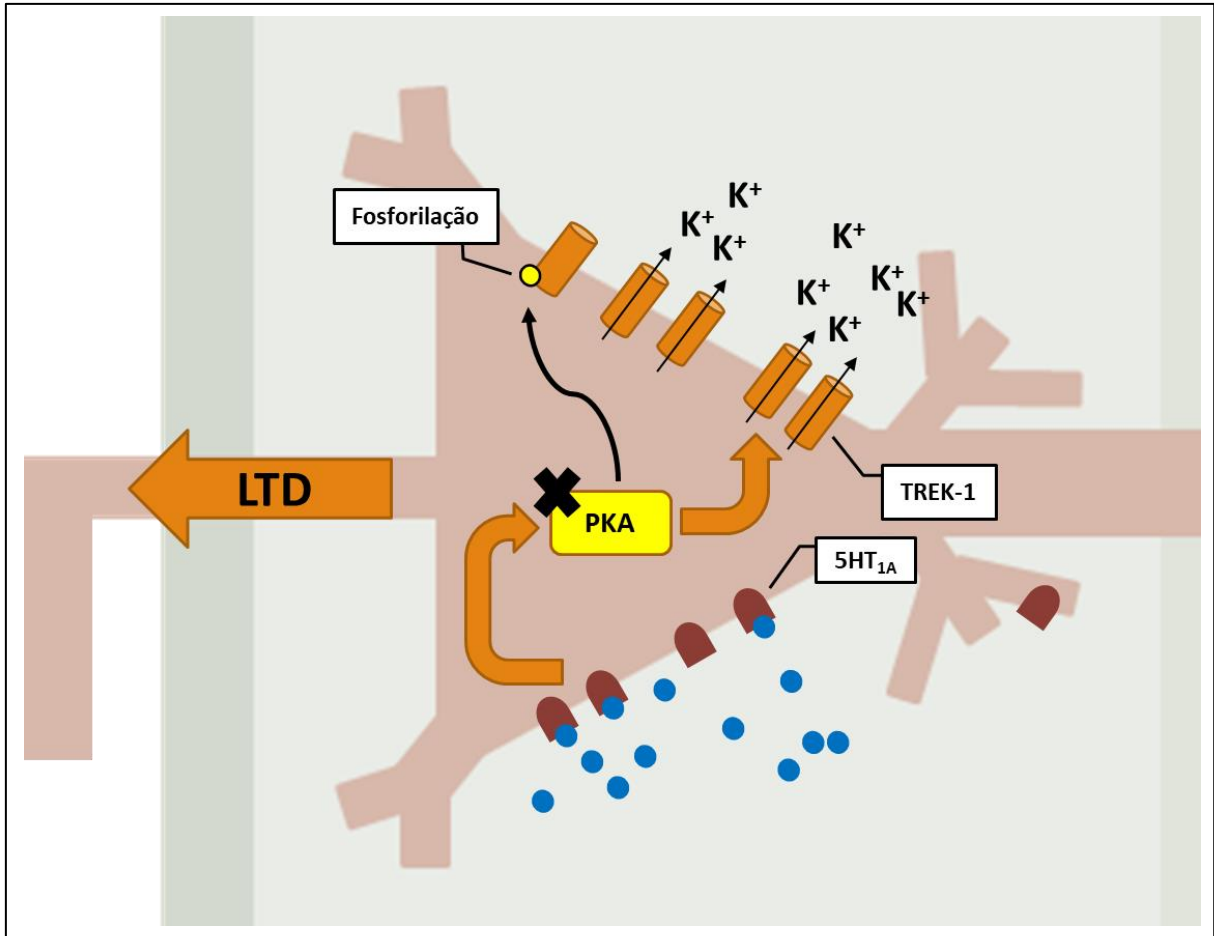


Figura 19. Mecanismo proposto de indução de LTD no PL pela ativação de 5HT_{1A}. A ativação de receptores 5HT_{1A} leva a inibição da PKA. Fisiologicamente, a PKA em neurônios da camada V do PL mantém uma população de canais TREK-1 fosforilada, o que inibe a sua ativação. Portanto, a inibição da PKA leva a um aumento de atividade em TREK-1, permitindo a ativação de uma maior corrente de potássio para fora da célula, gerando uma hiperpolarização. Essa hiperpolarização dificulta a integração de estímulos excitatórios no neurônio, resultando em uma LTD.

5.5.1 A 5-HT não altera a plasticidade induzida por *theta burst* no PL

Seguindo-se a ideia levantada na seção anterior, esperava-se que a presença de 5-HT ou de um agonista 5HT_{1A} iria alterar a plasticidade bidirecional induzida por *theta burst* no PL, o que não ocorreu nos experimentos executados. Assim, sugere-se que a 5-HT não interage com a frequência *theta burst* no PL, de forma que os mecanismos utilizados pela frequência *theta* para induzir plasticidade bidirecional nessa região não sofrem modulação significativa pela 5-HT. É possível que outros receptores serotoninérgicos além do 5HT_{1A} sejam capazes de influenciar a plasticidade por *theta burst* no PL, mas como a 5-HT não induziu nenhuma alteração, provavelmente essa modulação não teria um papel fisiológico. Contudo, poderia ser explorada como estratégia farmacológica para o desenvolvimento de novas drogas.

5.5.2 TREK-1 influencia a plasticidade induzida por *theta burst* no PL em animais MS

A inibição de TREK-1 foi capaz de direcionar a plasticidade bidirecional induzida por *theta burst* para LTD, o que ocorreu apenas nos animais MS. Talvez esse achado possa estar relacionado a outro resultado dos estudos eletrofisiológicos aqui apresentados que ocorreu apenas em animais MS também, a saber, a facilitação sináptica observada em animais MS quando da aplicação de spadin. Portanto, pode-se postular que, na depressão, um aumento da função de TREK-1 nos terminais pré-sinápticos leva à expressão de LTD. Baseado nisso, uma previsão seria que a spadin poderia ser mais efetiva e específica que drogas serotoninérgicas para tratar a depressão, considerando que nesse estudo, quando da aplicação de *theta burst*, a spadin foi capaz de elicitar LTD apenas nos animais MS, enquanto o agonista para 5HT_{1A} 8-OH-DPAT foi incapaz de alterar a plasticidade sináptica nesse contexto. De fato, alguns estudos apoiam essa ideia, apresentando dados que revelam um efeito antidepressivo mais rápido e mais pronunciado da spadin quando comparada a outros antidepressivos [237], sendo uma droga que não afeta o comportamento relacionado a ansiedade (o que indica uma ação mais específica nos circuitos envolvidos com a depressão) [150], aumenta a expressão de proteínas relacionadas à sinaptogênese [246] e é mais efetiva em reduzir os níveis de corticosterona após estresse [150].

Outrossim, o uso de estimulação *theta burst* está sendo apresentado como uma alternativa à EMTr (estimulação magnética transcraniana repetitiva) para o tratamento de distúrbios mentais, pois estudos indicam que *theta burst* é pelo menos tão eficiente quanto a EMTr, indicando que a frequência *theta burst* é importante para a manutenção saudável de respostas neurais ao estresse [247]. Apesar dessa importância, os resultados aqui apresentados demonstram que a 5-HT não parece desempenhar um papel importante de interação com *theta burst*, de forma que os mecanismos antidepressivos evocados pela frequência *theta* devem ser distintos daqueles induzidos pela 5-HT. A plasticidade sináptica pode se configurar como um dos fatores envolvidos na fisiopatologia da depressão, operando de forma independente da 5-HT, ao menos em relação à plasticidade sináptica no PL.

6 CONCLUSÃO

A MS induz alterações na modulação da plasticidade sináptica no PL por TREK-1, onde o bloqueio de TREK-1 passa a empregar um mecanismo pré-sináptico para a indução de LTD no PL. A 5-HT ou a ativação do receptor $5HT_{1A}$ são suficientes para induzir LTD no PL, bem como o bloqueio de TREK-1. A LTD induzida por $5HT_{1A}$ depende da ativação de TREK-1.

O estresse pós-natal pela MS causa alterações na expressão de TREK-1 e $5HT_{1A}$ em áreas cerebrais importantes da circuitaria de estresse. Esses efeitos foram sexo-dependentes, e de forma geral as fêmeas se mostraram mais vulneráveis a MS, indicando que a maior prevalência de depressão em mulheres pode ser devida a diferenças neurobiológicas entre os sexos. A diminuição de TREK-1 associada a diminuição de $5HT_{1A}$ no ERh, juntamente com um aumento de $5HT_{1A}$ na BLA, se correlaciona com um fenótipo de relativa resiliência à depressão, ocorrendo nos machos infantis. A redução de $5HT_{1A}$ associada a um aumento de TREK-1 no GD, juntamente com um aumento de TREK-1 na BLA, se correlaciona com um fenótipo depressivo-símile, ocorrendo nas fêmeas infantis. A MS aumenta a quantidade de TREK-1 no PL para ambos os sexos, o que se correlaciona com aumento da vulnerabilidade à depressão na idade adulta em machos e fêmeas.

Portanto, a hipótese central desse trabalho foi confirmada pelos experimentos executados, evidenciando que o estresse pós-natal é capaz de induzir comportamento depressivo-símile através da modulação da plasticidade sináptica via alterações na expressão de $5HT_{1A}$ e TREK-1 na circuitaria de estresse. A indução de LTD no PL pode possuir uma ação antidepressiva, podendo ser explorada como estratégia terapêutica para o desenvolvimento de novos fármacos para o tratamento de doenças neuropsiquiátricas.

REFERÊNCIAS*

1. Joels M, Baram TZ. The neuro-symphony of stress. *Nat Rev Neurosci*. 2009;10(6):459-66.
2. Hill MN, Hellems KG, Verma P, Gorzalka BB, Weinberg J. Neurobiology of chronic mild stress: parallels to major depression. *Neurosci Biobehav Rev*. 2012;36(9):2085-117.
3. Popoli M, Yan Z, McEwen BS, Sanacora G. The stressed synapse: the impact of stress and glucocorticoids on glutamate transmission. *Nat Rev Neurosci*. 2011;13(1):22-37.
4. de Kloet ER, Joels M, Holsboer F. Stress and the brain: from adaptation to disease. *Nat Rev Neurosci*. 2005;6(6):463-75.
5. Sandi C, Haller J. Stress and the social brain: behavioural effects and neurobiological mechanisms. *Nat Rev Neurosci*. 2015;16(5):290-304.
6. Dominguez-Lopez S, Howell R, Gobbi G. Characterization of serotonin neurotransmission in knockout mice: implications for major depression. *Rev Neurosci*. 2012;23(4):429-43.
7. Popoli M, Yan Z, McEwen BS, Sanacora G. The stressed synapse: the impact of stress and glucocorticoids on glutamate transmission. *Nat Rev Neurosci*. 2012;13(1):22-37.
8. Arnsten AF. Stress signalling pathways that impair prefrontal cortex structure and function. *Nat Rev Neurosci*. 2009;10(6):410-22.
9. Robbins TW. Controlling stress: how the brain protects itself from depression. *Nat Neurosci*. 2005;8(3):261-2.
10. Brunson KL, Chen Y, Avishai-Eliner S, Baram TZ. Stress and the developing hippocampus: a double-edged sword? *Mol Neurobiol*. 2003;27(2):121-36.
11. Liang BF, Huang F, Wang HT, Wang GH, Yuan X, Zhang MZ, et al. Involvement of norepinephrine and serotonin system in antidepressant-like effects of hederagenin in the rat model of unpredictable chronic mild stress-induced depression. *Pharmaceutical biology*. 2015;53(3):368-77.
12. ter Horst JP, de Kloet ER, Schachinger H, Oitzl MS. Relevance of stress and female sex hormones for emotion and cognition. *Cellular and molecular neurobiology*. 2012;32(5):725-35.
13. Graham YP, Heim C, Goodman SH, Miller AH, Nemeroff CB. The effects of neonatal stress on brain development: implications for psychopathology. *Dev Psychopathol*. 1999;11(3):545-65.
14. Krugers HJ, Arp JM, Xiong H, Kanatsou S, Lesuis SL, Korosi A, et al. Early life adversity: Lasting consequences for emotional learning. *Neurobiol Stress*. 2017;6:14-21.
15. Dube SR, Anda RF, Felitti VJ, Chapman DP, Williamson DF, Giles WH. Childhood abuse, household dysfunction, and the risk of attempted suicide throughout the life span: findings from the Adverse Childhood Experiences Study. *JAMA*. 2001;286(24):3089-96.
16. Roy A. Childhood trauma and neuroticism as an adult: possible implication for the development of the common psychiatric disorders and suicidal behaviour. *Psychol Med*. 2002;32(8):1471-4.
17. Novais A, Monteiro S, Roque S, Correia-Neves M, Sousa N. How age, sex and genotype shape the stress response. *Neurobiol Stress*. 2017;6:44-56.
18. Herman JP, McKlveen JM, Ghosal S, Kopp B, Wulsin A, Makinson R, et al. Regulation of the Hypothalamic-Pituitary-Adrenocortical Stress Response. *Compr Physiol*. 2016;6(2):603-21.
19. Brunson KL, Avishai-Eliner S, Hatafski CG, Baram TZ. Neurobiology of the stress response early in life: evolution of a concept and the role of corticotropin releasing hormone. *Mol Psychiatry*. 2001;6(6):647-56.
20. Harbuz M, Russell JA, Sumner BE, Kawata M, Lightman SL. Rapid changes in the content of proenkephalin A and corticotrophin releasing hormone mRNAs in the paraventricular nucleus during morphine withdrawal in urethane-anaesthetized rats. *Brain Res Mol Brain Res*. 1991;9(4):285-91.

*De acordo com: *International Committee of Medical Journal Editors. Uniform requirements para manuscripts submitted to Biomedical Journals: sample references*. 2003 [atualizado em 02 de maio de 2018]. Disponível em: https://www.nlm.nih.gov/bsd/uniform_requirements.html

21. Pihoker C, Owens MJ, Kuhn CM, Schanberg SM, Nemeroff CB. Maternal separation in neonatal rats elicits activation of the hypothalamic-pituitary-adrenocortical axis: a putative role for corticotropin-releasing factor. *Psychoneuroendocrinology*. 1993;18(7):485-93.
22. Plotsky PM, Meaney MJ. Early, postnatal experience alters hypothalamic corticotropin-releasing factor (CRF) mRNA, median eminence CRF content and stress-induced release in adult rats. *Brain Res Mol Brain Res*. 1993;18(3):195-200.
23. Walker CD, Scribner KA, Cascio CS, Dallman MF. The pituitary-adrenocortical system of neonatal rats is responsive to stress throughout development in a time-dependent and stressor-specific fashion. *Endocrinology*. 1991;128(3):1385-95.
24. Dent GW, Okimoto DK, Smith MA, Levine S. Stress-induced alterations in corticotropin-releasing hormone and vasopressin gene expression in the paraventricular nucleus during ontogeny. *Neuroendocrinology*. 2000;71(6):333-42.
25. Hatałski CG, Guirguis C, Baram TZ. Corticotropin releasing factor mRNA expression in the hypothalamic paraventricular nucleus and the central nucleus of the amygdala is modulated by repeated acute stress in the immature rat. *J Neuroendocrinol*. 1998;10(9):663-9.
26. Ohta K, Miki T, Warita K, Suzuki S, Kusaka T, Yakura T, et al. Prolonged maternal separation disturbs the serotonergic system during early brain development. *Int J Dev Neurosci*. 2014;33:15-21.
27. McEwen BS. Early life influences on life-long patterns of behavior and health. *Mental retardation and developmental disabilities research reviews*. 2003;9(3):149-54.
28. Vetulani J. Early maternal separation: a rodent model of depression and a prevailing human condition. *Pharmacological reports : PR*. 2013;65(6):1451-61.
29. Sengupta P. The Laboratory Rat: Relating Its Age With Human's. *Int J Prev Med*. 2013;4(6):624-30.
30. Goldman-Rakic PS. The prefrontal landscape: implications of functional architecture for understanding human mentation and the central executive. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*. 1996;351(1346):1445-53.
31. Thompson-Schill SL, Jonides J, Marshuetz C, Smith EE, D'Esposito M, Kan IP, et al. Effects of frontal lobe damage on interference effects in working memory. *Cogn Affect Behav Neurosci*. 2002;2(2):109-20.
32. Aron AR, Robbins TW, Poldrack RA. Inhibition and the right inferior frontal cortex. *Trends Cogn Sci*. 2004;8(4):170-7.
33. Buschman TJ, Miller EK. Top-down versus bottom-up control of attention in the prefrontal and posterior parietal cortices. *Science*. 2007;315(5820):1860-2.
34. Gazzaley A, Rissman J, Cooney J, Rutman A, Seibert T, Clapp W, et al. Functional interactions between prefrontal and visual association cortex contribute to top-down modulation of visual processing. *Cereb Cortex*. 2007;17 Suppl 1:i125-35.
35. Kolb B, Mychasiuk R, Muhammad A, Li Y, Frost DO, Gibb R. Experience and the developing prefrontal cortex. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2012;109 Suppl 2:17186-93.
36. Yang Y, Cheng Z, Tang H, Jiao H, Sun X, Cui Q, et al. Neonatal Maternal Separation Impairs Prefrontal Cortical Myelination and Cognitive Functions in Rats Through Activation of Wnt Signaling. *Cereb Cortex*. 2017;27(5):2871-84.
37. Hurley KM, Herbert H, Moga MM, Saper CB. Efferent projections of the infralimbic cortex of the rat. *J Comp Neurol*. 1991;308(2):249-76.
38. Sesack SR, Deutch AY, Roth RH, Bunney BS. Topographical organization of the efferent projections of the medial prefrontal cortex in the rat: an anterograde tract-tracing study with Phaseolus vulgaris leucoagglutinin. *J Comp Neurol*. 1989;290(2):213-42.
39. Takagishi M, Chiba T. Efferent projections of the infralimbic (area 25) region of the medial prefrontal cortex in the rat: an anterograde tracer PHA-L study. *Brain Res*. 1991;566(1-2):26-39.
40. Santana N, Artigas F. Laminar and Cellular Distribution of Monoamine Receptors in Rat Medial Prefrontal Cortex. *Front Neuroanat*. 2017;11:87.
41. Puig MV, Gener T. Serotonin Modulation of Prefronto-Hippocampal Rhythms in Health and Disease. *ACS Chem Neurosci*. 2015;6(7):1017-25.

42. Conde F, Maire-Lepoivre E, Audinat E, Crepel F. Afferent connections of the medial frontal cortex of the rat. II. Cortical and subcortical afferents. *J Comp Neurol.* 1995;352(4):567-93.
43. McGarry LM, Carter AG. Inhibitory Gating of Basolateral Amygdala Inputs to the Prefrontal Cortex. *J Neurosci.* 2016;36(36):9391-406.
44. Eiland L, Ramroop J, Hill MN, Manley J, McEwen BS. Chronic juvenile stress produces corticolimbic dendritic architectural remodeling and modulates emotional behavior in male and female rats. *Psychoneuroendocrinology.* 2012;37(1):39-47.
45. Radley JJ, Gosselink KL, Sawchenko PE. A discrete GABAergic relay mediates medial prefrontal cortical inhibition of the neuroendocrine stress response. *J Neurosci.* 2009;29(22):7330-40.
46. Diorio D, Viau V, Meaney MJ. The role of the medial prefrontal cortex (cingulate gyrus) in the regulation of hypothalamic-pituitary-adrenal responses to stress. *J Neurosci.* 1993;13(9):3839-47.
47. Figueiredo HF, Bodie BL, Tauchi M, Dolgas CM, Herman JP. Stress integration after acute and chronic predator stress: differential activation of central stress circuitry and sensitization of the hypothalamo-pituitary-adrenocortical axis. *Endocrinology.* 2003;144(12):5249-58.
48. Figueiredo HF, Bruestle A, Bodie B, Dolgas CM, Herman JP. The medial prefrontal cortex differentially regulates stress-induced c-fos expression in the forebrain depending on type of stressor. *Eur J Neurosci.* 2003;18(8):2357-64.
49. Sullivan RM, Gratton A. Lateralized effects of medial prefrontal cortex lesions on neuroendocrine and autonomic stress responses in rats. *J Neurosci.* 1999;19(7):2834-40.
50. Crane JW, Ebner K, Day TA. Medial prefrontal cortex suppression of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis response to a physical stressor, systemic delivery of interleukin-1beta. *Eur J Neurosci.* 2003;17(7):1473-81.
51. Musazzi L, Marrocco J. Stress Response and Perinatal Reprogramming: Unraveling (Mal)adaptive Strategies. *Neural Plast.* 2016;2016:6752193.
52. Macri S, Laviola G. Single episode of maternal deprivation and adult depressive profile in mice: interaction with cannabinoid exposure during adolescence. *Behav Brain Res.* 2004;154(1):231-8.
53. Huot RL, Gonzalez ME, Ladd CO, Thirivikraman KV, Plotsky PM. Foster litters prevent hypothalamic-pituitary-adrenal axis sensitization mediated by neonatal maternal separation. *Psychoneuroendocrinology.* 2004;29(2):279-89.
54. McCormick CM, Kehoe P, Kovacs S. Corticosterone release in response to repeated, short episodes of neonatal isolation: evidence of sensitization. *Int J Dev Neurosci.* 1998;16(3-4):175-85.
55. Scheefhals N, MacGillavry HD. Functional organization of postsynaptic glutamate receptors. *Molecular and cellular neurosciences.* 2018;91:82-94.
56. Elgersma Y, Silva AJ. Molecular mechanisms of synaptic plasticity and memory. *Curr Opin Neurobiol.* 1999;9(2):209-13.
57. Pickering C, Gustafsson L, Cebere A, Nylander I, Liljequist S. Repeated maternal separation of male Wistar rats alters glutamate receptor expression in the hippocampus but not the prefrontal cortex. *Brain Res.* 2006;1099(1):101-8.
58. RM OC, Pusceddu MM, Dinan TG, Cryan JF. Impact of early-life stress, on group III mGlu receptor levels in the rat hippocampus: effects of ketamine, electroconvulsive shock therapy and fluoxetine treatment. *Neuropharmacology.* 2013;66:236-41.
59. Pape H-C, Pare D. Plastic Synaptic Networks of the Amygdala for the Acquisition, Expression, and Extinction of Conditioned Fear. *Physiological Reviews.* 2010;90(2):419-63.
60. Kim JJ, Diamond DM. The stressed hippocampus, synaptic plasticity and lost memories. *Nat Rev Neurosci.* 2002;3(6):453-62.
61. Yang CH, Huang CC, Hsu KS. Behavioral stress enhances hippocampal CA1 long-term depression through the blockade of the glutamate uptake. *J Neurosci.* 2005;25(17):4288-93.
62. Liu RJ, Aghajanian GK. Stress blunts serotonin- and hypocretin-evoked EPSCs in prefrontal cortex: role of corticosterone-mediated apical dendritic atrophy. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2008;105(1):359-64.

63. Kim JJ, Foy MR, Thompson RF. Behavioral stress modifies hippocampal plasticity through N-methyl-D-aspartate receptor activation. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1996;93(10):4750-3.
64. Moench KM, Wellman CL. Stress-induced alterations in prefrontal dendritic spines: Implications for post-traumatic stress disorder. *Neurosci Lett*. 2015;601:41-5.
65. Hains AB, Vu MA, Maciejewski PK, van Dyck CH, Gottron M, Arnsten AF. Inhibition of protein kinase C signaling protects prefrontal cortex dendritic spines and cognition from the effects of chronic stress. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2009;106(42):17957-62.
66. Radley JJ, Rocher AB, Miller M, Janssen WG, Liston C, Hof PR, et al. Repeated stress induces dendritic spine loss in the rat medial prefrontal cortex. *Cereb Cortex*. 2006;16(3):313-20.
67. Radley JJ, Anderson RM, Hamilton BA, Alcock JA, Romig-Martin SA. Chronic stress-induced alterations of dendritic spine subtypes predict functional decrements in an hypothalamo-pituitary-adrenal-inhibitory prefrontal circuit. *J Neurosci*. 2013;33(36):14379-91.
68. Yuen EY, Wei J, Liu W, Zhong P, Li X, Yan Z. Repeated stress causes cognitive impairment by suppressing glutamate receptor expression and function in prefrontal cortex. *Neuron*. 2012;73(5):962-77.
69. Muhammad A, Carroll C, Kolb B. Stress during development alters dendritic morphology in the nucleus accumbens and prefrontal cortex. *Neuroscience*. 2012;216:103-9.
70. Bock J, Gruss M, Becker S, Braun K. Experience-induced changes of dendritic spine densities in the prefrontal and sensory cortex: correlation with developmental time windows. *Cereb Cortex*. 2005;15(6):802-8.
71. Monroy E, Hernandez-Torres E, Flores G. Maternal separation disrupts dendritic morphology of neurons in prefrontal cortex, hippocampus, and nucleus accumbens in male rat offspring. *J Chem Neuroanat*. 2010;40(2):93-101.
72. Tully K, Bolshakov VY. Emotional enhancement of memory: how norepinephrine enables synaptic plasticity. *Mol Brain*. 2010;3:15.
73. Popoli M, Gennarelli M, Racagni G. Modulation of synaptic plasticity by stress and antidepressants. *Bipolar Disord*. 2002;4(3):166-82.
74. Meunier CN, Chameau P, Fossier PM. Modulation of Synaptic Plasticity in the Cortex Needs to Understand All the Players. *Front Synaptic Neurosci*. 2017;9:2.
75. Vidal R, Pilar-Cuellar F, dos Anjos S, Linge R, Treceno B, Vargas VI, et al. New strategies in the development of antidepressants: towards the modulation of neuroplasticity pathways. *Curr Pharm Des*. 2011;17(5):521-33.
76. Lesch KP, Waider J. Serotonin in the modulation of neural plasticity and networks: implications for neurodevelopmental disorders. *Neuron*. 2012;76(1):175-91.
77. Cowen DS. Serotonin and neuronal growth factors - a convergence of signaling pathways. *J Neurochem*. 2007;101(5):1161-71.
78. Foehring RC, Lorenzon NM. Neuromodulation, development and synaptic plasticity. *Can J Exp Psychol*. 1999;53(1):45-61.
79. Hannon J, Hoyer D. Molecular biology of 5-HT receptors. *Behav Brain Res*. 2008;195(1):198-213.
80. Errico M, Crozier RA, Plummer MR, Cowen DS. 5-HT(7) receptors activate the mitogen activated protein kinase extracellular signal related kinase in cultured rat hippocampal neurons. *Neuroscience*. 2001;102(2):361-7.
81. Pazos A, Palacios JM. Quantitative autoradiographic mapping of serotonin receptors in the rat brain. I. Serotonin-1 receptors. *Brain Res*. 1985;346(2):205-30.
82. Pazos A, Probst A, Palacios JM. Serotonin receptors in the human brain--III. Autoradiographic mapping of serotonin-1 receptors. *Neuroscience*. 1987;21(1):97-122.
83. Wong DT, Perry KW, Bymaster FP. Case history: the discovery of fluoxetine hydrochloride (Prozac). *Nat Rev Drug Discov*. 2005;4(9):764-74.
84. 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.

85. Ambar G, Chiavegatto S. Anabolic-androgenic steroid treatment induces behavioral disinhibition and downregulation of serotonin receptor messenger RNA in the prefrontal cortex and amygdala of male mice. *Genes Brain Behav.* 2009;8(2):161-73.
86. Chiavegatto S, Quadros IM, Ambar G, Miczek KA. Individual vulnerability to escalated aggressive behavior by a low dose of alcohol: decreased serotonin receptor mRNA in the prefrontal cortex of male mice. *Genes Brain Behav.* 2010;9(1):110-9.
87. Gartside SE, Hajos-Korcsok E, Bagdy E, Harsing LG, Jr., Sharp T, Hajos M. Neurochemical and electrophysiological studies on the functional significance of burst firing in serotonergic neurons. *Neuroscience.* 2000;98(2):295-300.
88. Groenewegen HJ, Uylings HB. The prefrontal cortex and the integration of sensory, limbic and autonomic information. *Prog Brain Res.* 2000;126:3-28.
89. Anisman H, Matheson K. Stress, depression, and anhedonia: caveats concerning animal models. *Neurosci Biobehav Rev.* 2005;29(4-5):525-46.
90. Chaouloff F. Physiopharmacological interactions between stress hormones and central serotonergic systems. *Brain Res Brain Res Rev.* 1993;18(1):1-32.
91. Rueter LE, Fornal CA, Jacobs BL. A critical review of 5-HT brain microdialysis and behavior. *Rev Neurosci.* 1997;8(2):117-37.
92. Petty F, Kramer G, Wilson L. Prevention of learned helplessness: in vivo correlation with cortical serotonin. *Pharmacol Biochem Behav.* 1992;43(2):361-7.
93. Sherman AD, Petty F. Additivity of neurochemical changes in learned helplessness and imipramine. *Behav Neural Biol.* 1982;35(4):344-53.
94. Tauscher J, Bagby RM, Javanmard M, Christensen BK, Kasper S, Kapur S. Inverse relationship between serotonin 5-HT_{1A} receptor binding and anxiety: a [¹¹C]WAY-100635 PET investigation in healthy volunteers. *Am J Psychiatry.* 2001;158(8):1326-8.
95. Drevets WC, Frank E, Price JC, Kupfer DJ, Holt D, Greer PJ, et al. PET imaging of serotonin 1A receptor binding in depression. *Biol Psychiatry.* 1999;46(10):1375-87.
96. Wu J, Kramer GL, Kram M, Steciuk M, Crawford IL, Petty F. Serotonin and learned helplessness: a regional study of 5-HT_{1A}, 5-HT_{2A} receptors and the serotonin transport site in rat brain. *J Psychiatr Res.* 1999;33(1):17-22.
97. Petty F, Sherman AD. Learned helplessness induction decreases in vivo cortical serotonin release. *Pharmacol Biochem Behav.* 1983;18(4):649-50.
98. Adell A, Garcia-Marquez C, Armario A, Gelpi E. Chronic stress increases serotonin and noradrenaline in rat brain and sensitizes their responses to a further acute stress. *J Neurochem.* 1988;50(6):1678-81.
99. Pei Q, Zetterstrom T, Fillenz M. Tail pinch-induced changes in the turnover and release of dopamine and 5-hydroxytryptamine in different brain regions of the rat. *Neuroscience.* 1990;35(1):133-8.
100. Inoue T, Tsuchiya K, Koyama T. Regional changes in dopamine and serotonin activation with various intensity of physical and psychological stress in the rat brain. *Pharmacol Biochem Behav.* 1994;49(4):911-20.
101. Holmes A. Genetic variation in cortico-amygdala serotonin function and risk for stress-related disease. *Neurosci Biobehav Rev.* 2008;32(7):1293-314.
102. Underwood MD, Kassir SA, Bakalian MJ, Galfalvy H, Mann JJ, Arango V. Neuron density and serotonin receptor binding in prefrontal cortex in suicide. *Int J Neuropsychopharmacol.* 2012;15(4):435-47.
103. Buhot MC. Serotonin receptors in cognitive behaviors. *Curr Opin Neurobiol.* 1997;7(2):243-54.
104. Dubovsky SL, Thomas M. Beyond specificity: effects of serotonin and serotonergic treatments on psychobiological dysfunction. *J Psychosom Res.* 1995;39(4):429-44.
105. Homberg JR, van den Hove DL. The serotonin transporter gene and functional and pathological adaptation to environmental variation across the life span. *Prog Neurobiol.* 2012;99(2):117-27.
106. McEwen BS. The ever-changing brain: cellular and molecular mechanisms for the effects of stressful experiences. *Dev Neurobiol.* 2012;72(6):878-90.

107. Calabrese F, Guidotti G, Middelmann A, Racagni G, Homberg J, Riva MA. Lack of serotonin transporter alters BDNF expression in the rat brain during early postnatal development. *Mol Neurobiol*. 2013;48(1):244-56.
108. Calabrese F, van der Doelen RH, Guidotti G, Racagni G, Kozicz T, Homberg JR, et al. Exposure to early life stress regulates Bdnf expression in SERT mutant rats in an anatomically selective fashion. *J Neurochem*. 2015;132(1):146-54.
109. Goodfellow NM, Benekareddy M, Vaidya VA, Lambe EK. Layer II/III of the prefrontal cortex: Inhibition by the serotonin 5-HT_{1A} receptor in development and stress. *J Neurosci*. 2009;29(32):10094-103.
110. Makino H, Malinow R. AMPA receptor incorporation into synapses during LTP: the role of lateral movement and exocytosis. *Neuron*. 2009;64(3):381-90.
111. Derkach VA, Oh MC, Guire ES, Soderling TR. Regulatory mechanisms of AMPA receptors in synaptic plasticity. *Nat Rev Neurosci*. 2007;8(2):101-13.
112. Schiapparelli L, Del Rio J, Frechilla D. Serotonin 5-HT receptor blockade enhances Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase II function and membrane expression of AMPA receptor subunits in the rat hippocampus: implications for memory formation. *J Neurochem*. 2005;94(4):884-95.
113. McEwen BS. Protection and damage from acute and chronic stress: allostasis and allostatic overload and relevance to the pathophysiology of psychiatric disorders. *Ann N Y Acad Sci*. 2004;1032:1-7.
114. Brown SM, Henning S, Wellman CL. Mild, short-term stress alters dendritic morphology in rat medial prefrontal cortex. *Cereb Cortex*. 2005;15(11):1714-22.
115. Ohashi S, Matsumoto M, Otani H, Mori K, Togashi H, Ueno K, et al. Changes in synaptic plasticity in the rat hippocampo-medial prefrontal cortex pathway induced by repeated treatments with fluvoxamine. *Brain Res*. 2002;949(1-2):131-8.
116. Normann C, Clark K. Selective modulation of Ca²⁺ influx pathways by 5-HT regulates synaptic long-term plasticity in the hippocampus. *Brain Res*. 2005;1037(1-2):187-93.
117. Bennett-Clarke CA, Chiaia NL, Rhoades RW. Thalamocortical afferents in rat transiently express high-affinity serotonin uptake sites. *Brain Res*. 1996;733(2):301-6.
118. Inaba M, Maruyama T, Yoshimura Y, Hosoi H, Komatsu Y. Facilitation of low-frequency stimulation-induced long-term potentiation by endogenous noradrenaline and serotonin in developing rat visual cortex. *Neurosci Res*. 2009;64(2):191-8.
119. Jones KA, Srivastava DP, Allen JA, Strachan RT, Roth BL, Penzes P. Rapid modulation of spine morphology by the 5-HT_{2A} serotonin receptor through kalirin-7 signaling. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2009;106(46):19575-80.
120. Kim HS, Jang HJ, Cho KH, Hahn SJ, Kim MJ, Yoon SH, et al. Serotonin inhibits the induction of NMDA receptor-dependent long-term potentiation in the rat primary visual cortex. *Brain Res*. 2006;1103(1):49-55.
121. Maya Vetencourt JF, Sale A, Viegi A, Baroncelli L, De Pasquale R, O'Leary OF, et al. The antidepressant fluoxetine restores plasticity in the adult visual cortex. *Science*. 2008;320(5874):385-8.
122. Meunier CN, Amar M, Lanfumey L, Hamon M, Fossier P. 5-HT_{1A} receptors direct the orientation of plasticity in layer 5 pyramidal neurons of the mouse prefrontal cortex. *Neuropharmacology*. 2013;71:37-45.
123. Puig MV, Gullledge AT. Serotonin and prefrontal cortex function: neurons, networks, and circuits. *Mol Neurobiol*. 2011;44(3):449-64.
124. Goldman-Rakic PS, Lidow MS, Gallager DW. Overlap of dopaminergic, adrenergic, and serotonergic receptors and complementarity of their subtypes in primate prefrontal cortex. *J Neurosci*. 1990;10(7):2125-38.
125. Heurteaux C, Lucas G, Guy N, El Yacoubi M, Thummler S, Peng XD, et al. Deletion of the background potassium channel TREK-1 results in a depression-resistant phenotype. *Nat Neurosci*. 2006;9(9):1134-41.

126. Hervieu GJ, Cluderay JE, Gray CW, Green PJ, Ranson JL, Randall AD, et al. Distribution and expression of TREK-1, a two-pore-domain potassium channel, in the adult rat CNS. *Neuroscience*. 2001;103(4):899-919.
127. Talley EM, Solorzano G, Lei Q, Kim D, Bayliss DA. Cns distribution of members of the two-pore-domain (KCNK) potassium channel family. *J Neurosci*. 2001;21(19):7491-505.
128. Honore E. The neuronal background K2P channels: focus on TREK1. *Nat Rev Neurosci*. 2007;8(4):251-61.
129. Kreneisz O, Benoit JP, Bayliss DA, Mulkey DK. AMP-activated protein kinase inhibits TREK channels. *J Physiol*. 2009;587(Pt 24):5819-30.
130. Medhurst AD, Rennie G, Chapman CG, Meadows H, Duckworth MD, Kelsell RE, et al. Distribution analysis of human two pore domain potassium channels in tissues of the central nervous system and periphery. *Brain Res Mol Brain Res*. 2001;86(1-2):101-14.
131. Noel J, Sandoz G, Lesage F. Molecular regulations governing TREK and TRAAK channel functions. *Channels*. 2011;5(5):402-9.
132. Deng PY, Poudel SK, Rojanathammanee L, Porter JE, Lei S. Serotonin inhibits neuronal excitability by activating two-pore domain k⁺ channels in the entorhinal cortex. *Molecular pharmacology*. 2007;72(1):208-18.
133. Ye D, Li Y, Zhang X, Guo F, Geng L, Zhang Q, et al. TREK1 channel blockade induces an antidepressant-like response synergizing with 5-HT receptor signaling. *Eur Neuropsychopharmacol*. 2015.
134. Chen C, Wang L, Rong X, Wang W, Wang X. Effects of fluoxetine on protein expression of potassium ion channels in the brain of chronic mild stress rats. *Acta Pharm Sin B*. 2015;5(1):55-61.
135. Lu L, Wang W, Peng Y, Li J, Wang L, Wang X. Electrophysiology and pharmacology of tandem domain potassium channel TREK-1 related BDNF synthesis in rat astrocytes. *Naunyn-Schmiedeberg's archives of pharmacology*. 2014;387(4):303-12.
136. Lee AK, Smart JL, Rubinstein M, Low MJ, Tse A. Reciprocal regulation of TREK-1 channels by arachidonic acid and CRH in mouse corticotropes. *Endocrinology*. 2011;152(5):1901-10.
137. Bittner S, Ruck T, Fernandez-Orth J, Meuth SG. TREK-king the blood-brain-barrier. *Journal of neuroimmune pharmacology : the official journal of the Society on NeuroImmune Pharmacology*. 2014;9(3):293-301.
138. Luscher C, Slesinger PA. Emerging roles for G protein-gated inwardly rectifying potassium (GIRK) channels in health and disease. *Nat Rev Neurosci*. 2010;11(5):301-15.
139. Menard C, Gaudreau P, Quirion R. Signaling pathways relevant to cognition-enhancing drug targets. *Handbook of experimental pharmacology*. 2015;228:59-98.
140. Esteban JA, Shi SH, Wilson C, Nuriya M, Huganir RL, Malinow R. PKA phosphorylation of AMPA receptor subunits controls synaptic trafficking underlying plasticity. *Nat Neurosci*. 2003;6(2):136-43.
141. Timmermans W, Xiong H, Hoogenraad CC, Krugers HJ. Stress and excitatory synapses: from health to disease. *Neuroscience*. 2013;248:626-36.
142. Segal-Hayoun Y, Cohen A, Zilberberg N. Molecular mechanisms underlying membrane-potential-mediated regulation of neuronal K2P2.1 channels. *Molecular and cellular neurosciences*. 2010;43(1):117-26.
143. Lamas JA, Fernandez-Fernandez D. Tandem pore TWIK-related potassium channels and neuroprotection. *Neural Regen Res*. 2019;14(8):1293-308.
144. Fink M, Duprat F, Lesage F, Reyes R, Romey G, Heurteaux C, et al. Cloning, functional expression and brain localization of a novel unconventional outward rectifier K⁺ channel. *EMBO J*. 1996;15(24):6854-62.
145. Kennard LE, Chumbley JR, Ranatunga KM, Armstrong SJ, Veale EL, Mathie A. Inhibition of the human two-pore domain potassium channel, TREK-1, by fluoxetine and its metabolite norfluoxetine. *Br J Pharmacol*. 2005;144(6):821-9.

146. Tsai SJ. Sipatrigine could have therapeutic potential for major depression and bipolar depression through antagonism of the two-pore-domain K⁺ channel TREK-1. *Medical hypotheses*. 2008;70(3):548-50.
147. Xi G, Zhang X, Zhang L, Sui Y, Hui J, Liu S, et al. Fluoxetine attenuates the inhibitory effect of glucocorticoid hormones on neurogenesis in vitro via a two-pore domain potassium channel, TREK-1. *Psychopharmacology (Berl)*. 2011;214(3):747-59.
148. Borsotto M, Veyssiere J, Moha Ou Maati H, Devader C, Mazella J, Heurteaux C. Targeting two-pore domain K⁽⁺⁾ channels TREK-1 and TASK-3 for the treatment of depression: a new therapeutic concept. *Br J Pharmacol*. 2015;172(3):771-84.
149. Dillon DG, Bogdan R, Fagerness J, Holmes AJ, Perlis RH, Pizzagalli DA. Variation in TREK1 gene linked to depression-resistant phenotype is associated with potentiated neural responses to rewards in humans. *Human brain mapping*. 2010;31(2):210-21.
150. Mazella J, Petrault O, Lucas G, Deval E, Beraud-Dufour S, Gandin C, et al. Spadin, a sortilin-derived peptide, targeting rodent TREK-1 channels: a new concept in the antidepressant drug design. *PLoS biology*. 2010;8(4):e1000355.
151. Moha Ou Maati H, Veyssiere J, Labbal F, Coppola T, Gandin C, Widmann C, et al. Spadin as a new antidepressant: absence of TREK-1-related side effects. *Neuropharmacology*. 2012;62(1):278-88.
152. McEwen BS, Nasca C, Gray JD. Stress Effects on Neuronal Structure: Hippocampus, Amygdala, and Prefrontal Cortex. *Neuropsychopharmacology*. 2016;41(1):3-23.
153. Romeo RD. The impact of stress on the structure of the adolescent brain: Implications for adolescent mental health. *Brain Res*. 2016.
154. Lyttle K, Ohmura Y, Konno K, Yoshida T, Izumi T, Watanabe M, et al. Repeated fluvoxamine treatment recovers juvenile stress-induced morphological changes and depressive-like behavior in rats. *Brain Res*. 2015;1616:88-100.
155. Sandoz G, Levitz J, Kramer RH, Isacoff EY. Optical control of endogenous proteins with a photoswitchable conditional subunit reveals a role for TREK1 in GABA(B) signaling. *Neuron*. 2012;74(6):1005-14.
156. Vertes RP. Interactions among the medial prefrontal cortex, hippocampus and midline thalamus in emotional and cognitive processing in the rat. *Neuroscience*. 2006;142(1):1-20.
157. Vertes RP. Differential projections of the infralimbic and prelimbic cortex in the rat. *Synapse*. 2004;51(1):32-58.
158. Holmes A, le Guisquet AM, Vogel E, Millstein RA, Leman S, Belzung C. Early life genetic, epigenetic and environmental factors shaping emotionality in rodents. *Neurosci Biobehav Rev*. 2005;29(8):1335-46.
159. WHO. Depression and Other Common Mental Disorders: Global Health Estimates. In: Organization WH, editor. World Health Organization. Geneva: World Health Organization; 2017.
160. Avenevoli S, Swendsen J, He JP, Burstein M, Merikangas KR. Major depression in the national comorbidity survey-adolescent supplement: prevalence, correlates, and treatment. *J Am Acad Child Adolesc Psychiatry*. 2015;54(1):37-44 e2.
161. Chi S, Wang C, Jiang T, Zhu XC, Yu JT, Tan L. The prevalence of depression in Alzheimer's disease: a systematic review and meta-analysis. *Current Alzheimer research*. 2015;12(2):189-98.
162. Diller GP, Brautigam A, Kempny A, Uebing A, Alonso-Gonzalez R, Swan L, et al. Depression requiring anti-depressant drug therapy in adult congenital heart disease: prevalence, risk factors, and prognostic value. *Eur Heart J*. 2015.
163. Prins SJ, Bates LM, Keyes KM, Muntaner C. Anxious? Depressed? You might be suffering from capitalism: contradictory class locations and the prevalence of depression and anxiety in the USA. *Sociology of health & illness*. 2015.
164. Kessler RC. Epidemiology of women and depression. *J Affect Disord*. 2003;74(1):5-13.
165. Kitay JI. Sex differences in adrenal cortical secretion in the rat. *Endocrinology*. 1961;68:818-24.
166. Goel N, Workman JL, Lee TT, Innala L, Viau V. Sex differences in the HPA axis. *Compr Physiol*. 2014;4(3):1121-55.

167. Cahill L. Why sex matters for neuroscience. *Nat Rev Neurosci*. 2006;7(6):477-84.
168. Baratta MV, Leslie NR, Fallon IP, Dolzani SD, Chun LE, Tamalunas AM, et al. Behavioural and neural sequelae of stressor exposure are not modulated by controllability in females. *Eur J Neurosci*. 2018;47(8):959-67.
169. Rincon-Cortes M, Herman JP, Lupien S, Maguire J, Shansky RM. Stress: Influence of sex, reproductive status and gender. *Neurobiol Stress*. 2019;10:100155.
170. Lippmann M, Bress A, Nemeroff CB, Plotsky PM, Monteggia LM. Long-term behavioural and molecular alterations associated with maternal separation in rats. *Eur J Neurosci*. 2007;25(10):3091-8.
171. Cotella EM, Mestres Lascano I, Franchioni L, Levin GM, Suarez MM. Long-term effects of maternal separation on chronic stress response suppressed by amitriptyline treatment. *Stress*. 2013;16(4):477-81.
172. de Kloet ER, Sibug RM, Helmerhorst FM, Schmidt MV. Stress, genes and the mechanism of programming the brain for later life. *Neurosci Biobehav Rev*. 2005;29(2):271-81.
173. Borsini F, Meli A. Is the forced swimming test a suitable model for revealing antidepressant activity? *Psychopharmacology (Berl)*. 1988;94(2):147-60.
174. Bodnoff SR, Suranyi-Cadotte BE, Quirion R, Meaney MJ. Role of the central benzodiazepine receptor system in behavioral habituation to novelty. *Behav Neurosci*. 1989;103(1):209-12.
175. Dulawa SC, Hen R. Recent advances in animal models of chronic antidepressant effects: the novelty-induced hypophagia test. *Neurosci Biobehav Rev*. 2005;29(4-5):771-83.
176. Ramaker MJ, Dulawa SC. Identifying fast-onset antidepressants using rodent models. *Mol Psychiatry*. 2017;22(5):656-65.
177. Avesar D, Gullledge AT. Selective serotonergic excitation of callosal projection neurons. *Front Neural Circuits*. 2012;6:12.
178. Jackman SL, Regehr WG. The Mechanisms and Functions of Synaptic Facilitation. *Neuron*. 2017;94(3):447-64.
179. Field A. *Discovering Statistics Using SPSS*. 3rd ed. California, USA: SAGE Publications Ltd.; 2009.
180. Wasserstein RL, Schirm AL, Lazar NA. Moving to a World Beyond “ $p < 0.05$ ”. *The American Statistician*. 2019;73(sup1):1-19.
181. Malatynska E, Steinbusch HW, Redkozubova O, Bolkunov A, Kubatiev A, Yeritsyan NB, et al. Anhedonic-like traits and lack of affective deficits in 18-month-old C57BL/6 mice: Implications for modeling elderly depression. *Exp Gerontol*. 2012;47(8):552-64.
182. Levine S. Infantile experience and consummatory behavior in adulthood. *J Comp Physiol Psychol*. 1957;50(6):609-12.
183. Champagne FA, Francis DD, Mar A, Meaney MJ. Variations in maternal care in the rat as a mediating influence for the effects of environment on development. *Physiol Behav*. 2003;79(3):359-71.
184. Lehmann J, Feldon J. Long-term biobehavioral effects of maternal separation in the rat: consistent or confusing? *Rev Neurosci*. 2000;11(4):383-408.
185. Kokras N, Antoniou K, Mikail HG, Kafetzopoulos V, Papadopoulou-Daifoti Z, Dalla C. Forced swim test: What about females? *Neuropharmacology*. 2015;99:408-21.
186. Dalla C, Antoniou K, Kokras N, Drossopoulou G, Papathanasiou G, Bekris S, et al. Sex differences in the effects of two stress paradigms on dopaminergic neurotransmission. *Physiol Behav*. 2008;93(3):595-605.
187. Romeo RD, Patel R, Pham L, So VM. Adolescence and the ontogeny of the hormonal stress response in male and female rats and mice. *Neurosci Biobehav Rev*. 2016;70:206-16.
188. Eiland L, Romeo RD. Stress and the developing adolescent brain. *Neuroscience*. 2013;249:162-71.
189. Dalley JW, Roiser JP. Dopamine, serotonin and impulsivity. *Neuroscience*. 2012;215:42-58.
190. Dalley JW, Theobald DE, Pereira EA, Li PM, Robbins TW. Specific abnormalities in serotonin release in the prefrontal cortex of isolation-reared rats measured during behavioural performance of

- a task assessing visuospatial attention and impulsivity. *Psychopharmacology (Berl)*. 2002;164(3):329-40.
191. Winstanley CA, Chudasama Y, Dalley JW, Theobald DE, Glennon JC, Robbins TW. Intra-prefrontal 8-OH-DPAT and M100907 improve visuospatial attention and decrease impulsivity on the five-choice serial reaction time task in rats. *Psychopharmacology (Berl)*. 2003;167(3):304-14.
192. Eklund MB, Arborelius L. Twice daily long maternal separations in Wistar rats decreases anxiety-like behaviour in females but does not affect males. *Behav Brain Res*. 2006;172(2):278-85.
193. Stroher R, de Oliveira C, Costa Lopes B, da Silva LS, Regner GG, Richardt Medeiros H, et al. Maternal deprivation alters nociceptive response in a gender-dependent manner in rats. *Int J Dev Neurosci*. 2019;76:25-33.
194. Tractenberg SG, Levandowski ML, de Azeredo LA, Orso R, Roithmann LG, Hoffmann ES, et al. An overview of maternal separation effects on behavioural outcomes in mice: Evidence from a four-stage methodological systematic review. *Neurosci Biobehav Rev*. 2016;68:489-503.
195. Freund N, Thompson BS, Denormandie J, Vaccarro K, Andersen SL. Windows of vulnerability: maternal separation, age, and fluoxetine on adolescent depressive-like behavior in rats. *Neuroscience*. 2013;249:88-97.
196. Renard GM, Rivarola MA, Suarez MM. Sexual dimorphism in rats: effects of early maternal separation and variable chronic stress on pituitary-adrenal axis and behavior. *Int J Dev Neurosci*. 2007;25(6):373-9.
197. Matthews K, Wilkinson LS, Robbins TW. Repeated maternal separation of preweanling rats attenuates behavioral responses to primary and conditioned incentives in adulthood. *Physiol Behav*. 1996;59(1):99-107.
198. Marco EM, Llorente R, Lopez-Gallardo M, Mela V, Llorente-Berzal A, Prada C, et al. The maternal deprivation animal model revisited. *Neurosci Biobehav Rev*. 2015;51:151-63.
199. Ellenbroek BA, Derks N, Park HJ. Early maternal deprivation retards neurodevelopment in Wistar rats. *Stress*. 2005;8(4):247-57.
200. Bland ST, Hargrave D, Pepin JL, Amat J, Watkins LR, Maier SF. Stressor controllability modulates stress-induced dopamine and serotonin efflux and morphine-induced serotonin efflux in the medial prefrontal cortex. *Neuropsychopharmacology*. 2003;28(9):1589-96.
201. Grahn RE, Will MJ, Hammack SE, Maswood S, McQueen MB, Watkins LR, et al. Activation of serotonin-immunoreactive cells in the dorsal raphe nucleus in rats exposed to an uncontrollable stressor. *Brain Res*. 1999;826(1):35-43.
202. Gabbott PL, Warner TA, Jays PR, Salway P, Busby SJ. Prefrontal cortex in the rat: projections to subcortical autonomic, motor, and limbic centers. *J Comp Neurol*. 2005;492(2):145-77.
203. Amat J, Matus-Amat P, Watkins LR, Maier SF. Escapable and inescapable stress differentially alter extracellular levels of 5-HT in the basolateral amygdala of the rat. *Brain Res*. 1998;812(1-2):113-20.
204. Franklin TB, Linder N, Russig H, Thony B, Mansuy IM. Influence of early stress on social abilities and serotonergic functions across generations in mice. *PLoS One*. 2011;6(7):e21842.
205. Fogaca MV, Reis FM, Campos AC, Guimaraes FS. Effects of intra-prelimbic prefrontal cortex injection of cannabidiol on anxiety-like behavior: involvement of 5HT1A receptors and previous stressful experience. *Eur Neuropsychopharmacol*. 2014;24(3):410-9.
206. Feder A, Nestler EJ, Charney DS. Psychobiology and molecular genetics of resilience. *Nat Rev Neurosci*. 2009;10(6):446-57.
207. Hasler G, Drevets WC, Manji HK, Charney DS. Discovering endophenotypes for major depression. *Neuropsychopharmacology*. 2004;29(10):1765-81.
208. Gee DG, Humphreys KL, Flannery J, Goff B, Telzer EH, Shapiro M, et al. A developmental shift from positive to negative connectivity in human amygdala-prefrontal circuitry. *J Neurosci*. 2013;33(10):4584-93.
209. Callaghan BL, Richardson R. Maternal separation results in early emergence of adult-like fear and extinction learning in infant rats. *Behav Neurosci*. 2011;125(1):20-8.

210. Gee DG, Gabard-Durnam LJ, Flannery J, Goff B, Humphreys KL, Telzer EH, et al. Early developmental emergence of human amygdala-prefrontal connectivity after maternal deprivation. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2013;110(39):15638-43.
211. Bocchio M, McHugh SB, Bannerman DM, Sharp T, Capogna M. Serotonin, Amygdala and Fear: Assembling the Puzzle. *Front Neural Circuits*. 2016;10:24.
212. Ishikawa C, Shiga T. The postnatal 5-HT_{1A} receptor regulates adult anxiety and depression differently via multiple molecules. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*. 2017;78:66-74.
213. Pollandt S, Drephal C, Albrecht D. 8-OH-DPAT suppresses the induction of LTP in brain slices of the rat lateral amygdala. *Neuroreport*. 2003;14(6):895-7.
214. Sardari M, Rezayof A, Zarrindast MR. 5-HT_{1A} receptor blockade targeting the basolateral amygdala improved stress-induced impairment of memory consolidation and retrieval in rats. *Neuroscience*. 2015;300:609-18.
215. Palacios JM. Serotonin receptors in brain revisited. *Brain Res*. 2016;1645:46-9.
216. Schmitz D, Gloveli T, Empson RM, Draguhn A, Heinemann U. Serotonin reduces synaptic excitation in the superficial medial entorhinal cortex of the rat via a presynaptic mechanism. *J Physiol*. 1998;508 (Pt 1):119-29.
217. Schiller L, Jahkel M, Kretschmar M, Brust P, Oehler J. Autoradiographic analyses of 5-HT_{1A} and 5-HT_{2A} receptors after social isolation in mice. *Brain Res*. 2003;980(2):169-78.
218. Samuels BA, Anacker C, Hu A, Levinstein MR, Pickenhagen A, Tsetsenis T, et al. 5-HT_{1A} receptors on mature dentate gyrus granule cells are critical for the antidepressant response. *Nat Neurosci*. 2015;18(11):1606-16.
219. Santarelli L, Saxe M, Gross C, Surget A, Battaglia F, Dulawa S, et al. Requirement of hippocampal neurogenesis for the behavioral effects of antidepressants. *Science*. 2003;301(5634):805-9.
220. Djillani A, Mazella J, Heurteaux C, Borsotto M. Role of TREK-1 in Health and Disease, Focus on the Central Nervous System. *Front Pharmacol*. 2019;10:379.
221. Sharp BM. Basolateral amygdala and stress-induced hyperexcitability affect motivated behaviors and addiction. *Transl Psychiatry*. 2017;7(8):e1194.
222. Terburg D, Morgan BE, Montoya ER, Hooge IT, Thornton HB, Hariri AR, et al. Hypervigilance for fear after basolateral amygdala damage in humans. *Transl Psychiatry*. 2012;2:e115.
223. Prager EM, Bergstrom HC, Wynn GH, Braga MF. The basolateral amygdala gamma-aminobutyric acidergic system in health and disease. *J Neurosci Res*. 2016;94(6):548-67.
224. Eichenbaum H. A cortical-hippocampal system for declarative memory. *Nat Rev Neurosci*. 2000;1(1):41-50.
225. Kronmüller KT, Pantel J, Kohler S, Victor D, Giesel F, Magnotta VA, et al. Hippocampal volume and 2-year outcome in depression. *Br J Psychiatry*. 2008;192(6):472-3.
226. Yun S, Reynolds RP, Petrof I, White A, Rivera PD, Segev A, et al. Stimulation of entorhinal cortex-dentate gyrus circuitry is antidepressive. *Nat Med*. 2018;24(5):658-66.
227. Ribak CE, Shapiro LA. Ultrastructure and synaptic connectivity of cell types in the adult rat dentate gyrus. *Prog Brain Res*. 2007;163:155-66.
228. Valenti O, Grace AA. Entorhinal cortex inhibits medial prefrontal cortex and modulates the activity states of electrophysiologically characterized pyramidal neurons in vivo. *Cereb Cortex*. 2009;19(3):658-74.
229. Sanberg CD, Jones FL, Do VH, Dieguez D, Jr., Derrick BE. 5-HT_{1A} receptor antagonists block perforant path-dentate LTP induced in novel, but not familiar, environments. *Learn Mem*. 2006;13(1):52-62.
230. Melzer S, Michael M, Caputi A, Eliava M, Fuchs EC, Whittington MA, et al. Long-range-projecting GABAergic neurons modulate inhibition in hippocampus and entorhinal cortex. *Science*. 2012;335(6075):1506-10.
231. Liu W, Ge T, Leng Y, Pan Z, Fan J, Yang W, et al. The Role of Neural Plasticity in Depression: From Hippocampus to Prefrontal Cortex. *Neural Plast*. 2017;2017:6871089.

232. Li N, Lee B, Liu RJ, Banasr M, Dwyer JM, Iwata M, et al. mTOR-dependent synapse formation underlies the rapid antidepressant effects of NMDA antagonists. *Science*. 2010;329(5994):959-64.
233. Gerhard DM, Wohleb ES, Duman RS. Emerging treatment mechanisms for depression: focus on glutamate and synaptic plasticity. *Drug Discov Today*. 2016;21(3):454-64.
234. Carhart-Harris RL, Nutt DJ. Serotonin and brain function: a tale of two receptors. *J Psychopharmacol*. 2017;31(9):1091-120.
235. Weng W, Chen Y, Wang M, Zhuang Y, Behnisch T. Potentiation of Schaffer-Collateral CA1 Synaptic Transmission by eEF2K and p38 MAPK Mediated Mechanisms. *Front Cell Neurosci*. 2016;10:247.
236. Hu B, Doods H, Treede RD, Ceci A. Duloxetine and 8-OH-DPAT, but not fluoxetine, reduce depression-like behaviour in an animal model of chronic neuropathic pain. *Neurosci Lett*. 2016;619:162-7.
237. Qi X, Xu H, Wang L, Zhang Z. Comparison of Therapeutic Effects of TREK1 Blockers and Fluoxetine on Chronic Unpredicted Mild Stress Sensitive Rats. *ACS Chem Neurosci*. 2018;9(11):2824-31.
238. Fagni L, Dumuis A, Sebben M, Bockaert J. The 5-HT₄ receptor subtype inhibits K⁺ current in colliculi neurones via activation of a cyclic AMP-dependent protein kinase. *Br J Pharmacol*. 1992;105(4):973-9.
239. Beique JC, Campbell B, Perring P, Hamblin MW, Walker P, Mladenovic L, et al. Serotonergic regulation of membrane potential in developing rat prefrontal cortex: coordinated expression of 5-hydroxytryptamine (5-HT)_{1A}, 5-HT_{2A}, and 5-HT₇ receptors. *J Neurosci*. 2004;24(20):4807-17.
240. Ye D, Li Y, Zhang X, Guo F, Geng L, Zhang Q, et al. TREK1 channel blockade induces an antidepressant-like response synergizing with 5-HT_{1A} receptor signaling. *Eur Neuropsychopharmacol*. 2015;25(12):2426-36.
241. Lin DH, Zhang XR, Ye DQ, Xi GJ, Hui JJ, Liu SS, et al. The Role of the Two-Pore Domain Potassium Channel TREK-1 in the Therapeutic Effects of Escitalopram in a Rat Model of Poststroke Depression. *CNS Neurosci Ther*. 2015;21(6):504-12.
242. Moha ou Maati H, Bourcier-Lucas C, Veyssiere J, Kanzari A, Heurteaux C, Borsotto M, et al. The peptidic antidepressant spadin interacts with prefrontal 5-HT₄ and mGluR(2) receptors in the control of serotonergic function. *Brain Struct Funct*. 2016;221(1):21-37.
243. Hirsch JC, Crepel F. Use-dependent changes in synaptic efficacy in rat prefrontal neurons in vitro. *J Physiol*. 1990;427:31-49.
244. Matsuda Y, Marzo A, Otani S. The presence of background dopamine signal converts long-term synaptic depression to potentiation in rat prefrontal cortex. *J Neurosci*. 2006;26(18):4803-10.
245. Vickery RM, Morris SH, Bindman LJ. Metabotropic glutamate receptors are involved in long-term potentiation in isolated slices of rat medial frontal cortex. *J Neurophysiol*. 1997;78(6):3039-46.
246. Devader C, Khayachi A, Veyssiere J, Moha Ou Maati H, Roulot M, Moreno S, et al. In vitro and in vivo regulation of synaptogenesis by the novel antidepressant spadin. *Br J Pharmacol*. 2015;172(10):2604-17.
247. Schwippel T, Schroeder PA, Fallgatter AJ, Plewnia C. Clinical review: The therapeutic use of theta-burst stimulation in mental disorders and tinnitus. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*. 2019;92:285-300.