



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ**  
**FACULDADE DE MEDICINA**  
**DEPARTAMENTO DE FISIOLOGIA E FARMACOLOGIA**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FARMACOLOGIA**

**CAMILLA TEIXEIRA PINHEIRO GUSMÃO**

**AVALIAÇÃO DA PERSISTÊNCIA DE ALTERAÇÕES COMPORTAMENTAIS E  
NEUROQUÍMICAS NO MODELO DE DEPRESSÃO INDUZIDA POR  
CORTICOSTERONA EM RATOS.**

**FORTALEZA**

**2022**

CAMILLA TEIXEIRA PINHEIRO GUSMÃO

**AVALIAÇÃO DA PERSISTÊNCIA DE ALTERAÇÕES COMPORTAMENTAIS E  
NEUROQUÍMICAS NO MODELO DE DEPRESSÃO INDUZIDA POR  
CORTICOSTERONA EM RATOS.**

Dissertação submetida à Coordenação do Programa de Pós-Graduação em Farmacologia da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Farmacologia. Área de concentração: Neuropsicofarmacologia  
Orientador: Prof. Dr David de Freitas Lucena

**FORTALEZA**

**2022**

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação  
Universidade Federal do Ceará  
Sistema de Bibliotecas

Gerada automaticamente pelo módulo Catalog, mediante os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

---

- G99a Gusmão, Camilla Teixeira Pinheiro.  
Avaliação da persistência de alterações comportamentais e neuroquímicas no modelo de depressão induzida por corticosterona em ratos / Camilla Teixeira Pinheiro Gusmão. – 2022.  
90 f. : il. color.
- Dissertação (mestrado) – Universidade Federal do Ceará, Faculdade de Medicina, Programa de Pós-Graduação em Farmacologia, Fortaleza, 2022.  
Orientação: Prof. Dr. David de Freitas Lucena.
1. Depressão. 2. Corticosterona. 3. Plasticidade Neuronal. I. Título.

CDD 615.1

---

CAMILLA TEIXEIRA PINHEIRO GUSMÃO

**AVALIAÇÃO DA PERSISTÊNCIA DE ALTERAÇÕES COMPORTAMENTAIS E  
NEUROQUÍMICAS NO MODELO DE DEPRESSÃO INDUZIDA POR  
CORTICOSTERONA EM RATOS.**

Dissertação submetida à Coordenação do Programa de Pós-Graduação em Farmacologia da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Farmacologia. Área de concentração: Neuropsicofarmacologia  
Orientador: Prof. Dr. David de Freitas Lucena

Aprovada em: 29/07/2022.

SEI/UFC - 3236236 - Ata de Defesa

[https://sei.ufc.br/sei/controlador.php?acao=documento\\_imprimir\\_web&...](https://sei.ufc.br/sei/controlador.php?acao=documento_imprimir_web&...)



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO  
UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ  
REITORIA  
FACULDADE DE MEDICINA  
PROGRAMA DE PÓS GRADUAÇÃO EM FARMACOLOGIA

**ATA DA SESSÃO PÚBLICA DE DEFESA DE DISSERTAÇÃO DE Mestrado DE CAMILLA TEIXEIRA PINHEIRO GUSMÃO REALIZADA NO DIA VINTE E NOVE DE JULHO DE DOIS MIL E VINTE E DOIS.**

Às quatorze horas do dia vinte e nove do mês de julho do ano de dois mil e vinte e dois, através de videoconferência, devido às medidas de segurança contra o COVID-19, conforme recomendação constante no Provimento nº 2/CONSUNI de 16 de março de 2020, realizou-se a Sessão Pública de Defesa de Dissertação de Mestrado da discente Camilla Teixeira Pinheiro Gusmão. O trabalho tinha como título: AVALIAÇÃO DA PERSISTÊNCIA DE ALTERAÇÕES COMPORTAMENTAIS E NEUROQUÍMICAS NO MODELO DE DEPRESSÃO INDUZIDA POR CORTICOSTERONA EM RATOS. Compunham a Banca Examinadora os Professores Doutores: David Freitas de Lucena, Orientador, Howard Lopes Ribeiro Junior e Samira da Silva Valvassori. A sessão foi aberta pelo Coordenador do Programa de Pós-Graduação em Farmacologia, o Professor Doutor Roberto César Pereira Lima Júnior, que fez a apresentação da Banca Examinadora e em seguida passou a palavra para o Professor Doutor David Freitas de Lucena, que fez algumas considerações e logo depois solicitou à aluna que desse início ao trabalho. Após a apresentação seguiu-se o processo de arguição da Mestranda. A primeira examinadora foi a Professora Doutora Samira da Silva Valvassori seguida pelos Professores Doutores Howard Lopes Ribeiro Junior e David Freitas de Lucena. Logo após a Banca Examinadora reuniu-se reservadamente a fim de avaliar o desempenho da candidata. Por unanimidade, a Banca Examinadora considerou aprovado o trabalho de Dissertação da Mestranda. Nada mais havendo a relatar, a Sessão Pública foi encerrada às dezessete horas. E eu, Milena Janaiana Jales Martins, Assistente em Administração do Programa de Pós-graduação em Farmacologia, lavrei a presente ata, que depois de lida e aprovada, será assinada por mim e pelos membros da Banca Examinadora. Fortaleza, Ceará, vinte e nove de julho de dois mil e vinte e dois.

**Prof. Dr. David Freitas de Lucena - UFC**  
Orientador

**Prof. Dr. Howard Lopes Ribeiro Junior - UFC**  
Membro da Banca Examinadora

**Profa. Dra. Samira da Silva Valvassori - UNESC**  
Membro da Banca Examinadora

546<sup>3</sup>

Dedico esse trabalho:

À Deus.

Aos meus filhos, Clara, Eduardo e Lucas

Ao meu esposo, Jonas

Aos meus pais, Ricardo e Stela.

## AGRADECIMENTOS

A Deus, por me dar oportunidades diárias de testar minha resiliência e crescer como ser humano.

Aos meus pais Francisco Ricardo Barbosa Pinheiro e Stela Maria Teixeira Pinheiro por sua fé, dignidade e perseverança na minha educação e de meus irmãos.

Aos meus filhos Clara Pinheiro Gusmão, Lucas Pinheiro Gusmão e Eduardo Pinheiro Gusmão que em sua inocência me deram ânimo para continuar esse desafio.

Ao meu esposo Jonas Nogueira Ferreira Maciel Gusmão pela participação ativa nos procedimentos experimentais e na divisão dos cuidados da nossa família.

Ao Prof. Dr. David de Freitas Lucena, meu orientador, a quem agradeço o empenho, sabedoria e compreensão.

À Profa. Dra. Danielle Macedo, que com sua disponibilidade sempre me atende com gentileza e atenção, tornando ainda maior minha admiração como pessoa, brilhante profissional e grande pesquisadora. Meus sinceros agradecimentos.

À Profa. Dra. Silvânia Maria Mendes de Vasconcelos, à Profa. Dra. Caren Nádia Soares de Sousa e à Prof. Dra. Lia Lira Olivier Sanders por sua disponibilidade em participar da banca de qualificação desta dissertação, por suas substanciais contribuições, enriquecendo os resultados obtidos neste trabalho.

À Profa. Dra. Samira da Silva Valvassori e ao Prof. Dr. Howard Lopes Ribeiro Junior por aceitarem participar da banca de defesa desta dissertação, proporcionando discussões e sugestões que servirão para o crescimento, aprendizado e incentivo pessoal na minha carreira como pesquisadora.

À Dra. Deniele Bezerra Lós que assumiu como se fosse seu o meu projeto, ensinando-me as técnicas laboratoriais necessárias para a realização desse trabalho.

Ao Dr. Helson Freitas da Silveira pela contribuição no planejamento e execução dos experimentos.

Aos colegas Khetyma Moreira Fonseca, Manuel Alves dos Santos Junior e Nayana Soares Gomes que dividiram comigo a responsabilidade do experimento com os animais.

A todos do Programa de Pós-Graduação em Fisiologia e Farmacologia por seus excelentes trabalhos e auxílios essenciais neste trajeto e por apoiar continuamente a evolução da qualidade formativa deste programa.

Ao CNPq e à CAPES, pelo auxílio financeiro às pesquisas.

“A humanidade precisa antes de tudo, se libertar da submissão a slogans absurdos e voltar a confiar na sensatez e na razão.”

Ludwig Von Mises

## RESUMO

A depressão é um transtorno mental grave e recorrente, com manifestações clínicas heterogêneas e etiologia complexa que combina fatores clínico-epidemiológicos, celulares e moleculares. A associação de distúrbios da plasticidade sináptica à patogênese da depressão, redirecionou tratamentos na busca de substâncias que se oponham aos efeitos celulares do estresse e da depressão. O estresse aumenta os níveis circulantes de glicocorticoides e a administração de corticosterona exógena é capaz de induzir sintomas depressivo-símile em animais. No presente estudo, objetivamos investigar os mecanismos relacionados à plasticidade sináptica e a regulação do eixo Hipotálamo-Pituitária-Adrenal (HPA) em um modelo experimental de depressão induzida por corticosterona. Ratos Wistar (n = 36) foram tratados com corticosterona (40mg/kg) durante 21 dias. No 21º ou no 28º dia do protocolo (21 dias de administração de corticosterona e 7 dias de suspensão da droga), os animais foram avaliados quanto aos aspectos comportamentais e, em seguida, eutanasiados. Amostras do hipocampo e hipotálamo foram coletadas para análises. Os animais tratados com corticosterona apresentaram fenótipo depressivo e o mantiveram após a suspensão da droga. Foi encontrada redução da expressão de *GRIN1* (NR1) no hipotálamo e aumento da imunomarcagem de NMDA no hipocampo dos animais tratados com corticosterona. Houve redução da expressão de *DLG4* (PSD95) no hipotálamo e da proteína PSD95 no hipocampo dos animais tratados. Tais alterações não foram mantidas após 7 dias de suspensão da droga. A expressão de *NR3C2* (MR) estava reduzida no hipocampo dos animais tratados com corticosterona e foi restaurada após 7 dias de suspensão do fármaco. Adicionalmente, houve aumento da expressão de metaloproteinase de matriz-2 no hipocampo que reduziu significativamente após 7 dias de suspensão da corticosterona. Tomados em conjunto esses achados apontam para o enfraquecimento das sinapses no hipocampo e o rearranjo estrutural hipotalâmico no modelo de corticosterona. A recuperação na expressão de *NR3C2* (MR) bem como redução da expressão de *MMP2* após cessada a administração de corticosterona pode representar um mecanismo inicial de reversão dos sintomas depressivo-símile no modelo.

**Palavras-chave:** Depressão, Corticosterona, Plasticidade Neuronal.

## **THE PERSISTENCE OF BEHAVIORAL AND NEUROCHEMICAL CHANGES IN THE CORTICOSTERONE-INDUCED DEPRESSION MODEL IN RATS.**

Depression is a severe and recurrent mental disorder, with heterogeneous clinical manifestations and a complex etiology that combines clinical-epidemiological, cellular, and molecular factors. The association of synaptic plasticity disorders with the pathogenesis of depression has redirected treatments in the search for substances that oppose the cellular effects of stress and depression. The stress increases circulating levels of glucocorticoids and the administration of exogenous corticosterone can induce depressive-like symptoms in animals. In order to evaluate the mechanisms related to synaptic plasticity and the regulation of the Hypothalamus-Pituitary-Adrenal (HPA) axis in the model of corticosterone-induced depression, Wistar rats (n = 36) were treated with corticosterone (40mg/kg) for 21 days. On the 21st or 28th day of the protocol (21 days of corticosterone administration and 7 days of drug suspension), the animals were evaluated for behavioral aspects and then euthanized. Samples of the hippocampus and hypothalamus were collected for analysis. The animals treated with corticosterone showed a depressive phenotype and maintained it after discontinuation of the drug. A reduction in GRIN1 (NR1) expression was found in the hypothalamus and an increase in NMDA immunostaining in the hippocampus of animals treated with corticosterone. There was a reduction in the expression of DLG4 (PSD95) in the hypothalamus and of the PSD95 protein in the hippocampus of the treated animals. Such changes were not maintained after 7 days of drug discontinuation. NR3C2 (MR) expression was reduced in the hippocampus of corticosterone-treated animals and was restored after 7 days of drug withdrawal. Additionally, there was an increase in the expression of matrix metalloproteinase-2 in the hippocampus, which significantly reduced after 7 days of corticosterone suspension. Taken together these findings point to the weakening of synapses in the hippocampus and the hypothalamic structural rearrangement in the corticosterone model. Recovery in NR3C2 (MR) expression and reduction in MMP2 expression after cessation of corticosterone administration may represent an initial mechanism of reversal of depressive-like symptoms in this model.

**Keywords:** Depression, Corticosterone, Neuronal Plasticity.

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Representação da estrutura da matriz do <i>Research Domain Criteria</i> .....	15
<b>Figura 2.</b> Representação da atividade do eixo hipotálamo-pituitária-adrenal .....	19
<b>Figura 3.</b> Desenho experimental .....	28
<b>Figura 4.</b> Localização do corte encefálico contendo o hipocampo .....	33
<b>Figura 5.</b> Efeito da administração de corticosterona e da suspensão do fármaco sobre a evolução ponderal dos animais .....	35
<b>Figura 6.</b> Efeito da administração de corticosterona e da suspensão do fármaco na atividade locomotora dos animais .....	36
<b>Figura 7.</b> Efeito da administração de corticosterona e da suspensão do fármaco na memória de trabalho no teste do labirinto em Y.....	37
<b>Figura 8.</b> Efeito da administração de corticosterona e da suspensão do fármaco no tempo de imobilidade dos animais no teste da suspensão pela cauda .....	38
<b>Figura 9.</b> Efeito da administração de corticosterona e da suspensão do fármaco no tempo de imobilidade dos animais no teste do nado forçado .....	39
<b>Figura 10.</b> Efeito da administração de corticosterona e da suspensão do fármaco no peso das adrenais .....	40
<b>Figura 11.</b> Efeito da administração de corticosterona e da suspensão do fármaco na expressão gênica de <i>GRIN1</i> e <i>DLG4</i> no hipocampo e hipotálamo .....	41
<b>Figura 12.</b> Efeito da administração de corticosterona e da suspensão do fármaco na expressão gênica de <i>NR3C1</i> e <i>NR3C2</i> no hipocampo e hipotálamo .....	42
<b>Figura 13.</b> Imunoexpressão do marcador NMDA nas regiões DG, CA1, CA2 e CA3 do hipocampo de ratos submetidos ao modelo de depressão induzida por corticosterona e após suspensão do fármaco .....	43
<b>Figura 14.</b> Efeito da administração de corticosterona e da suspensão do fármaco na imunoexpressão de NMDA no hipocampo .....	47
<b>Figura 15.</b> Imunoexpressão do marcador PSD95 nas regiões DG, CA1, CA2 e CA3 do hipocampo de ratos submetidos ao modelo de depressão induzida por corticosterona e após suspensão do fármaco.....	48
<b>Figura 16.</b> Efeito da administração de corticosterona e da suspensão do fármaco na imunoexpressão de PSD95 no hipocampo .....	52

<b>Figura 17.</b> Imunoexpressão do marcador GR nas regiões DG, CA1, CA2 e CA3 do hipocampo de ratos submetidos ao modelo de depressão induzida por corticosterona e após suspensão do fármaco .....	53
<b>Figura 18.</b> Efeito da administração de corticosterona e da suspensão do fármaco na imunoexpressão de GR no hipocampo .....	57
<b>Figura 19.</b> Imunoexpressão do marcador MMP2 nas regiões DG, CA1, CA2 e CA3 do hipocampo de ratos submetidos ao modelo de depressão induzida por corticosterona e após suspensão do fármaco .....	58
<b>Figura 20.</b> Efeito da administração de corticosterona e da suspensão do fármaco na imunoexpressão de MMP2 no hipocampo .....	49

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ACTH	Hormônio adrenocorticotrófico
AMPA	Amino-3-hidroxi-5-metil-4 isoxazolpropionato
BDNF	Fator neutrófico derivado do cérebro
CaMKII	Quinase dependente de Ca <sup>2+</sup> /Calmodulina tipo II
CRF	Hormônio liberador de corticotrofina
E-LTP	Potenciação de longa duração inicial
GCs	Glicocorticoides
GR	Receptores glicocorticoides
HPA	Eixo hipotálamo-pituitária-adrenal
L-LTP	Potenciação de longa duração tardia
LPS	Lipopolissacarídeo
LTD	Depressão de longa duração
m-BDNF	Fator neutrófico derivado do cérebro maduro
MMP	Metaloproteinases da matriz
MR	Receptores mineralocorticoides
NGF	Fator de Crescimento Neural
NIMH	<i>National Institute of Mental Health</i>
NMDAR	Receptor N-Metil-D-Aspartato
NT-3	Neurofina-3
NT-4	Neurofina-4
p75 <sup>NTR</sup>	Receptor de neurofinas p75
PFC	Córtex pré-frontal
PSD95	Proteína de densidade pós-sináptica 95
PSD	Densidade pós-sináptica
PVN	Núcleo paraventricular
RDoC	<i>Research Domain Criteria</i>
STP	Potenciação de curta duração
TDM	Transtorno Depressivo Maior
TrkA	Receptor tirosina quinase A
TrkB	Receptor tirosina quinase B
TrkC	Receptor tirosina quinase C

## SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO .....	14
1.1 Etiologia e classificação da depressão .....	14
1.2 O modelo de depressão induzido pela administração de corticosterona .....	16
1.3 Fisiologia e regulação do eixo Hipotálamo-Pituitária-Adrenal (HPA) .....	17
1.4 Plasticidade sináptica e o receptor N-Metil-D-Aspartato (NMDA).....	20
1.5 Metaloproteinases de Matrix .....	22
1.6 Neuroanatomia, comportamentos mal adaptativos e sintomas depressivos .....	23
2. JUSTIFICATIVA E RELEVÂNCIA .....	25
3. OBJETIVOS .....	26
4. MÉTODOS .....	27
4.1 Animais .....	27
4.2 Protocolo experimental .....	27
4.2.1 Protocolo de depressão induzida por corticosterona .....	27
4.2.2 Avaliação ponderal dos animais .....	28
4.2.3 Avaliação comportamental .....	28
4.2.4 Avaliação do peso das adrenais .....	30
4.3 Análise de expressão dos genes <i>GRIN1</i> , <i>DLG4</i> , <i>NR3C1</i> e <i>NR3C2</i> .....	30
4.4 Expressão de NMDA, PSD95, GR e MMP2 por imunofluorescência .....	32
4.5 Análise estatística .....	33
5. RESULTADOS.....	34
5.1 Avaliação ponderal .....	34
5.2. Avaliação comportamental .....	35
5.3 Efeito da administração de corticosterona e da suspensão do fármaco sobre o peso das adrenais .....	39
5.4 Expressão gênica qPCR em amostras de hipocampo e hipotálamo de ratos no modelo de depressão induzida pela administração de corticosterona e após suspensão do fármaco .....	40
5.5 Expressão de NMDA, PSD95, GR e MMP2 no hipocampo de ratos no modelo de depressão induzida pela administração de corticosterona e após suspensão do fármaco .....	42
6. DISCUSSÃO .....	63
7. CONCLUSÃO .....	70
REFERÊNCIAS .....	71
APÊNDICE A Aprovação do projeto pela Comissão de Ética no Uso de Animais .....	90

## 1 INTRODUÇÃO

### 1.1 Etiologia e classificação da depressão

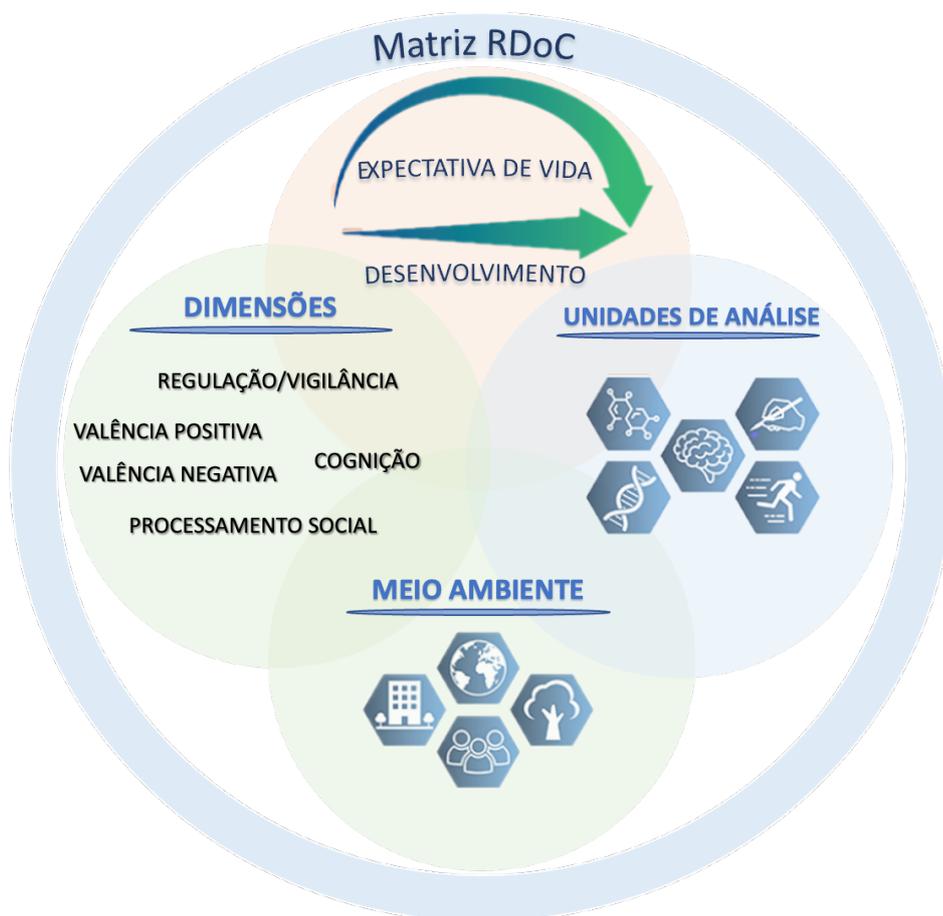
As doenças neuropsiquiátricas apresentam manifestações clínicas heterogêneas e sua patogênese advém da combinação de complexos fatores genéticos, biológicos, ambientais e comportamentais (NOTARAS; VAN DEN BUUSE, 2020). As doenças psiquiátricas apresentam diversas expressões fenotípicas, incluindo prejuízos cognitivos e na regulação emocional, sintomas motores e neurovegetativos que se sobrepõem entre várias entidades diagnósticas, tornando problemáticas as distinções categóricas baseadas em sintomas com o propósito de descobrir substratos fisiopatológicos (DEAN; KESHAVAN, 2017). Do mesmo modo, em relação ao transtorno depressivo maior (TDM), as classificações atuais são limitadas e não consideram suas particularidades neurobiológicas que ajudariam a caracterizar os pacientes, direcionando tratamentos para subtipos específicos da doença (ROSS; FOSTER; IONESCU, 2017).

Diversos mecanismos são implicados na fisiopatologia do TDM, a saber: alterações nos sistemas serotoninérgico, noradrenérgico, dopaminérgico e glutamatérgico, aumento da inflamação, anormalidades do eixo hipotálamo-pituitária-adrenal (HPA), diminuição da neurogênese e da neuroplasticidade (LIMA-OJEDA; RUPPRECHT; BAGHAI, 2018). No entanto, esses achados não estão presentes em todos os pacientes. Com o objetivo de ligar a psicopatologia às mais recentes descobertas neurobiológicas, o *National Institute of Mental Health* (NIMH), a principal agência americana de pesquisa em saúde mental, desenvolveu o chamado *Research Domain Criteria* (RDoC) para classificação dos transtornos mentais com finalidade de pesquisa (CUTHBERT; INSEL, 2013). Além de integrar componentes comportamentais, neurobiológicos, genéticos, ambientais e experienciais, a iniciativa propõe-se a abranger a heterogeneidade dos transtornos mentais, representados pela ampla gama de variações entre os extremos saudável e doente (CUTHBERT, 2016) (Figura 1).

O TDM abrange dois domínios do RDoC: o construto Perda, no domínio Sistemas de Valências Negativas, e o construto Recompensa, no Sistemas de Valências Positivas (MORRIS; CUTHBERT, 2012). No construto Perda, as principais alterações estão nos circuitos córtico-límbicos e na rede de modo padrão (do inglês *default mode network*); em genes que regulam a neurotransmissão de monoaminas; no papel dos glicocorticoides, hormônios sexuais, oxitocina, vasopressina e citocinas a nível molecular; na atividade do sistema nervoso autônomo, do eixo HPA e na regulação neuroimune (AHMED *et al.*, 2018). Ainda no construto

perda, na unidade de comportamento são contemplados os sintomas de tristeza, anedonia, culpa, pensamentos mórbidos, retardo psicomotor, déficits nas funções executivas, prejuízos no sono, apetite e libido, ruminação e vieses na atenção e memória e, na unidade auto-relatos, estilos atributivos e desesperança (WOODY; GIBB, 2015). No construto Recompensa, as principais redes de processamento envolvidas são corpo estriado, córtex orbitofrontal e córtex pré-frontal ventro-medial. Em relação ao comportamento destacam-se a responsividade reduzida à recompensa, déficits na decisão baseada na recompensa e perda do interesse em experiências positivas (NUSSLOCK; ALLOY, 2017).

**Figura 1.** Representação da estrutura da matriz do *Research Domain Criteria* (RDoC)



Fonte: Adaptado de: <https://www.nimh.nih.gov/research/research-funded-by-nimh/rdoc/about-rdoc>

No sistema de classificação RDoC, as mudanças em todos os níveis neurobiológicos, das moléculas às redes neurais, estão relacionadas a domínios comportamentais definidos, e tem o objetivo de compreender como essas funções neurobiológicas podem se tornar

desreguladas e relacionar essa desregulação a sintomas relevantes (SALLES *et al.*, 2020). O estudo da depressão com base na estrutura RDoC tem a vantagem de direcionar as investigações na pesquisa básica e translacional, justificando a validade e a confiabilidade de modelos animais baseados em endofenótipos dos transtornos psiquiátricos. Adicionalmente, colabora com um sistema de diagnóstico que considera as bases biológicas e psicossociais dos transtornos mentais, implementando os conceitos de medicina preditiva em psiquiatria e viabilizando tratamentos mais individualizados (ANDERZHANOVA; KIRMEIER; WOTJAK, 2017).

## 1.2 O modelo de depressão induzido pela administração de corticosterona

O estresse é um importante fator ambiental relacionado ao surgimento da depressão e diferentes modelos animais tem sido usados para tentar determinar seu impacto no metabolismo (LI *et al.*, 2017). Qualquer modelo consegue representar apenas parcialmente os achados da depressão, sejam desregulações moleculares ou endofenótipos, que alteram comportamentos ou desfechos biológicos específicos, o que limita o desenvolvimento e aperfeiçoamento das terapêuticas (STERNER; KALYNCHUK, 2010).

Mudanças neurobiológicas produzidas pela exposição repetida ao estressor podem ser acessadas por modelos experimentais como o estresse crônico imprevisível e estresse repetido por contenção, por exemplo (GURURAJAN *et al.*, 2019). Esses modelos baseados no estresse são considerados relevantes pois promovem mudanças comportamentais depressivo-símile, como surgimento de anedonia e redução da sensibilidade à recompensa, e tais alterações podem ser revertidas por tratamentos antidepressivos (DE SOUSA, *et al.*, 2022; STREKALOVA *et al.*, 2022). Apesar disso, sua reprodutibilidade é, por vezes, reportada como insuficiente (NESTLER; GOULD; MANJI, 2002). Uma justificativa em potencial é que os estímulos estressores aplicados no modelo podem diferir entre si em termos físicos e psicológicos e as características absolutas do estímulo podem ser diferentes das percebidas, resultando em níveis diferentes de ativação do eixo HPA, aumentando a variabilidade do modelo (GREGUS *et al.*, 2005b).

A administração de corticosterona exógena assegura controle sobre os níveis de glicocorticóides circulantes, reproduz os sintomas observados em pacientes com TDM (ARAKI *et al.*, 2021; LEBEDEVA; CARUNCHO; KALYNCHUK, 2017a) e respondem aos tratamento farmacológicos e não farmacológicos (CHAVES *et al.*, 2019; DAVID *et al.*, 2009). Apesar de ser um modelo confiável para o estudo do comportamento e da neurobiologia da depressão, sem a interferência de habituação dos animais e de fatores psicossociais, a dose necessária para

produzir o fenótipo depressivo é frequentemente suprafisiológica (STERNER; KALYNCHUK, 2010).

O TDM é uma condição frequentemente recorrente, em que um episódio aumenta a probabilidade dos demais e alguns modelos podem ser ajustados para tentar representar essa característica. Por exemplo, após exposição a repetidos ciclos de tratamento com corticosterona, os sintomas depressivos se reestabelecem depois de um período mais curto, sugerindo que os animais ficam sensíveis aos efeitos deletérios da droga (LEBEDEVA *et al.*, 2020). Essa recorrência rápida de sintomas depressivos-símile também foi observada quando ratos são submetidos a ciclos repetidos de estresse crônico moderado e se evidencia pela redução no consumo de sacarose pelos ratos estressados em comparação aos animais controle (REMUS; JAMISON; JOHNSON, 2013).

A importância de conhecer as limitações dos modelos animais disponíveis está na possibilidade de elaborar metodologias mais consistentes e robustas que acessem de modo mais preciso a depressão e permitam a construção de uma teoria racional que explique e teste a etiologia da doença (PLANCHEZ; SURGET; BELZUNG, 2019; WILLNER, 2005).

### 1.3 Fisiologia e regulação do eixo Hipotálamo-Pituitária-Adrenal (HPA)

A exposição ao estresse é um dos múltiplos fatores que participam da patogênese da depressão e eventos graves como divórcio, perda de um ente querido, adoecimento ou pressões do ambiente promovem a ativação do eixo HPA e o aumento dos glicocorticoides circulantes, uma condição necessária e indispensável para o indivíduo administrar agudamente esses desafios (DOBLER *et al.*, 2019; STERNER; KALYNCHUK, 2010). Adicionalmente, os efeitos fisiológicos disparados pelos glicocorticoides permitem a memorização e a integração das informações aprendidas sobre o estressor, facilitando a resposta a demandas semelhantes no futuro (FINSTERWALD; ALBERINI, 2014).

A ativação do eixo HPA, frente a um estresse agudo, mobiliza uma série de hormônios. Por exemplo, neurônios localizados no núcleo paraventricular (PVN) do hipotálamo secretam o hormônio liberador de corticotrofina (CRF) que, na hipófise anterior, estimula a secreção do hormônio adrenocorticotrófico (ACTH) (RAUBENHEIMER *et al.*, 2006). Esse, uma vez no córtex da adrenal, estimula a produção e liberação de glicocorticoides, cujos efeitos agudos, de modo resumido, consistem em limitar funções fisiológicas que não sejam essenciais e disponibilizar energia para o indivíduo gerenciar o estresse (KARACA; GROSSMAN; KELESTIMUR, 2021). A inibição desse eixo se dá pela ação dos glicocorticoides no PVN,

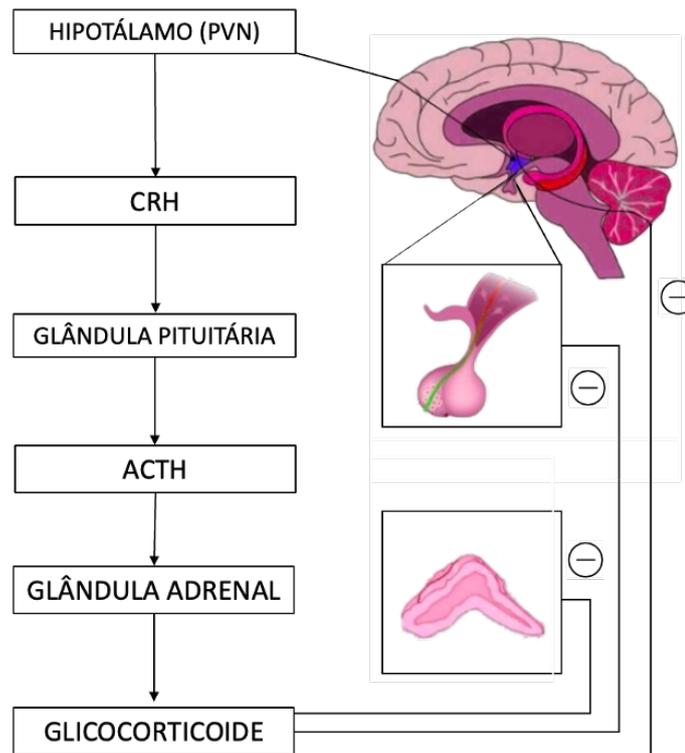
via receptores glicocorticoides (GR) e mineralocorticoides (MR) (KELLER-WOOD, 2015). Entretanto, a falha das estratégias comportamentais, metabólicas, hormonais e neuroquímicas em desativar esse sistema pode precipitar um episódio depressivo (GOLD, 2015a) (Figura 2).

De fato, expressivas alterações na regulação do eixo HPA são encontradas em indivíduos deprimidos. São exemplos a resistência aos glicocorticoides no hipotálamo, prejudicando o feedback negativo do eixo HPA (CERNACKOVA *et al.*, 2020), a expressão de citocinas inflamatórias levando ao aumento inapropriado de glicocorticoides (GOSHEN; YIRMIYA, 2009) e a supressão da neurogênese no hipocampo (NUMAKAWA; ODAKA; ADACHI, 2017).

Os GR são codificados pelo gene do receptor nuclear subfamília 3 grupo C membro 1 (*NR3C1*) e estão amplamente distribuídos nos mamíferos em diversos tecidos. Suas ações imediatas são mediadas por isoformas GR localizados na membrana, influenciando o transporte de íons e a atividade de outros receptores (KÖHLER *et al.*, 2020; LU, NICK, CIDLOWSKI, 2006). A inibição rápida da secreção de ACTH na hipófise anterior e a regulação basal do cálcio intracelular são exemplos dessas ações. Por outro lado, as ações nucleares dos GR demoram de horas a dias para surgirem e dependem da interação desses com elementos de resposta aos glicocorticoides ou com fatores de transcrição, regulando sua expressão gênica (DUMA; JEWELL; CIDLOWSKI, 2006). Os MR são codificados pelo gene *NR3C2* e expressos predominantemente em áreas límbicas (hipocampo, amígdala e córtex pré-frontal), onde são co-expressos com GR. Apresentam afinidade aos glicocorticóides cerca de dez vezes maior que os GR (HARRIS *et al.*, 2013). Em condições basais, eles estão predominantemente ocupados e representam o limiar para a resposta ao estresse à medida que a concentração de glicocorticóides aumenta e os GR são ocupados (GJERSTAD; LIGHTMAN; SPIGA, 2018).

Ambos os receptores, GR e MR, têm papéis complementares na consolidação da memória e comportamentos adaptativos. Frente a um estressor, MRs aumentam o nível de atenção e vigilância para reconhecer e avaliar o risco da ameaça (BERARDELLI *et al.*, 2013). Paralelamente, ativam simultaneamente hipocampo e amígdala, promovendo a recuperação de estratégias de resposta previamente aprendidas (*coping*) e resposta de luta ou fuga, respectivamente. Estressores fracos conduzem predominantemente à ativação do hipocampo em detrimento da hiperativação da amígdala. A consolidação da memória e do estilo de *coping*, acontece por intermédio de GR no hipocampo e córtex pré-frontal (PFC) e podem ser recuperadas e usadas no futuro (MOURTZI; SERTEDAKI; CHARMANDARI, 2021).

**Figura 2.** Representação da atividade do eixo hipotálamo-pituitária-adrenal



Ativação do eixo HPA. Neurônios localizados no PVN do hipotálamo e secretam CRF que, na hipófise anterior, estimula a secreção do ACTH que, por sua vez, estimula a produção e liberação de glicocorticoides pelo córtex da adrenal. A inibição do eixo se dá pela ação dos glicocorticoides no PVN e pela inibição da secreção de CRH e ACTH. Abreviações: PVN = núcleo paraventricular; CRF = hormônio liberador de corticotrofina; ACTH = hormônio adrenocorticotrófico. Fonte: Adaptado de MOURTZI; SERTEDAKI; CHARMANDARI, 2021.

O desequilíbrio entre GR e MR centrais impacta na regulação do eixo HPA e confere importante susceptibilidade à depressão (YUEN; WEI; YAN, 2017). O estresse inicialmente aumenta a expressão de MR no hipocampo, mas a exposição crônica a reduz, resultando em redução da razão MR:GR (OAKLEY et al., 2021). A ativação de MR recruta fatores de crescimento e parece ser um pré-requisito para eventos neuroplásticos positivos. Na depressão, a expressão de MR está reduzida no hipocampo e a administração de antidepressivos é capaz de aumentá-la (MCEWEN; AKIL, 2020).

O GR é responsável por regular a expressão de diversos genes que participam da formação da memória de longa duração, e dependendo da natureza do estímulo estressor, contribuem para alteração da neurogênese hipocampal, promovendo ou prejudicando o aprendizado e memória (SOUSA, Nuno; CERQUEIRA; ALMEIDA, 2008). Ações rápidas mediadas pelo GR também controlam a liberação de glutamato e modulam a transmissão e a

plasticidade sináptica no hipocampo, amígdala e córtex pré-frontal. Estímulos que favorecem o aprendizado, atuam modulando o tráfego e a expressão de receptores amino-3-hidroxi-5-metil-4 isoxazolpropionato (AMPA) pós-sinápticos. Por outro lado, em condições de estresse elevado ou prolongado, a ativação de GR pode ter um efeito negativo na transmissão glutamatérgica por meio da ativação de receptores N-Metil-D-Aspartato (NMDA) (FINSTERWALD; ALBERINI, 2014).

#### 1.4 Plasticidade sináptica e o receptor N-Metil-D-Aspartato (NMDA)

Os receptores NMDA são amplamente expressos no sistema nervoso central e responsáveis por inúmeras funções cerebrais e regulação dos circuitos do humor. É um receptor ionotrópico localizado na membrana celular e que apresenta alta permeabilidade ao cálcio dotado de importante papel na plasticidade sináptica (COLLINGRIDGE; ABRAHAM, 2022). É um heterodímero – tetrâmero - cuja combinação das unidades homólogas NR1, NR2 e NR3 lhe confere propriedades funcionais distintas. Os receptores NMDA co-expressam ao menos uma subunidade NR1 e uma NR2 às quais se ligam respectivamente os co-agonistas D-serina ou glicina e o glutamato (PAOLETTI; NEYTON, 2007).

O glutamato tem função na detoxificação da amônia e na síntese de peptídeos e proteínas, além da sua bem conhecida função excitatória. Como está presente em concentrações elevadas no meio intracelular, faz-se necessário um processo eficiente de regulação a fim de controlar os níveis extracelulares, garantindo a melhora neurotransmissão e a mínima excitotoxicidade (MAGI *et al.*, 2019). Flutuações atípicas na homeostase do glutamato sináptico levam à atividade aberrante do receptor NMDA que está implicada na patogênese de distúrbios neurológicos e psiquiátricos (COSTA *et al.*, 2021).

O uso da cetamina, um bloqueador do receptor NMDA, como antidepressivo de ação rápida direcionou o entendimento da depressão como um distúrbio de déficits sináptico e, conseqüentemente, orientou a busca de tratamentos que aumentem a plasticidade sináptica e se oponham aos efeitos celulares do estresse e da depressão (GERHARD; WOHLEB; DUMAN, 2016). A formação e manutenção da arquitetura sináptica envolve interações inter e intracelulares complexas e entre os principais mecanismos conhecidos estão a potenciação de longa duração (*long-term potentiation* - LTP) e a depressão de longa duração (*long-term depression* - LTD) (LEDONNE; MERCURI, 2020). A LTP é uma forma de fortalecimento da sinapse que ocorre quando as células pré-sinápticas estão ativas e as pós-sinápticas fortemente despolarizadas, podendo ser observada cerca de 30 minutos após a indução. Posteriormente

durante a LTP ocorre a ampliação estrutural da sinapse que para tanto, requer síntese proteica e demora algumas horas para acontecer. A LTD ocorre na presença estímulos persistentes de baixa frequência e pode reverter a LTP estabelecida (LISMAN, 2017).

A plasticidade sináptica envolve a sinalização entre os neurônios pré e pós-sinápticos e a glia, destacando-se o influxo de cálcio ( $\text{Ca}^{2+}$ ) via receptores NMDA, que dependendo do nível de ativação, estado de fosforilação, subunidades de que é composto e localização pós-sináptica, combinados com as diferentes vias de sinalização passíveis de serem ativadas, determinam em qual direção a plasticidade sináptica será dirigida (MALENKA; BEAR, 2004). A potenciação envolve a adição de receptores AMPA contendo as subunidades GluR1, GluR4 e GluR2L às sinapses, enquanto a remoção e renovação do AMPAR durante LTD requer a participação das subunidades GluR2, GluR3 e GluR4c (DIERING; HUGANIR, 2018). Receptores NMDA sinápticos diminuem na LTD e a expressão e a proporção da subunidade NR2 também se alteram durante LTP e LTD (MARSDEN, 2013).

No início da LTP há despolarização do terminal pós-sináptico que abre os receptores NMDA, promovendo influxo de  $\text{Ca}^{2+}$  e ativação da quinase dependente de  $\text{Ca}^{2+}$ /Calmodulina tipo II (CaMKII) a qual, por mecanismos ainda incertos, está envolvida na difusão de receptores AMPA da membrana extra-sináptica para membrana pós-sináptica, os quais ancoram-se na proteína de densidade pós-sináptica 95 (PSD95), resultando no fortalecimento da transmissão e ampliação da sinapse (BARABÁS *et al.*, 2018; KESSELS; MALINOW, 2009).

A densidade pós-sináptica (PSD) é uma área densa localizada dentro das espinhas dendríticas das sinapses excitatórias e é composta por receptores, quinases, proteínas estruturais e moléculas sinalizadoras associadas à plasticidade sináptica. Talvez a proteína mais abundante do PSD seja a PSD95 (CHENG *et al.*, 2006). A proteína PSD95 tem sua expressão regulada por subunidades de AMPA (GluR) e desempenha um papel fundamental na função sináptica, sendo responsável por organizar a densidade sináptica excitatória pós-sináptica (MA *et al.*, 2021). A manutenção da LTP depende da transcrição genética e regulação da síntese de proteínas neuronais dendríticas e somáticas como BDNF (fator neurotrófico derivado do cérebro), receptor tirosina quinase B (TrkB), PSD95, CaMKII e GluR1 (SHONESY *et al.*, 2014; SÜDHOF, 2021).

A exposição ao estresse ou aos glicocorticoides promove o aumento rápido do glutamato nos terminais pré-sinápticos por mecanismos que envolvem os GR no PFC e MR no hipocampo, além de prolongar a resposta nos receptores NMDA e AMPA através do aumento no número desses receptores na membrana plasmática nos neurônios pós-sinápticos (TRECCANI *et al.*,

2014). É importante destacar que o tratamento prévio com antidepressivos é capaz de evitar a liberação de glutamato frente a um estresse agudo. O estresse também afeta a transmissão glutamatérgica inibindo a LTP no hipocampo e nos circuitos amígdala-PFC, tálamo-PFC e hipocampo-PFC, relacionados à memória de trabalho e flexibilidade comportamental. (POPOLI *et al.*, 2012).

As vias de sinalização envolvidas nos efeitos do estresse e glicocorticóides sobre os receptores glutamatérgicos carecem de investigação. Há algumas evidências apontando para participação da família de genes quinase sérica induzidas por glicocorticóides e a ativação de proteínas da família *Rab*, que participa da reciclagem dos receptores AMPA na membrana sináptica no estresse agudo. No que diz respeito aos mecanismos disparados pelo estresse crônico, as evidências são ainda mais escassas (KADRIU *et al.*, 2019; KARST; JOËLS, 2005).

### 1.5 Metaloproteinases de Matriz

As Metaloproteinases de Matriz (MMP) constituem um grande grupo de endopeptidases zinco-dependentes que possuem a capacidade de clivar constituintes proteicos da matriz extracelular, além de ativar ou inativar outras moléculas sinalizadoras, como receptores, moléculas de adesão e fatores de crescimento (LARONHA; CALDEIRA, 2020; VERSLEGERS *et al.*, 2013). São fisiologicamente expressas no sistema nervoso central em neurônios, astrócitos e micróglia, e sua elevação aberrante contribui para uma série de doenças (LI, Hongmin *et al.*, 2022). MMP2 e -9, por exemplo, são rapidamente supereguladas após isquemia cerebral focal em ratos, contribuindo para a destruição tecidual no acidente vascular cerebral (YONG; POWER; EDWARDS, 2001), estão envolvidas de forma importante na angiogênese tumoral (PANDIT *et al.*, 2022) e na neuroinflamação em doenças como esclerose múltipla e meningite bacteriana (ROSENBERG, 2002).

A injeção de lipopolissacarídeo (LPS) provoca elevação na expressão cerebral de MMP-2, -3 e -7 (MUN-BRYCE *et al.*, 2002; SHI *et al.*, 2014). Em circunstâncias normais, há expressão constitutiva de MMP-2 pelos astrócitos, que pode ser ativada durante o estresse celular, acionando vários mecanismos, como secreção de MMP-9 por células T circulantes, ativação da pró-MMP-3, possivelmente pelo sistema plasminogênio/plasmina na membrana que por sua vez pode ativar a pró-MMP-9, levando à amplificação do dano celular (CHANG; STANFILL; POURMOTABBED, 2016).

Estudos *post-mortem* encontraram atividade e expressão de mRNA de MMP-2 aumentada em pacientes com depressão do que nos controles (BOBIŃSKA *et al.*, 2016a).

Adicionalmente, o risco de apresentar TDM recorrente tem sido relacionado a polimorfismos nos genes que codificam MMP2, -7 e -9 (BOBIŃSKA *et al.*, 2016b). Entretanto, nem todas as ações das MMP são deletérias. MMP-9 pode aumentar o equilíbrio excitatório/inibitório geral e a dinâmica da população neuronal, que são importantes para o humor e a memória (MARTINELLI *et al.*, 2021). Além disso, a venlafaxina aumenta a expressão de PSD95 por um mecanismo dependente de MMP-9 (ALAIYED *et al.*, 2020).

### 1.6 Neuroanatomia, comportamentos mal adaptativos e sintomas depressivos

Apesar de não fazerem parte do diagnóstico do episódio depressivo ou da individualização da terapêutica, alterações morfológicas são frequentemente reportadas em estudos de neuroimagem em indivíduos deprimidos. Há evidências de redução volumétrica na substância cinzenta de circuitos límbicos e regiões corticais e subcorticais na depressão desde o primeiro episódio, refletindo reduções de neurônios e células da glia (TESEN *et al.*, 2022). Além dessas, há alterações funcionais envolvendo, por exemplo, córtex cingulado anterior, PFC e amígdala na depressão, refletindo prejuízo na regulação emocional (FU; FAN; DAVATZIKOS, 2020)

A atrofia do hipocampo, que também ocorre em outros distúrbios mentais, é encontrada em indivíduos com risco familiar elevado para TDM e correlaciona-se com a duração e a recorrência dos episódios depressivos (SURGET; BELZUNG, 2022). O hipocampo é um importante componente na formação da memória episódica, aprendizagem espacial, flexibilidade cognitiva e modulação de processos emocionais, sendo capaz de integrar informações sensoriais, temporais e espaciais e construir representações passíveis de serem recuperadas a partir de estímulos do ambiente (TODA *et al.*, 2019). A relação do hipocampo com o TDM é evidenciada pelos achados de redução do volume hipocampal e dos progenitores neurais em indivíduos deprimidos e pela reversão dessa alteração pelo tratamento antidepressivo, embora não haja consenso sobre o papel da neurogênese hipocampal decorrente do efeito dos antidepressivos (PALOMERO-GALLAGHER; AMUNTS, 2022; WILLNER; SCHEEL-KRÜGER; BELZUNG, 2013). Modelos animais como estresse crônico imprevisível, derrota social, estresse precoce e administração de glicocorticoides afetam a neurogênese particularmente do giro denteado (KRISHNAN; NESTLER, 2008; SURGET; BELZUNG, 2022). Acredita-se que as células do giro denteado sejam importantes na modulação da resposta ao estresse, possivelmente por intermédio da regulação do eixo HPA, porém tais mecanismos ainda são incertos (TODA *et al.*, 2019).

O hipotálamo recebe projeções anatômicas da amígdala, do PFC e núcleo accumbens, participando das respostas relacionadas a recompensa, memória e aprendizado (PRICE; DREVETS, 2010). As investigações post-mortem do hipotálamo sugerem uma diminuição de volume no hipotálamo em indivíduos com distúrbios afetivos (SCHINDLER *et al.*, 2012). Entretanto, há aumento da região produtora de CRH no PVN em pacientes com transtornos do humor, consistente com a hiperatividade do eixo HPA (BAO *et al.*, 2005). Além disso, pacientes com depressão psicótica apresentam redução da conectividade funcional entre o hipotálamo e o córtex subgenua (SUDHEIMER *et al.*, 2015). Outras evidências em torno da importância do hipotálamo no surgimento de sintomas depressivos são a associação entre alterações comportamentais e inflamação hipotalâmica (DIONYSOPOULOU *et al.*, 2021) e a redução da neurogênese hipocampal e comprometimento da memória relacionados à exposição crônica aos glicocorticóides e ao aumento da expressão de GR (CARTER *et al.*, 2009).

Os dados funcionais e neuroanatômicos sugerem que alterações no controle neuroendócrino, marcadamente a hiperatividade do eixo HPA, estão associadas à disfunção do sistema límbico induzidas pelo estresse observadas nas patologias psiquiátricas. Contudo, os mecanismos neuroquímicos que regulam essas vias e aumentam a susceptibilidade aos transtornos mentais carecem de investigação (HERMAN; CULLINAN, 1997).

## 2 JUSTIFICATIVA E RELEVÂNCIA

A depressão é uma síndrome severa com alta prevalência e impacto socioeconômico e está como a segunda causa mundial de anos vividos com incapacidade (GBD 2019 MENTAL DISORDERS COLLABORATORS et al., 2022). A alta prevalência do transtorno na população geral, a longa duração dos episódios, principalmente na fase economicamente produtiva da vida adulta, e o tratamento aquém do ideal, em que os pacientes mantêm resposta incompleta, são fatores que contribuem para o impacto econômico e social da doença (VOS *et al.*, 2017).

O estresse tem sido reconhecido como um fator importante para o surgimento de transtornos do humor, sendo um dos principais fatores de risco ambientais precipitadores da depressão. Frente a estressores físicos e psicológicos o eixo HPA é desinibido. A secreção de cortisol promove os efeitos fisiológicos necessários ao enfrentamento do estressor. Entretanto, a persistência desse ciclo, se não regulado, pode levar à depressão (GJERSTAD; LIGHTMAN; SPIGA, 2018).

O modelo de depressão induzida pela administração de corticosterona dispara alterações no eixo HPA similares às observadas em pacientes deprimidos e alterações comportamentais como o aumento do tempo de imobilidade nos teste do nado forçado e da suspensão pela cauda e aumento da anedonia representado pela redução da preferência pela sacarose. Além disso, os animais apresentam redução do ganho ponderal, resposta hormonal diminuída ao estresse, redução da proliferação celular e neurogênese no hipocampo e mudanças na neurotransmissão serotoninérgica (PLANCHEZ; SURGET; BELZUNG, 2019).

Estudos detalhados dos modelos animais, com enfoque não apenas na presença ou ausência de sintomas depressivos, mas nos achados moleculares subjacentes ao clínicos, podem levar ao entendimento dos mecanismos biológicos da depressão e à escolha de alvos mais precisos para o desenvolvimento de novos tratamentos. Assim, buscou-se neste estudo investigar os efeitos ocasionados por um modelo experimental de depressão induzida pela administração de corticosterona, e após a suspensão do fármaco, sob a expressão dos genes *GRIN1* (NR1), *DLG4* (PSD95), *NR3C1* (GR) e *NR3C2* (MR) em regiões do hipocampo e hipotálamo e em relação ao perfil de expressão hipocampal de marcadores NMDA, PSD95, GR e MMP2. Espera-se com esse estudo, contribuir para ampliação da capacidade de investigar a depressão e desenvolver novas alternativas terapêuticas.

### 3 OBJETIVOS

#### 3.1 Geral

Avaliar as alterações comportamentais e neuroquímicas no hipocampo e no hipotálamo de ratos induzidos à depressão pela administração de corticosterona e após a suspensão do fármaco.

#### 3.2 Específicos

Avaliar o fenótipo depressivo em ratos após administração de corticosterona e após o período de suspensão do fármaco frente à evolução ponderal, peso das adrenais e perfil comportamental;

Determinar os efeitos da administração de corticosterona e do período de suspensão do fármaco nas regiões do hipocampo e do hipotálamo em relação ao perfil de expressão dos genes *GRIN1* (NR1), *DLG4* (PSD95), *NR3C1* (GR) e *NR3C2* (MR).

Investigar os efeitos da administração de corticosterona e do período de suspensão do fármaco em cortes do hipocampo por análises de imunofluorescência dos marcadores NMDA, PSD95, GR e MMP2.

## 4 MÉTODOS

### 4.1 Animais

Um total de 36 ratos Wistar machos (*Ratus norvegicos*) pesando entre 180-200 gramas e com idade aproximada de 2 meses, oriundos do Biotério Central da Universidade Federal do Ceará, foram mantidos no biotério do Núcleo de Pesquisa e Desenvolvimento de Medicamentos (NPDM), em sala com temperatura controlada, ração balanceada e água *ad libitum* e ciclos claro/escuro de 12/12 horas, mantidos em grupos de 3 animais e alojados em caixas de policarbonato.

O projeto foi submetido à apreciação da Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA-UFC), tendo sido aprovado sob o protocolo 12130320-0. Todos os esforços foram feitos para minimizar o sofrimento e o número de animais utilizados na experimentação.

### 4.2 Protocolo experimental

#### 4.2.1 Protocolo de depressão induzida por corticosterona

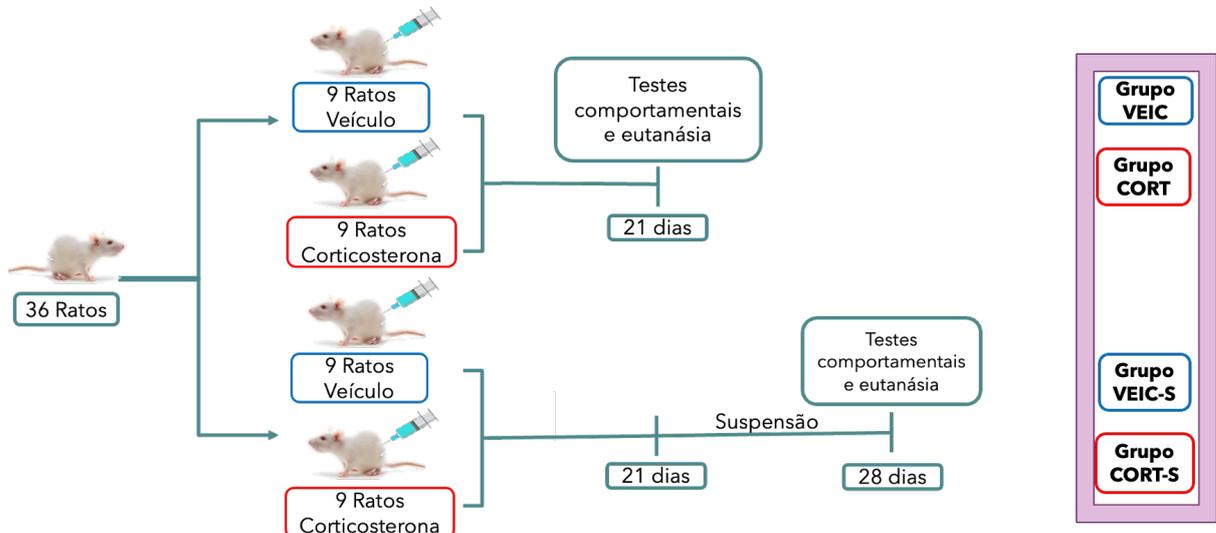
O protocolo de depressão induzido por corticosterona foi conduzido como previamente descrito por CUI et al., 2018, GREGUS et al., 2005a e XIE et al., 2018a. Para isso, quatro grupos experimentais com 9 animais em cada grupo, separados randomicamente, foram formados: **Grupo Veículo (VEIC)**, composto por animais submetido à injeção subcutânea de veículo (solução salina com Tween 80 1% e dimetilsulfóxido 0,2%) durante 21 dias; **Grupo Corticosterona (CORT)** no qual os animais foram submetidos a injeção de corticosterona (Sigma-Aldrich Co., St. Louis, MO, USA) 40 mg/kg diluída no veículo durante 21 dias.

**Grupo Veículo 21 dias + suspensão do veículo por 7 dias (VEIC-S)** e **Grupo Corticosterona 21 dias + suspensão da droga por 7 dias (CORT-S)**, compostos por animais submetido à injeção subcutânea de veículo ou corticosterona, respectivamente, durante 21 dias seguidos de mais 7 dias de suspensão dos tratamentos, totalizando 28 dias de protocolo.

O protocolo foi realizado em dois blocos de experimento: no primeiro, os grupos VEIC e CORT foram tratados durante 21 dias e submetidos à avaliação por testes comportamentais no 21º dia. No segundo, os grupos VEIC-S e CORT-S foram tratados durante 21 dias,

permaneceram 7 dias sem manipulações experimentais e no 28º dia foram submetidos aos testes comportamentais e sacrificados após.

**Figura 3.** Desenho experimental



Legenda: Aos animais do grupo VEIC e VEIC-S foi administrado veículo durante 21 dias e aos animais do grupo CORT e CORT-S foi administrado corticosterona durante 21 dias. Animais do grupo VEIC e CORT realizaram testes comportamentais e foram sacrificados após 21 dias e do grupo VEIC-S e CORT-S realizaram testes comportamentais e foram sacrificados após 28 dias, permanecendo 7 dias sem manipulações experimentais.

#### 4.2.2 Avaliação ponderal dos animais

Para avaliação da evolução ponderal e cálculo das doses de corticosterona a serem administradas, os animais foram pesados no primeiro dia do experimento seguidas de duas aferições semanais, durante a execução do protocolo experimental, e no dia do sacrifício. As pesagens foram realizadas entre 8 e 9h da manhã, nos dias 1, 4, 8, 11, 14, 18, 21 para os grupos VEIC e CORT, acrescido dos dias 24 e 28 para os grupos VEIC-S e CORT-S. Os valores foram registrados em gramas (g).

#### 4.2.3 Avaliação comportamental

##### 4.2.3.1 Campo aberto

Com a finalidade de analisar os efeitos dos tratamentos sobre a atividade locomotora, os animais foram avaliados no teste do campo aberto. Foi utilizado um aparato quadrangular de acrílico escuro de 50 x 50 x 50 cm, dividido em 9 quadrantes iguais. Os animais foram

colocados no centro do dispositivo e, por 6 minutos, foi permitido que esses o explorassem livremente. Considerou-se o 1º minuto o período de habituação, e nos 5 minutos subsequentes a atividade exploratória do animal, representada pelo número de cruzamentos entre as zonas do equipamento, tempo de permanência no centro e latência para retornar ao centro, foi registrada e avaliada por um observador treinado (ARCHER, 1973). Entre um animal e outro, o aparato foi cuidadosamente higienizada com solução de álcool etílico 70%.

#### 4.2.3.2 Labirinto em Y

O labirinto em Y foi realizado com o objetivo de avaliar os efeitos do modelo sobre memória de trabalho e o aprendizado do animal, sendo conduzido conforme descrito previamente por YAMADA et al., 1996. O labirinto em Y é formado por três braços idênticos (75,5 cm de comprimento, 34,5 cm de altura e 11,7 cm de largura), dispostos a 120º um do outro. Os animais foram colocados em um dos braços e a sequência das entradas nos braços foi registrada durante oito minutos. Após o teste, os animais foram devolvidos às suas caixas e realizada a limpeza do aparato com álcool etílico a 70%. A alternância correta foi definida como a entrada nos três braços, em qualquer ordem, sem que houvesse repetição dos braços (por exemplo, 123, 321, 231). O sucesso do teste é indicado pela alta taxa de alternância correta, indicando que os animais se recordam de qual braço eles entraram por último (MAURICE *et al.*, 1994). A sequência dos braços em que os animais entraram foi então anotada e as informações analisadas. O percentual das alterações foi calculado como a razão entre as alterações corretas (x) e o número de entradas em cada braço realizadas durante o período de observação (y) -2, multiplicado por 100.

$$\% \text{ Alterações corretas} = \frac{x}{y-2} \times 100$$

#### 4.2.3.3 Teste da suspensão pela cauda

No teste de suspensão pela cauda (STERU *et al.*, 1985) cada rato foi suspenso pela cauda em uma plataforma, 70 cm acima da bancada. Foi usada uma fita adesiva, colocada cerca de 1 cm da ponta da cauda. O tempo durante o qual os animais permaneceram imóveis, ao longo de um período de cinco minutos, foi registrado. O balanço passivo e a ausência de movimento foram caracterizados como imobilidade. Cada animal foi submetido a este teste apenas uma vez.

#### 4.2.3.4 Teste do nado forçado

Para realizar o teste do nado forçado, os animais foram colocados individualmente em um cilindro de acrílico (60 cm de altura, 22,5 cm de diâmetro) contendo água até altura de 40 cm, onde os animais permaneceram por 5 min para registro do tempo de imobilidade (em segundos). A imobilidade foi definida como a ausência de ação, fuga orientada e comportamentos tais como: natação, salto, cheiro, ou mergulho (PORSOLT; LE PICHON; JALFRE, 1977).

#### 4.2.4 Avaliação do peso das adrenais

Após os testes comportamentais, animais de cada grupo foram eutanasiados por decapitação e tiveram ambas as glândulas adrenais dissecadas e pesadas.

#### 4.3 Análise de expressão dos genes *GRIN1* (NR1), *DLG4* (PSD95), *NR3C1* (GR) e *NR3C2* (MR) por PCR quantitativo em tempo real (qPCR) em amostras de hipocampo e hipotálamo de ratos no modelo de depressão induzida pela administração de corticosterona

##### 4.3.1 Extração do RNA

Os animais que foram decapitados, tiveram os cérebros retirados e rapidamente colocados sobre uma placa de Petri com gelo. As seções do hipocampo e hipotálamo foram retiradas, armazenadas em microtubos com 300µL de RNA *later* (Sigma, EUA) devidamente identificados e conservados a -70°C para uso posterior.

A extração do RNA total foi realizada utilizando o kit de purificação Trizol® Plus (Invitrogen). De acordo com as instruções do fabricante, foram adicionados 400 µL de solução de Trizol a cada amostra que em seguida foram maceradas, homogeneizadas às quais adicionou-se 80µL de clorofórmio. Seguiu-se a centrifugação das amostras a 16.000g a 4°C durante 15 min para remoção da fase aquosa à qual adicionou-se 200 µL de isopropanol. Procedeu-se nova centrifugação a 13.000g a 4°C por 10 min, descartou-se o sobrenadante e realizadas duas lavagens do *pellet* com etanol 75% seguidas de centrifugação a 10.500g a 4°C por 5 min. Depois, o *pellet* foi secado em temperatura ambiente e ressuspendido em água ultra pura. Prosseguiu-se para quantificação do RNA em uma alíquota de 2µL de RNA de cada amostra, utilizando Cytation 3 (Biotek Instruments) bem como a avaliação da qualidade do RNA extraído, a qual foi obtida por meio da relação 260/280, fornecida pelo programa Gen5®. A avaliação da quantidade de RNA presente em cada amostra é necessária para a obtenção da quantidade de

amostra adequada para realização da síntese do ácido desoxirribonucléico complementar (cDNA).

#### 4.3.2 Síntese do cDNA

O cDNA foi sintetizado de acordo com o High-Capacity cDNA ReverseTranscription Kit (Applied biosystems, USA). O volume final de cada amostra foi de 20µL: 2 µL do reagente 10x tampão da enzima; 0,8 µL de oligonucleotídeos; 2 µL de primer; 1 µL da enzima transcriptase reversa; 1µg de RNA, onde o volume utilizado em µL foi dependente da concentração inicial extraída; H<sub>2</sub>O de nucleases para completar 20 µL. O protocolo da reação foi realizado à 25° C por 10 min, 37° C por 120 min, 85° C por 5 min. O cDNA foi armazenado em freezer a -20° C até a sua utilização no qPCR.

#### 4.3.3 PCR quantitativo em tempo real (qPCR)

A expressão gênica foi avaliada por meio do sistema de PCR em tempo real (Light cycler 96, Roche), utilizando kit de Power SYBR® Green PCR Master Mix (Life Technologies). O gene de referência utilizado foi a β-Actina. A seguinte sequência de primers foi usada: *GRIN1* forward AGCCTCCTCTGCTCTTTCTG, *GRIN1* reverse GATTGGGTAGTTCGGCATTGC; *DLG4* forward TCAACACGGACACCCTAGAA, *DLG4* reverse TGCTGAAGCCAAGTCCTTTAG; *NR3C1* forward AGCAGCAGCCAGACTTATCC, *NR3C1* reverse TCATCTTCTCCCGCCAAAGG; *NR3C2* forward AAGGTGGAGTCTGGGAATGC, *NR3C1* reverse TGGGAGTGGAGAGGGAAGAG. Os valores de Threshold cycle (Cq ou Ct), obtidos pelo software do equipamento, dos genes avaliados foram exportados para o Office Microsoft Excel® 2019, no qual os níveis relativos de RNAm foram calculados de acordo com a metodologia descrita por Livak e Schmittgen (2001).

Os dados sobre o nível de expressão gênica (valores de 2-ΔCq) foram expressos em média ± desvio padrão (SD), com intervalo de confiança (CI) (máximo e mínimo), a fim de determinar a possível associação entre o nível de expressão dos genes frente cada variável analisada. O nível de significância estatística utilizado foi de p<0,05 e todas as análises foram efetuadas com recurso do software GraphPad Prism para Windows (versão 9.3.1).

#### 4.4 Expressão de NMDA, PSD95, GR e MMP2 por imunofluorescência em amostras de hipocampo de ratos no modelo de depressão induzida pela administração de corticosterona

Após o protocolo experimental, os animais foram anestesiados com uma injeção intraperitoneal de quetamina (100 mg/kg) e xilazina (20 mg/kg) seguida de perfusão transcardíaca de solução salina (NaCl) 0,9% e solução de paraformaldeído (PFA) a 4% tamponado. Posteriormente, procedeu-se a coleta das adrenais e a localização e extração do bloco encefálico contendo o hipocampo – por estereotaxia em uma matriz própria para ratos (INSIGHT®) utilizando como guia o bregma – 2,5 até -4,5 (PAXINOS; FRANKLIN, 2001). (figura 4) Os cortes removidos foram pós-fixados por 2 horas em PFA 4% tamponado crioprotetidos em solução de sacarose 30%/0,1 M de tampão fosfato, a 4°C por 72h (a renovação dessa solução ocorreu após 1h, 24h e 48h). Após essa etapa, o material foi embebido e emblocado em OCT-Tissue-Tek® e armazenadas em freezer - 70°C até o corte e montagem das lâminas para os ensaios de imunofluorescência. O material foi cortado em seções de 10 µm em um criostato Leica® CM1850 à temperatura de -25° e montado em lâminas silanizadas ImmunoSlide para imuno-histoquímica (Easy Path®).

No protocolo de imunofluorescência utilizado as lâminas foram secadas em temperatura ambiente, fixadas em PFA 4% (pH 7,2) por 10 min, lavadas tampão fosfato-salino (PBS) e imersos em tampão citrato 0,1M (pH 6,0) em banho maria a 95°C por 15 min para recuperação antigênica. Após resfriadas na temperatura ambiente por 20 min foram feitas lavagens em PBS e permeabilização em solução PBS-Triton 0,1% por 10 minutos seguida da etapa de bloqueio das ligações inespecíficas com glicina 0,5M e albumina bovina 5% (BSA) durante 30 min. Os cortes foram incubados *overnight* com os anticorpos primários: anti-*mouse* metaloproteinase (MMP) 2 Invitrogen (diluição 1:400), anti- *mouse* GR Invitrogen (diluição 1:400), anti-*rabbit* PSD95 Cell Signaling (diluição 1:500) e anti-*goat* NMDA Santa Cruz (diluição 1:400).

Depois de incubados *overnight* os cortes foram lavados incubadas por 2 horas temperatura ambiente em soluções contendo os respectivos anticorpos secundários específicos anti IgG conjugados a Alexa flúor anti-*mouse* (IgG-Alexa-594), anti-*rabbit* (IgG-Alexa-488) e anti-*goat* (IgG-Alexa-488) na diluição 1:500. Ao final, foi acrescentado 2-(4-Amidinophenyl)-6-indolecarbamide dihydrochloride (DAPI) (SigmaAldrich, USA) para evidenciar os núcleos celulares. As lâminas foram então montadas com glicerol e fotografadas, na magnificância de 10x e de 20x em microscópio confocal Cytation 3 ImageReader (Biotek Instruments). A análise das imagens foi realizada com o Software Fiji ImageJ® versão para Mac OS X, sendo feita a quantificação de intensidade de fluorescência nas regiões CA1, CA2, CA3 e GD.



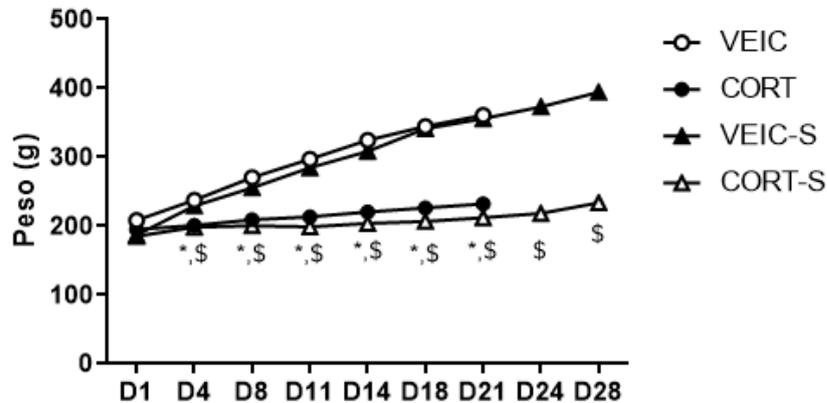
## 5 RESULTADOS

Avaliamos um total de 36 animais estratificados em 4 grupos (VEIC, CORT, VEIC-S CORT-S) a fim de verificar os efeitos da indução da depressão pela administração de corticosterona sobre o comportamento e sobre o perfil de expressão dos genes *GRIN1* (NR1), *DLG4* (PSD95), *NR3C1* (GR) e *NR3C2* (MR) e de marcadores de NMDA, PSD95, GR e MMP2 em hipocampo e hipotálamo de ratos Wistar.

### 5.1 Avaliação ponderal

O acompanhamento do ganho ponderal foi realizado para avaliar os efeitos da administração de corticosterona sobre o peso dos animais, bem como corroborar a indução do modelo de depressão. No gráfico da figura 3 podemos observar a curva do ganho ponderal durante o período experimental, seja de 21 ou 28 dias de acordo com o protocolo usado. No início do experimento (D1) não havia diferença significativa entre os pesos dos animais dos grupos tratados com salina e daqueles tratados com corticosterona: grupo VEIC (média: 208,56) comparado ao grupo CORT (média: 195,3) (95% CI -13,13 a 39,58;  $P > 0.05$ ) e grupo VEIC-S (média 185,78) comparado ao grupo CORT-S (média: 185) (95% CI -17,31 a 21,97;  $P > 0.05$ ). A partir do 4º até o 21º dia foi possível identificar um significativo aumento da diferença dos pesos dos animais dos grupos de indução com corticosterona [CORT (média: 214,1) e CORT-S (média: 206,5)] quando comparados aos pesos dos animais dos grupos tratados com salina [VEIC (média: 292,1) e VEIC-S (média: 303,4)] ( $p < 0,0001$ ). Essa diferença se manteve entre os grupos VEIC-S e CORT-S no período de suspensão da droga ( $p < 0,0001$ ) (Figura 5).

**Figura 5.** Efeito da administração de corticosterona e da suspensão do fármaco sobre a evolução ponderal dos animais



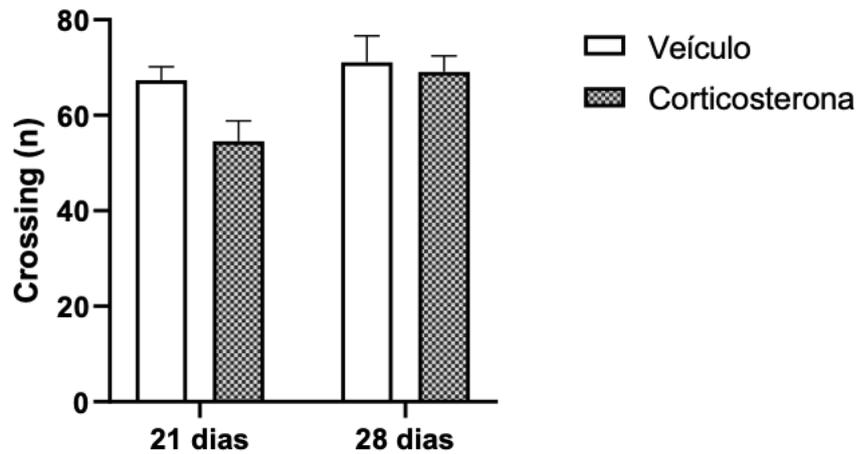
Ratos foram tratados com veículo ou corticosterona (40 mg/kg (s.c) durante 21 dias. Os animais dos grupos VEIC-S e CORT-S permaneceram 7 dias sem manipulações experimentais. Os pontos representam a média  $\pm$  E.P.M. do peso dos animais. A análise dos resultados de acordo com ANOVA de duas vias seguida pelo teste de *post-hoc* Sidak (\* Grupo CORT diferente do grupo VEIC; \$ Grupos CORT-S diferente do grupo VEIC-S  $p < 0,05$ ). Abreviações: VEIC = veículo; CORT = corticosterona; VEIC-S = veículo com período de suspensão; CORT = corticosterona com período de suspensão.

## 5.2. Avaliação comportamental

### 5.2.1 Campo aberto

Foram mensurados o número total de cruzamentos entre as zonas do equipamento como parâmetro de atividade locomotora. Na análise ANOVA de duas vias, não houve diferenças entre os grupos VEIC e CORT e entre VEIC-S e CORT-S [ $F(1, 31) = 3,135$ ;  $P = 0,0865$ ]. (Figura 6) A avaliação dos parâmetros tempo de permanência no centro [ $F(1, 31) = 3,267$ ;  $P = 0,0804$ ] e latência para retornar ao centro [ $F(1, 31) = 0,4749$ ;  $P = 0,4958$ ] também não apresentou diferença entre os grupos do estudo.

**Figura 6** Efeito da administração de corticosterona e da suspensão do fármaco na atividade locomotora dos animais.

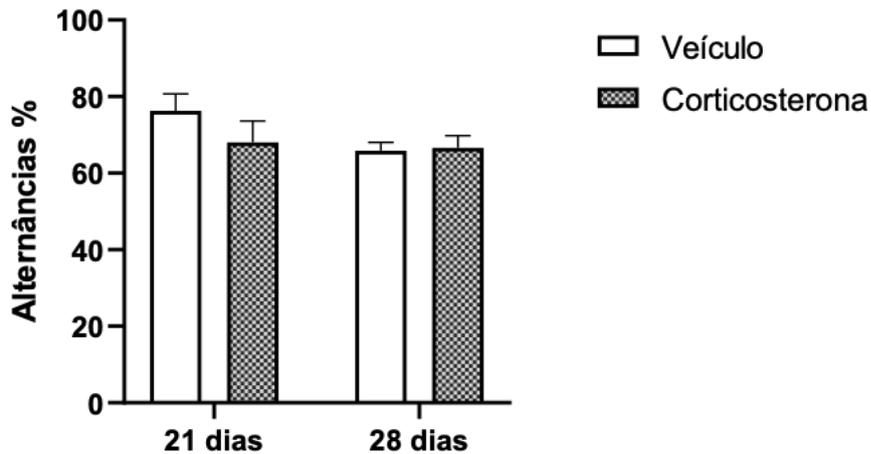


Ratos foram tratados com veículo ou corticosterona (40 mg/kg (s.c) durante 21 dias. Os animais dos grupos VEIC-S e CORT-S permaneceram 7 dias sem manipulações experimentais. Cada barra representa a média  $\pm$  erro padrão da média (SEM) do número de cruzamentos entre as zonas do equipamento de acordo com ANOVA de duas vias seguida pelo teste de *post-hoc* Tukey. ( $p > 0,05$ ). Abreviações: VEIC = veículo; CORT = corticosterona; VEIC-S = veículo com período de suspensão; CORT = corticosterona com período de suspensão.

### 5.2.2 Labirinto em Y

A avaliação da memória de trabalho foi acessada através da análise da porcentagem de alternâncias espontâneas no teste do labirinto em Y. Não foram observadas diferenças em relação ao parâmetro avaliado entre os grupos do estudo [ $F(1, 31) = 0,8632$ ;  $P = 0,3600$ ]. (Figura 7)

**Figura 7.** Efeito da administração de corticosterona e da suspensão do fármaco na memória de trabalho acessada pelo teste do labirinto em Y.

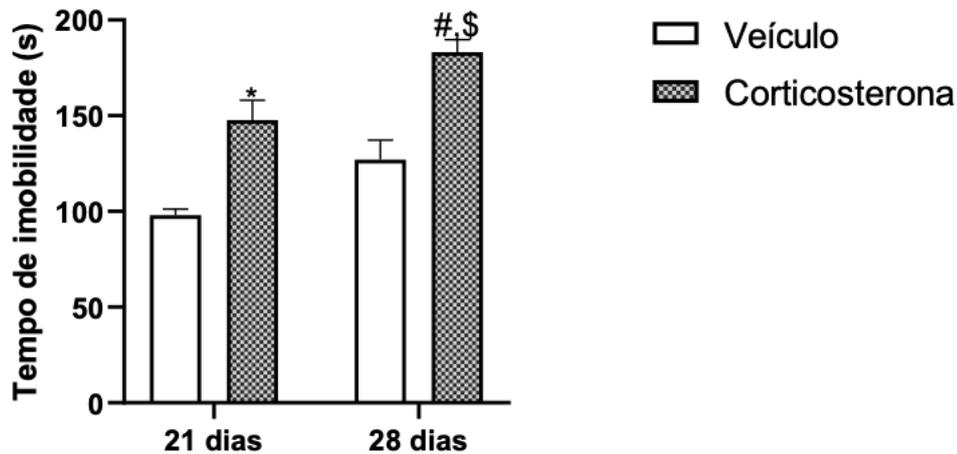


Ratos foram tratados com veículo ou corticosterona (40 mg/kg (s.c) durante 21 dias. Os animais dos grupos VEIC-S e CORT-S permaneceram 7 dias sem manipulações experimentais. Cada barra representa a média  $\pm$  erro padrão da média (SEM) da porcentagem de alternâncias corretas de acordo com ANOVA de duas vias seguida pelo teste de *post-hoc* Tukey. ( $p > 0,05$ ). Abreviações: VEIC = veículo; CORT = corticosterona; VEIC-S = veículo com período de suspensão; CORT = corticosterona com período de suspensão.

### 5.2.3 Teste da suspensão pela cauda

O tempo total de imobilidade foi usado na avaliação de comportamento relacionado ao desespero. Na análise ANOVA de duas vias, houve efeito significativo de cada fator isoladamente: “duração do protocolo” [ $F(1, 29) = 16.87$ ;  $P = 0,0003$ ] e “grupos experimentais” [ $F(1, 29) = 45.28$ ;  $P < 0,0001$ ], porém a interação entre eles não atingiu significância estatística [ $F(1, 29) = 0.1642$ ;  $P = 0,6883$ ]. No teste de comparações múltiplas, observou-se um aumento significativo do tempo de imobilidade no grupo CORT em relação ao grupo VEIC ( $p = 0,0005$ ), bem como entre os grupos VEIC-S e CORT-S ( $p = 0,0002$ ). Além disso, também foi significativo o aumento do tempo de imobilidade no grupo CORT-S em comparação ao grupo CORT ( $p = 0,0188$ ). (Figura 8)

**Figura 8.** Efeito da administração de corticosterona e da suspensão do fármaco no tempo de imobilidade dos animais no teste da suspensão pela cauda.

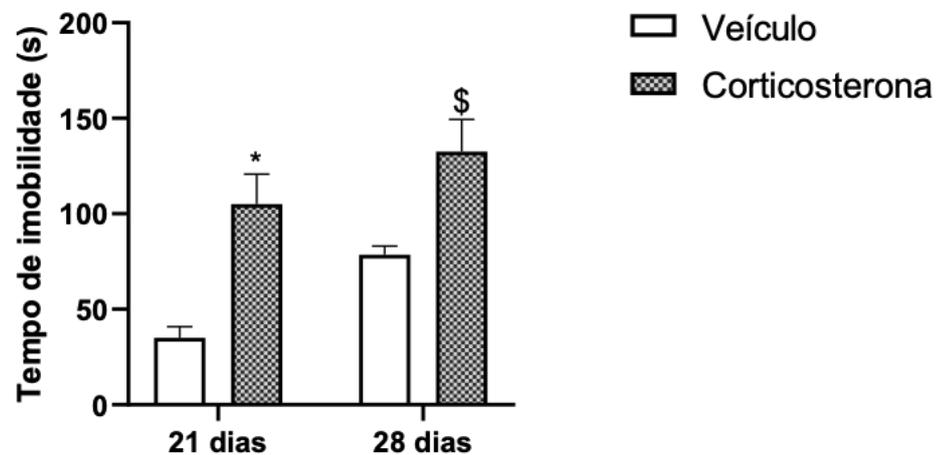


Ratos foram tratados com veículo ou corticosterona (40 mg/kg (s.c) durante 21 dias. Os animais dos grupos VEIC-S e CORT-S permaneceram 7 dias sem manipulações experimentais. Cada barra representa a média  $\pm$  erro padrão da média (SEM) do tempo de imobilidade no teste de suspensão pela cauda de acordo com ANOVA de duas vias seguida pelo teste de *post-hoc* Tukey. (\* Grupos diferentes do grupo VEIC; # Grupos diferentes do grupo CORT; \$ Grupos diferente do grupo VEIC-S;  $p < 0,05$ ). Abreviações: VEIC = veículo; CORT = corticosterona; VEIC-S = veículo com período de suspensão; CORT = corticosterona com período de suspensão.

#### 5.2.4 Teste do nado forçado

De modo semelhante, avaliou-se o tempo total de imobilidade como comportamento tipo-desespero no teste do nado forçado. Na análise ANOVA de duas vias, houve efeito significativo de cada fator isoladamente: “duração do protocolo” [ $F(1, 30) = 8,538$ ;  $P = 0,0066$ ] e “grupos experimentais” [ $F(1, 30) = 26,17$ ;  $P < 0,0001$ ]. Entretanto, a interação entre eles não atingiu significância estatística [ $F(1, 30) = 0,4410$ ;  $P = 0,5117$ ]. No teste de comparações múltiplas o tempo de imobilidade no grupo CORT em relação ao grupo VEIC aumentou significativamente ( $p = 0,0012$ ), bem como entre no grupo CORT-S em relação ao grupo VEIC-S ( $p = 0,0228$ ). De modo interessante, não houve diferença no tempo de imobilidade entre os grupos CORT e CORT-S não atingiu significância estatística ( $p = 0,3958$ ). (Figura 9)

**Figura 9.** Efeito da administração de corticosterona e da suspensão do fármaco no tempo de imobilidade dos animais no teste do nado forçado.

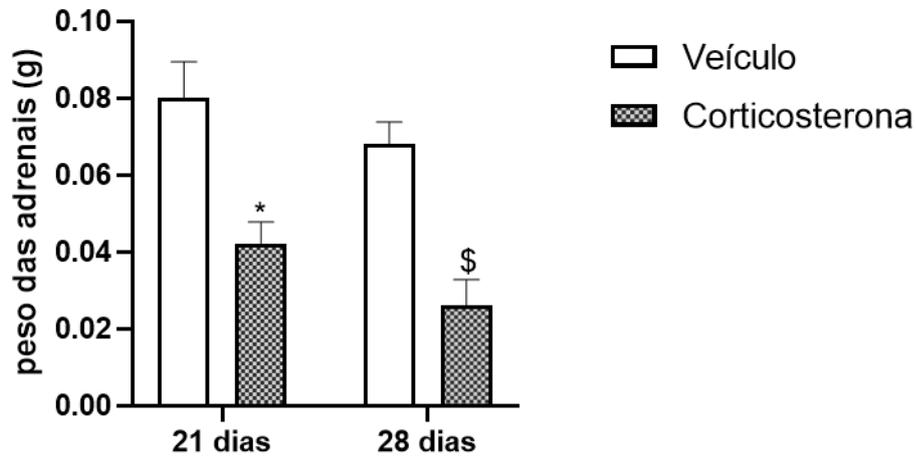


Ratos foram tratados com veículo ou corticosterona (40 mg/kg (s.c) durante 21 dias. Os animais dos grupos VEIC-S e CORT-S permaneceram 7 dias sem manipulações experimentais. Cada barra representa a média  $\pm$  erro padrão da média (SEM) do tempo de imobilidade no teste do nado forçado de acordo com ANOVA de duas vias seguida pelo teste de *post-hoc* Tukey. (\* Grupos diferentes do grupo VEIC; \$ Grupos diferente do grupo VEIC-S;  $p < 0,05$ ). Abreviações: VEIC = veículo; CORT = corticosterona; VEIC-S = veículo com período de suspensão; CORT = corticosterona com período de suspensão.

### 5.3 Efeito da administração de corticosterona e da suspensão do fármaco sobre o peso das adrenais

Na análise ANOVA de duas vias houve efeito significativo do fator “grupos experimentais” [ $F(1, 16) = 31,37$ ;  $P < 0,0001$ ]. No teste de comparações múltiplas o peso das adrenais foi menor no grupo CORT em comparação ao grupo VEIC ( $p = 0,0102$ ), bem como no grupo CORT-S em relação ao grupo VEIC-S ( $p = 0,0044$ ). Não houve diferença significativa entre os grupos CORT e CORT-S ( $p = 0,3958$ ). (Figura 10)

**Figura 10.** Efeito da administração de corticosterona e da suspensão do fármaco no peso das adrenais de animais de todos os grupos experimentais



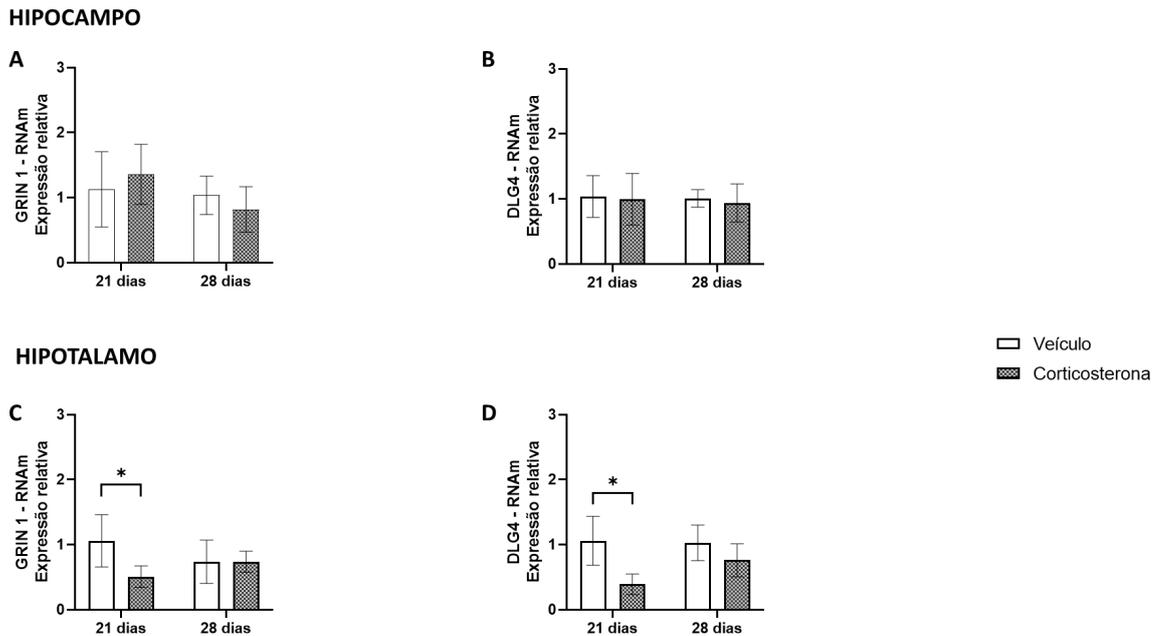
Ratos foram tratados com veículo ou corticosterona (40 mg/kg (s.c) durante 21 dias. Os animais dos grupos VEIC-S e CORT-S permaneceram 7 dias sem manipulações experimentais. Cada barra representa a média  $\pm$  erro padrão da média (SEM) do peso das adrenais de acordo com ANOVA de duas vias seguida pelo teste de *post-hoc* Bonferroni (\* Grupos diferentes do grupo VEIC; \$ Grupos diferente do grupo VEIC-S;  $p < 0,05$ ). Abreviações: VEIC = veículo; CORT = corticosterona; VEIC-S = veículo com período de suspensão; CORT = corticosterona com período de suspensão.

#### 5.4 Expressão gênica qPCR em amostras de hipocampo e hipotálamo de ratos no modelo de depressão induzida pela administração de corticosterona e após suspensão do fármaco

##### 5.4.1 *GRIN1* (NR1) e *DLG4* (PSD95)

Foram analisadas as expressões dos genes *GRIN1* e *DLG4* em amostras de hipocampo ( $n=5$ ) e de hipotálamo ( $n=5$ ) dos grupos experimentais avaliados neste estudo. Foi identificado uma diminuição da expressão dos genes *DLG4* ( $p = 0,0103$ ) e *GRIN1* ( $p = 0,0412$ ) no grupo CORT em relação ao grupo VEIC nas amostras do hipotálamo. Não houve diferença na expressão de *DLG4* entre os grupos CORT e CORT-S na amostras do hipotálamo ( $p = 0,2446$ ) (Figura 11 C-D). Não houve diferença na expressão do gene *DLG4* [ $F(3, 15) = 0,08448$ ;  $P = 0,9675$ ] e *GRIN1* [ $F(1, 13) = 0,01517$ ;  $P = 0,9695$ ] no hipocampo dos grupos analisados (Figura 11 A-B).

**Figura 11.** Efeito da administração de corticosterona e da suspensão do fármaco na expressão gênica de *GRIN1* e *DLG4* no hipocampo (A-B) e hipotálamo (C-D).

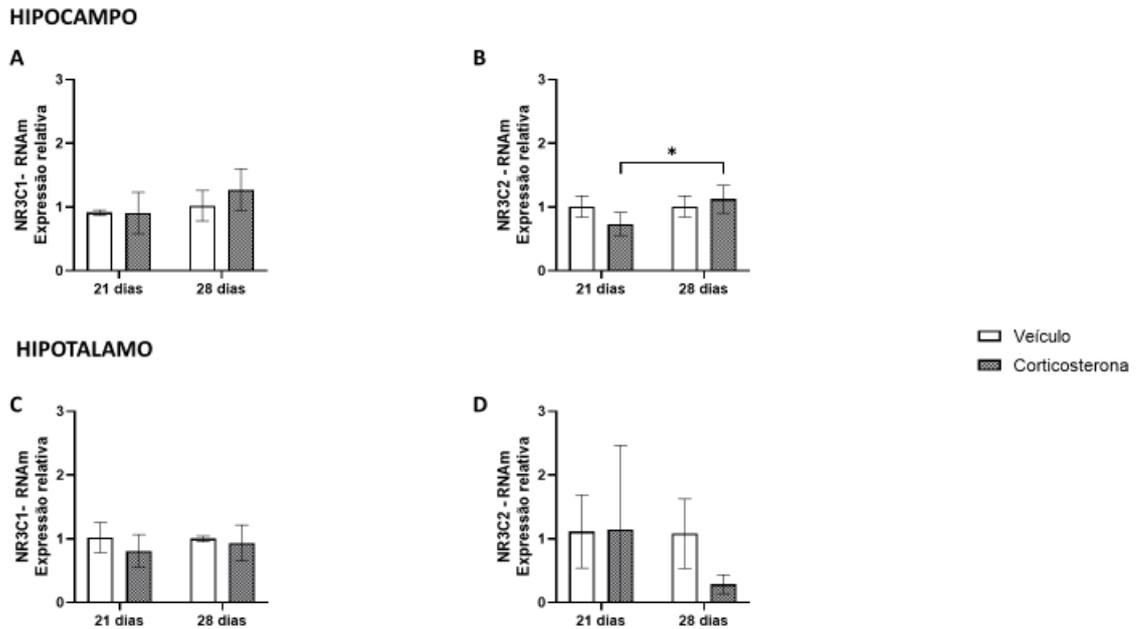


Ratos foram tratados com veículo ou corticosterona (40 mg/kg (s.c) durante 21 dias. Os animais dos grupos VEIC-S e CORT-S permaneceram 7 dias sem manipulações experimentais. Cada barra representa a média  $\pm$  erro padrão da média (SEM) da expressão gênica relativa de acordo com ANOVA de uma via seguida pelo teste *post-hoc* Tukey. ( $p < 0,05$ ) (\*Grupos diferentes do grupo VEIC;  $p < 0,05$ ). Abreviações: VEIC = veículo; CORT = corticosterona; VEIC-S = veículo com período de suspensão; CORT = corticosterona com período de suspensão.

#### 5.4.4 Expressão dos genes *NR3C1* (GR), *NR3C2* (MR)

No hipocampo, encontramos aumento na expressão de *NR3C2* no grupo CORT-S em comparação ao CORT ( $p = 0.0407$ ) (Figura 12B). Não houve diferença na expressão dos genes *NR3C1* [ $F(3, 12) = 0,7134$   $P = 0,5626$ ] e *NR3C2* [ $F(3, 10) = 0,7875$   $P = 0,5279$ ] no hipotálamo dos grupos analisados (Figura 12C-D). A relação MR:GR também não foi diferente entre os grupos analisados.

**Figura 12.** Efeito da administração de corticosterona e da suspensão do fármaco na expressão gênica de *NR3C1* e *NR3C2* no hipocampo (A-B) e hipotálamo (C-D)



Ratos foram tratados com veículo ou corticosterona (40 mg/kg (s.c) durante 21 dias. Os animais dos grupos VEIC-S e CORT-S permaneceram 7 dias sem manipulações experimentais. Cada barra representa a média  $\pm$  erro padrão da média (SEM) da expressão gênica relativa de acordo com ANOVA de uma via seguida pelo teste *post-hoc* Tukey. ( $p < 0,05$ ) (\*Grupos diferentes do grupo CORT;  $p < 0,05$ ). Abreviações: VEIC = veículo; CORT = corticosterona; VEIC-S = veículo com período de suspensão; CORT-S = corticosterona com período de suspensão.

## 5.5 Expressão de NMDA, PSD95, GR e MMP2 no hipocampo de ratos no modelo de depressão induzida pela administração de corticosterona e após suspensão do fármaco

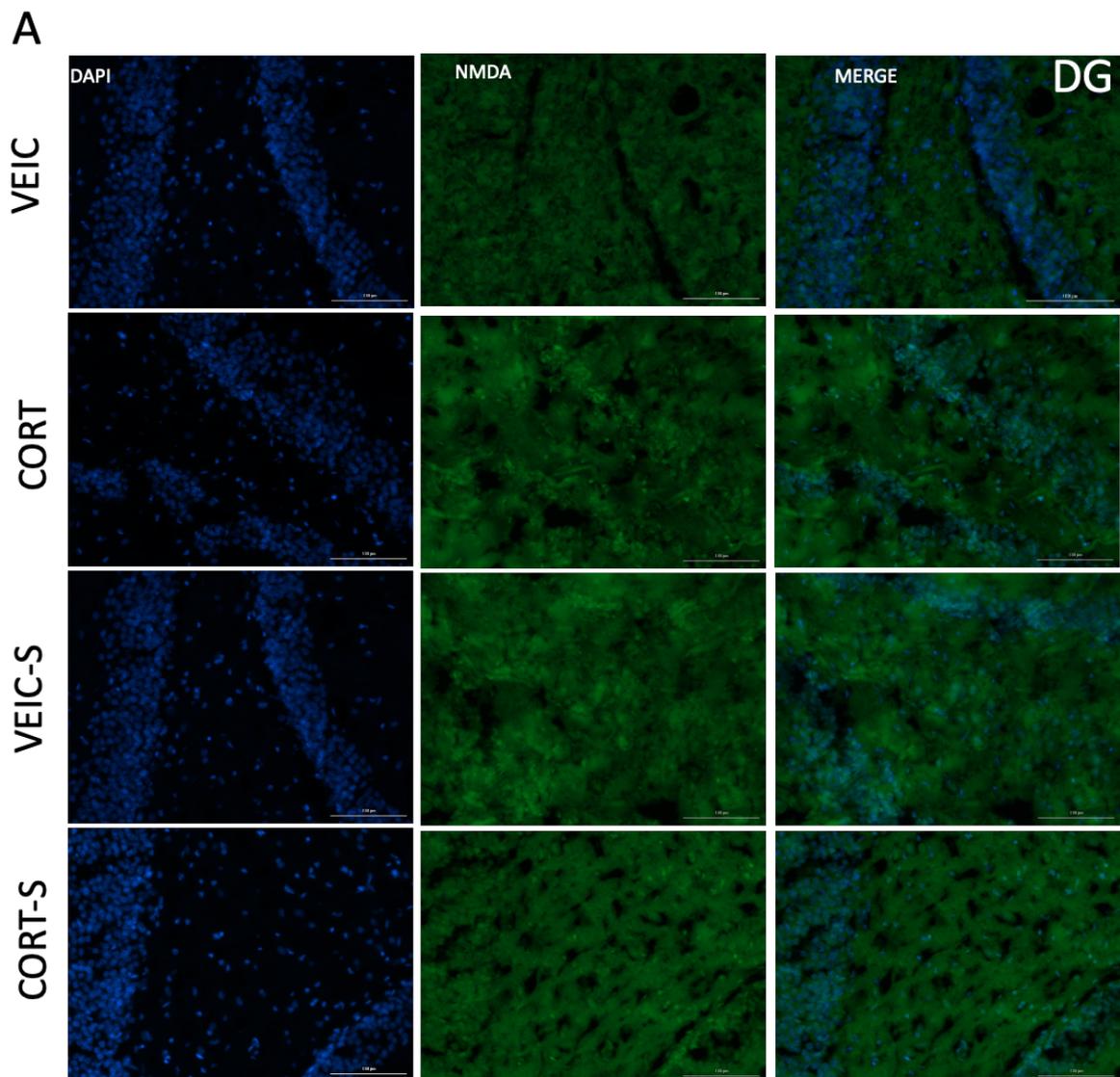
### 5.5.1 Imunomarcção de NMDA

A imunofluorescência para NMDA no hipocampo de ratos de todos os grupos experimentais foi analisada a partir de fotomicrografias pela intensidade de fluorescência da região marcada (Figura 13A-D).

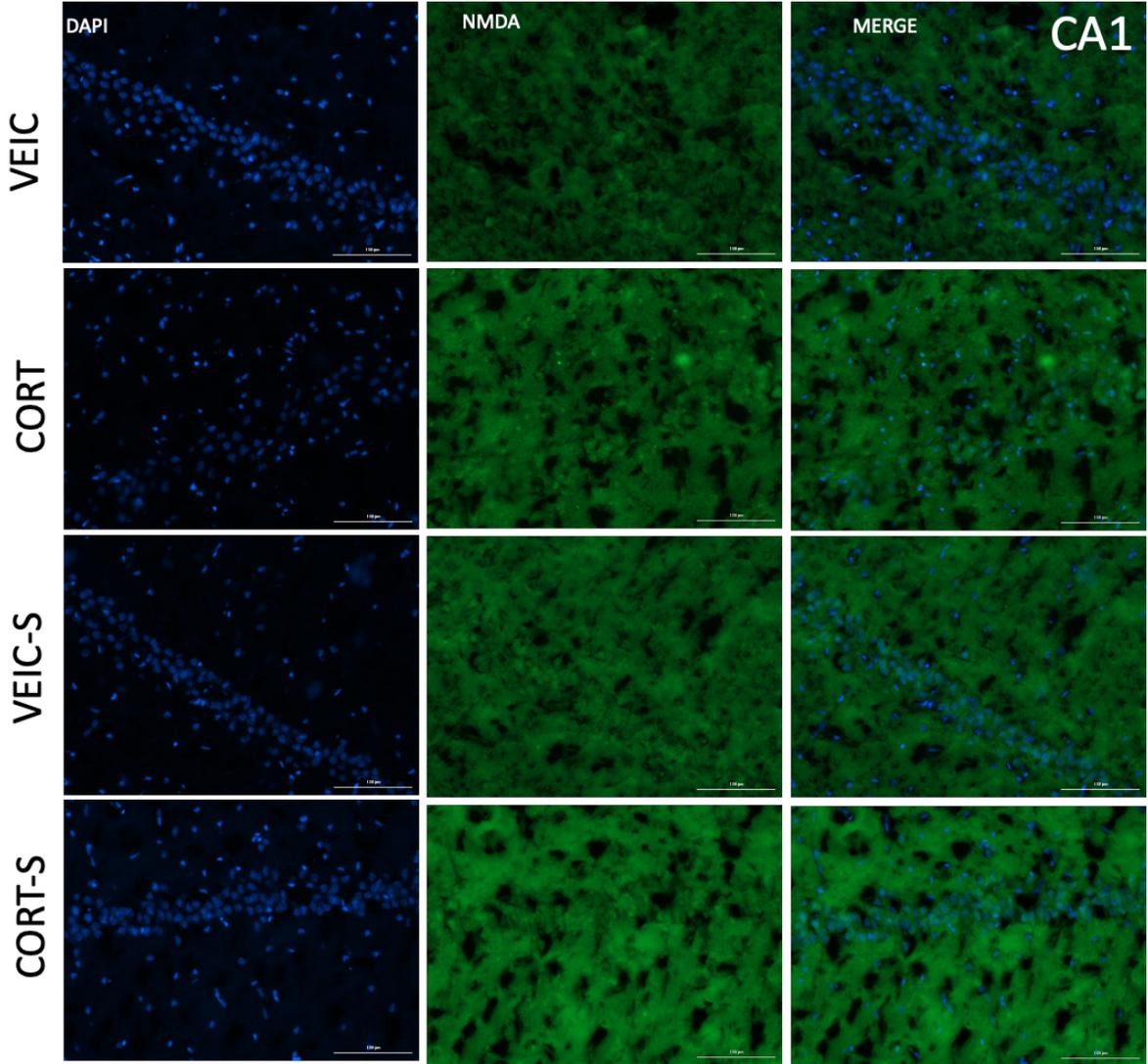
Na análise ANOVA de duas vias houve efeito significativo do fator “tratamento” em DG [F (1, 12) = 9,11; P=0,0107]. No teste de comparações múltiplas houve aumento da intensidade média de fluorescência no grupo CORT em comparação ao grupo VEIC na região DG ( $p=0,0277$ ). Não foram observadas diferenças entre os grupos VEIC-S e CORT-S ( $p=0,3125$ ) e entre os grupos CORT e CORT-S ( $p=0,7732$ ). (Figura 14A)

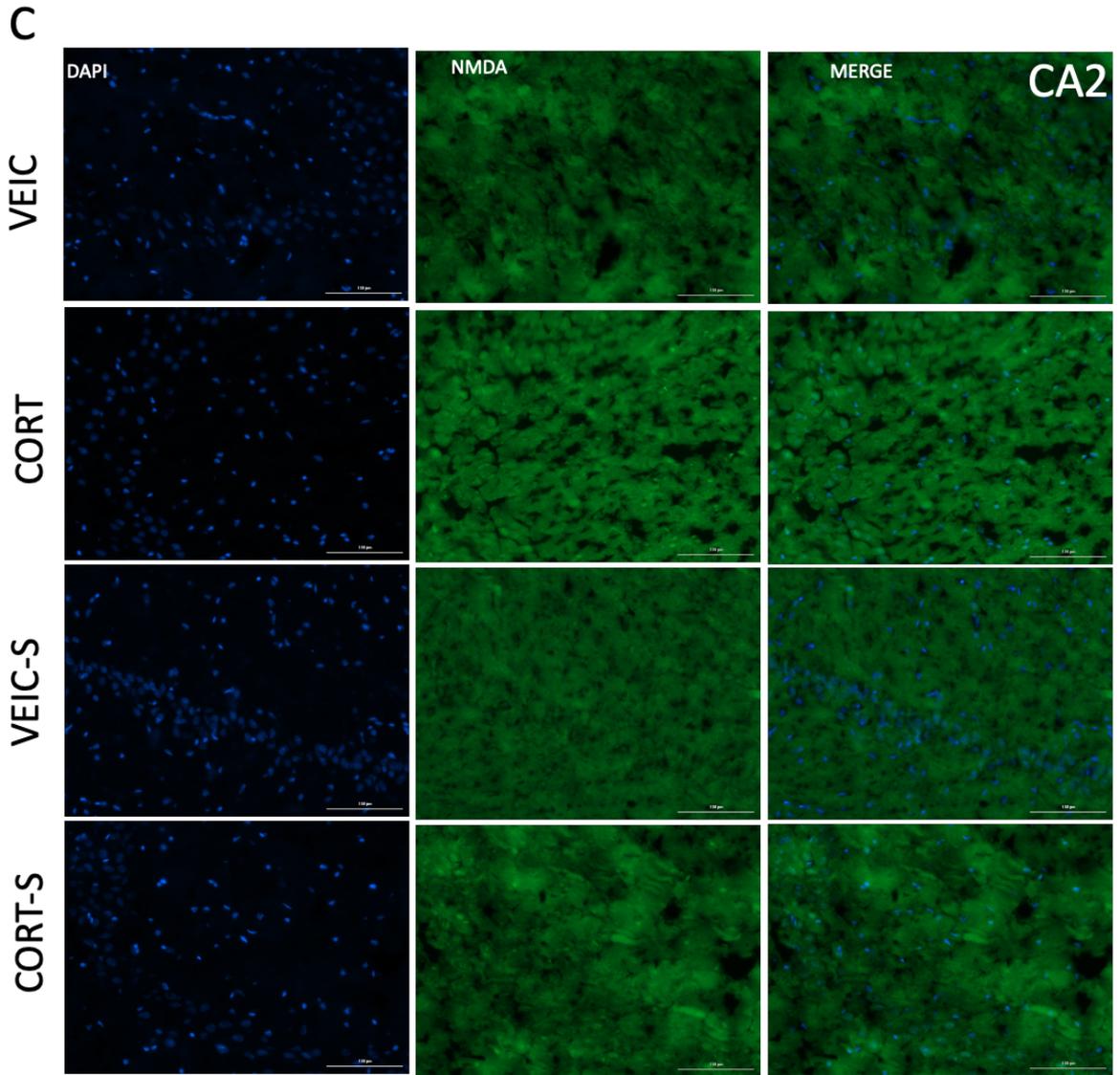
As diferenças entre os grupos VEIC E CORT e entre os grupos VEIC-S E CORT-S nas regiões CA1 ( $p = 0,1991$ ), CA2 ( $p = 0,090$ ) e CA3 ( $p = 0,5076$ ) do hipocampo não foram significativas. (Figuras 14B-D)

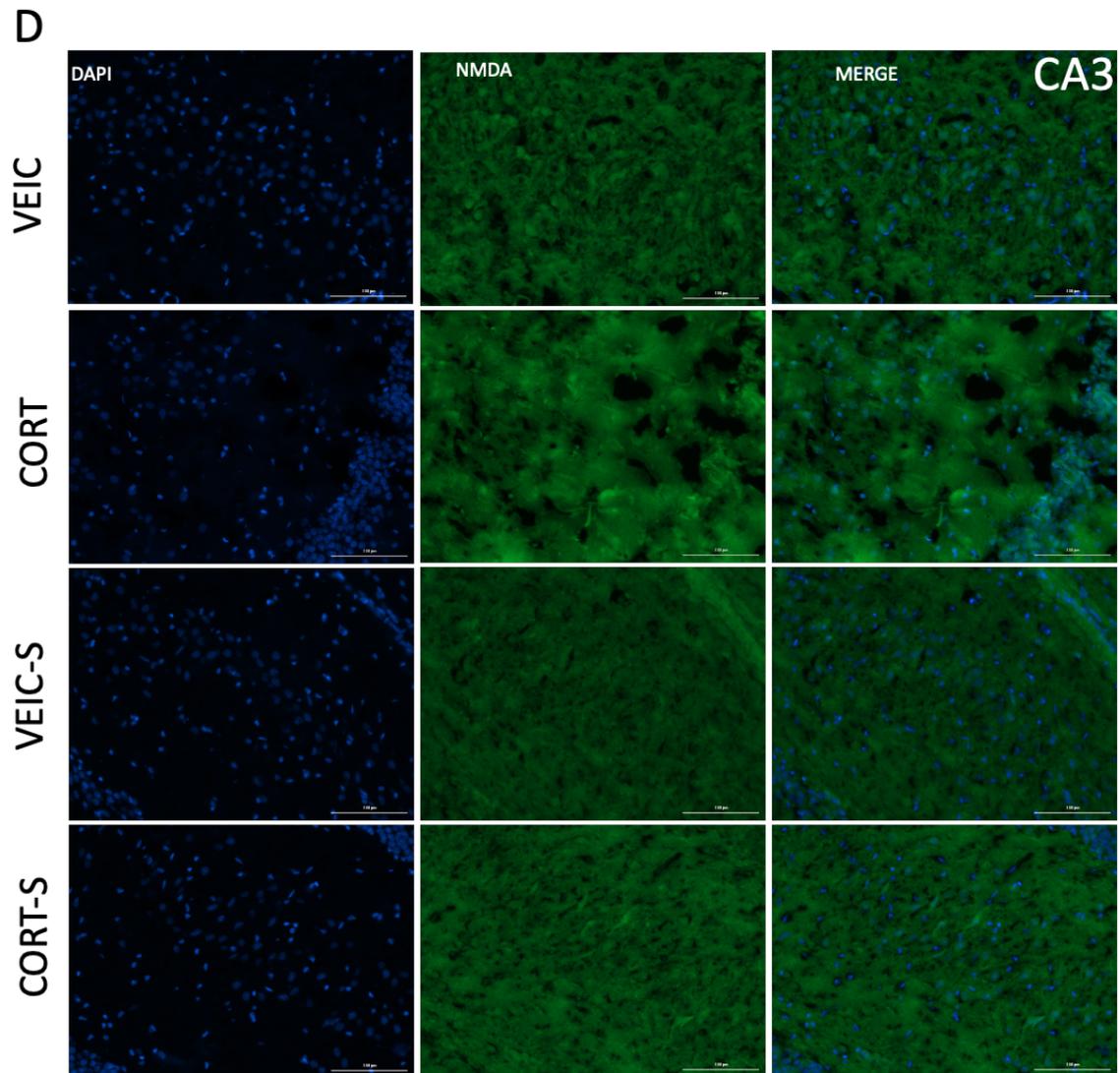
**Figura 13.** Imunoexpressão do marcador NMDA nas regiões DG, CA1, CA2 e CA3 do hipocampo de ratos submetidos ao modelo de depressão induzida por corticosterona e após suspensão do fármaco



**B**

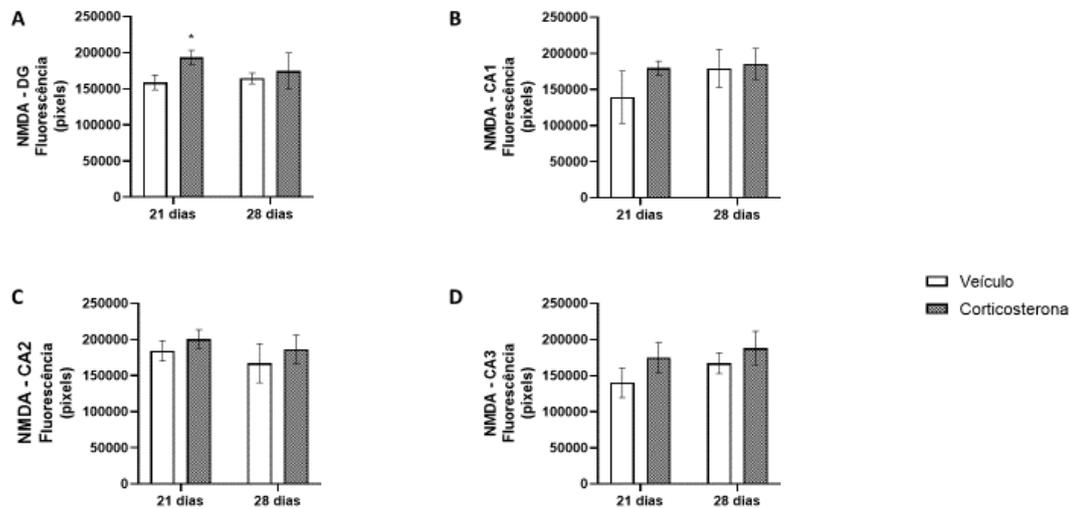






Fonte: dados da pesquisa. verde: NMDA; azul: DAPI (marcador nuclear). Aumento: 200 x.  
 Escala: 100 µm. Abreviações: DG: giro dentado; CA: *Cornu Ammonis*; CORT: Corticosterona; VEIC: Veículo; CORT-S: Corticosterona + período de suspensão da droga; VEIC-S: Veículo + período de suspensão do veículo; Merge: sobreposição

**Figura 14.** Efeito da administração de corticosterona e da suspensão do fármaco na imunopressão de NMDA no hipocampo



Ratos foram tratados com veículo ou corticosterona (40 mg/kg (s.c) durante 21 dias. Os animais dos grupos VEIC-S e CORT-S permaneceram 7 dias sem manipulações experimentais. Cada barra representa a média  $\pm$  erro padrão da média (SEM) da intensidade de fluorescência de acordo com ANOVA de duas vias seguida pelo teste *post-hoc* Tukey. ( $p < 0,05$ ) (\* Grupos diferentes do grupo VEIC;  $p < 0,05$ ). Abreviações: VEIC = veículo; CORT = corticosterona; VEIC-S = veículo com período de suspensão; CORT-S = corticosterona com período de suspensão.

### 5.5.2 Imunomarcção de PSD95

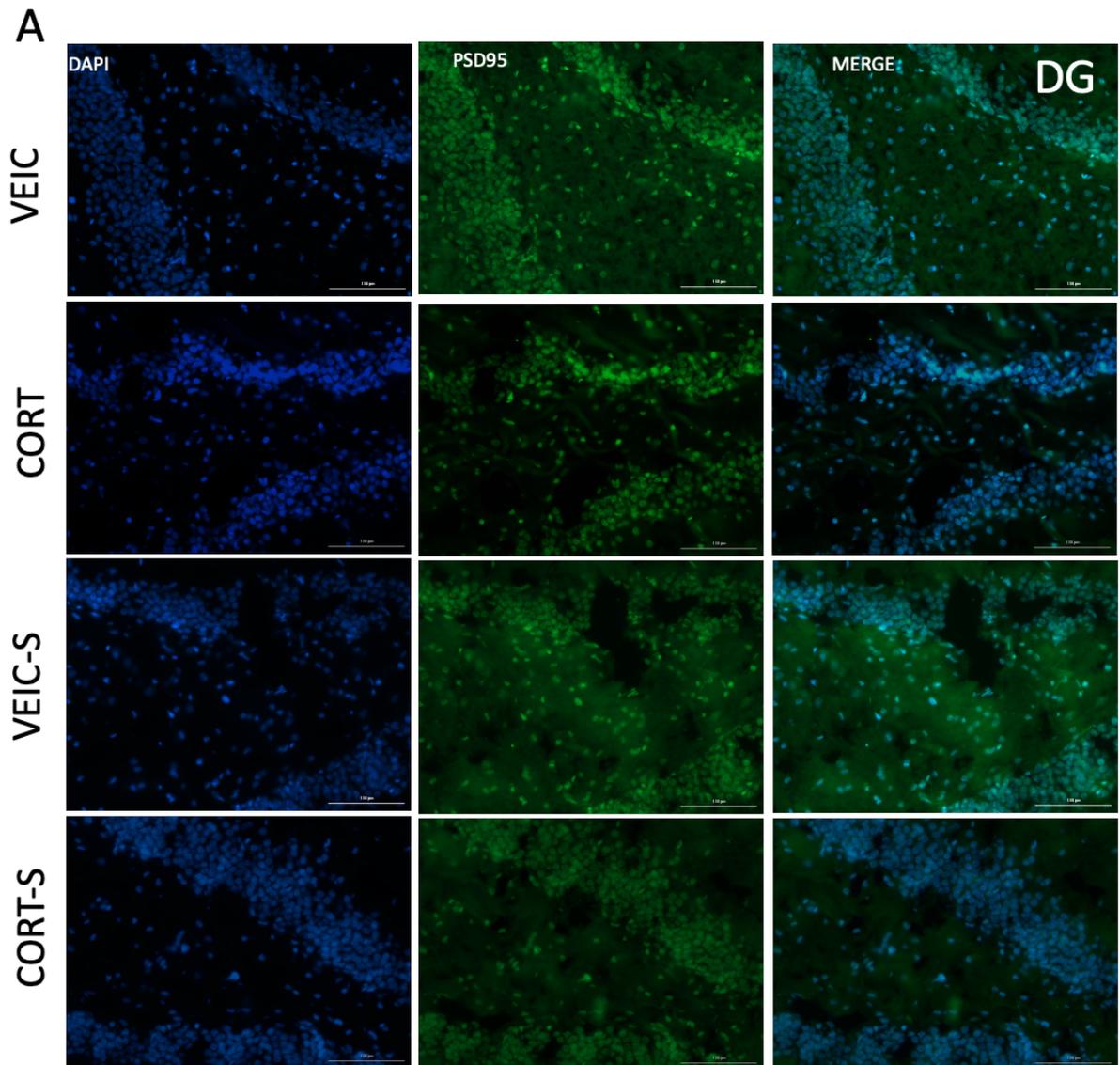
A imunofluorescência para PSD95 no hipocampo de ratos de todos os grupos experimentais foi analisada a partir de fotomicrografias pela intensidade de fluorescência da região marcada (Figura 15A-D).

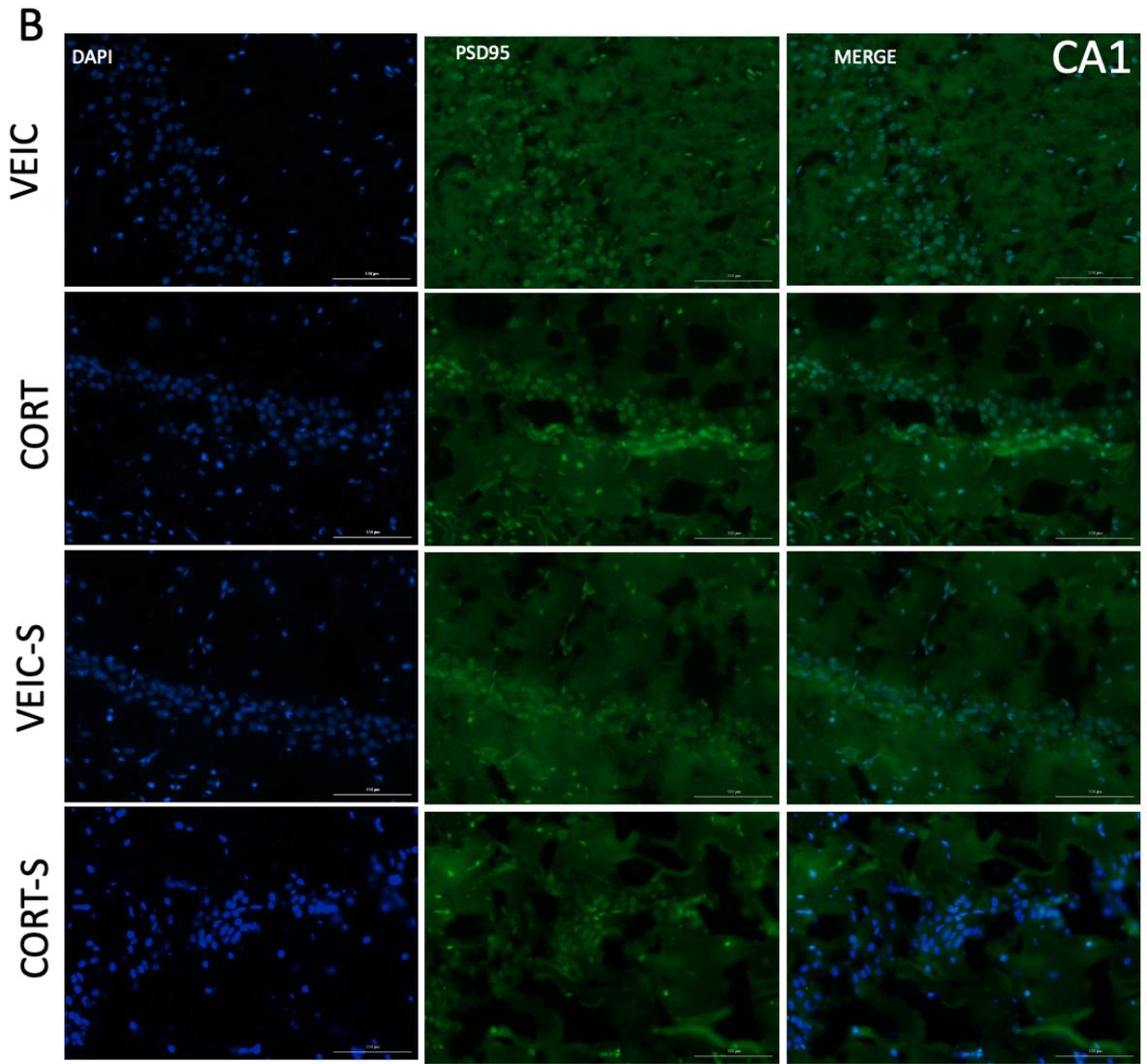
Na análise ANOVA de duas vias houve efeito significativo do fator “tratamento” em CA1 [F (1, 12) = 11,24; P=0,0058]. No teste de comparações múltiplas houve redução da intensidade média de fluorescência no grupo CORT em comparação ao grupo VEIC ( $p=0,0258$ ). Não foram observadas diferenças entre os grupos VEIC-S e CORT-S ( $p=0,5173$ ) e entre os grupos CORT e CORT-S ( $p=0,2778$ ). (Figura 16B)

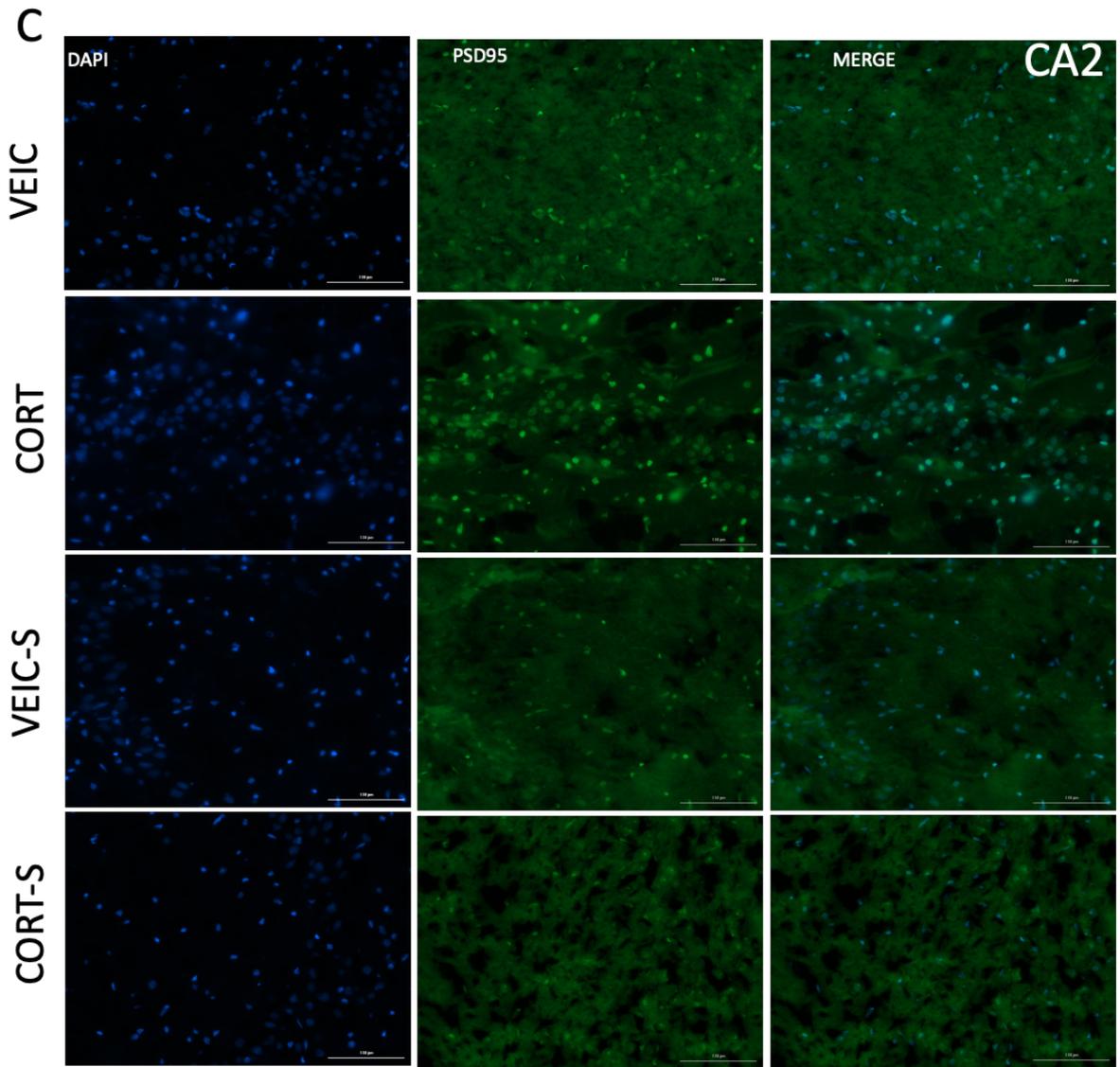
Na região CA1, houve redução da intensidade média de fluorescência no grupo CORT em comparação ao grupo VEIC ( $p=0,0258$ ) e não foram observadas diferenças entre os grupos VEIC-S e CORT-S ( $p=0,4298$ ) e entre os grupos CORT e CORT-S ( $p=0,0602$ ). (Figura 14B). Na região CA2 do hipocampo, a interação dos fatores [F (1, 12) = 5,333; P=0,0395] e o fator “tratamento” isoladamente [F (1, 12) = 20,52; P=0,0007]. Houve redução da fluorescência no grupo CORT em comparação ao grupo VEIC ( $p=0,0020$ ) Quanto à expressão de NMDA nas

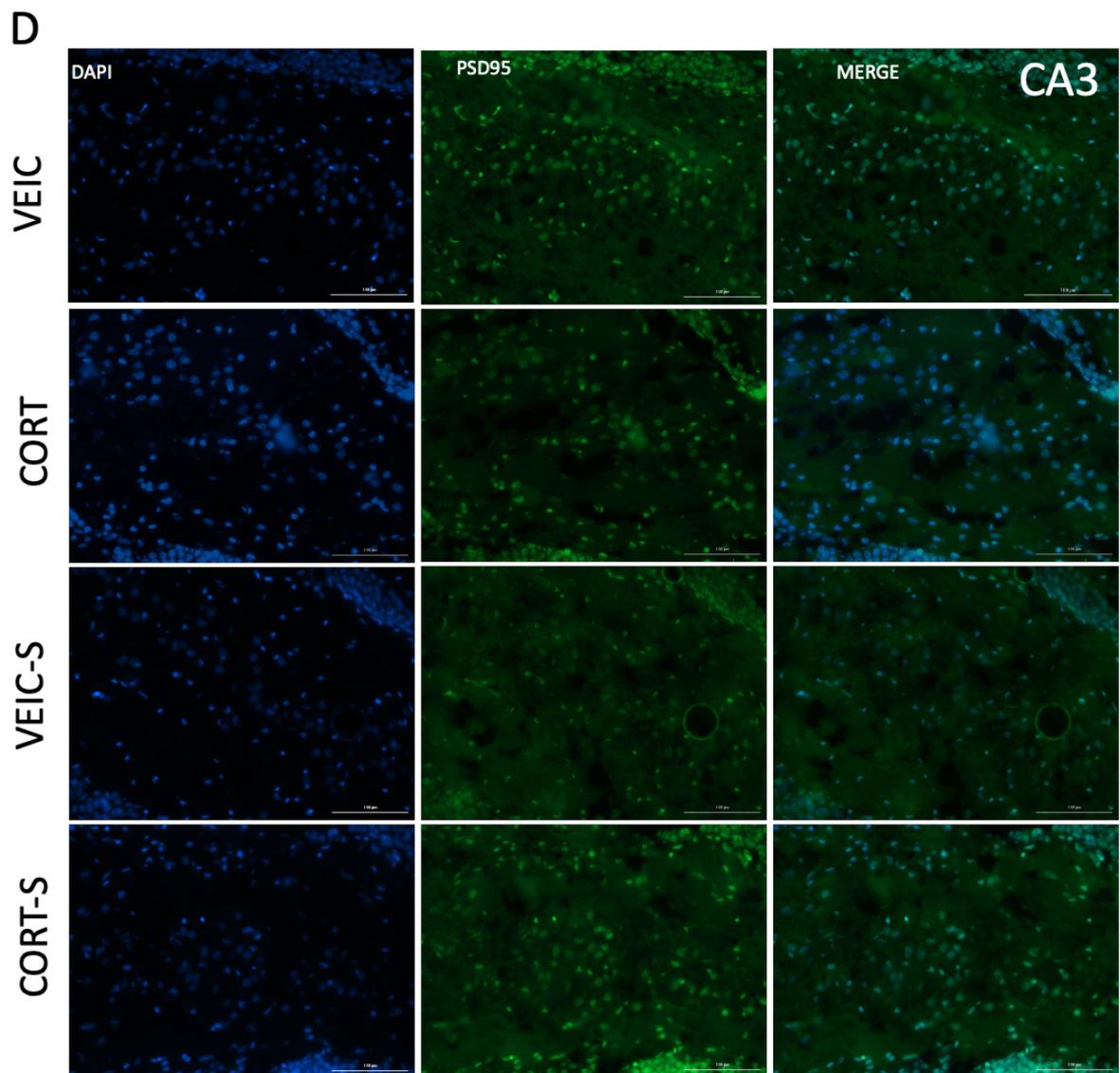
regiões DG e CA3 não houve diferença significativa entre os grupos analisados. (Figuras 16A e 16D).

**Figura 15.** Imunoexpressão do marcador PSD95 nas regiões DG, CA1, CA2 e CA3 do hipocampo de ratos submetidos ao modelo de depressão induzida por corticosterona e após suspensão do fármaco.



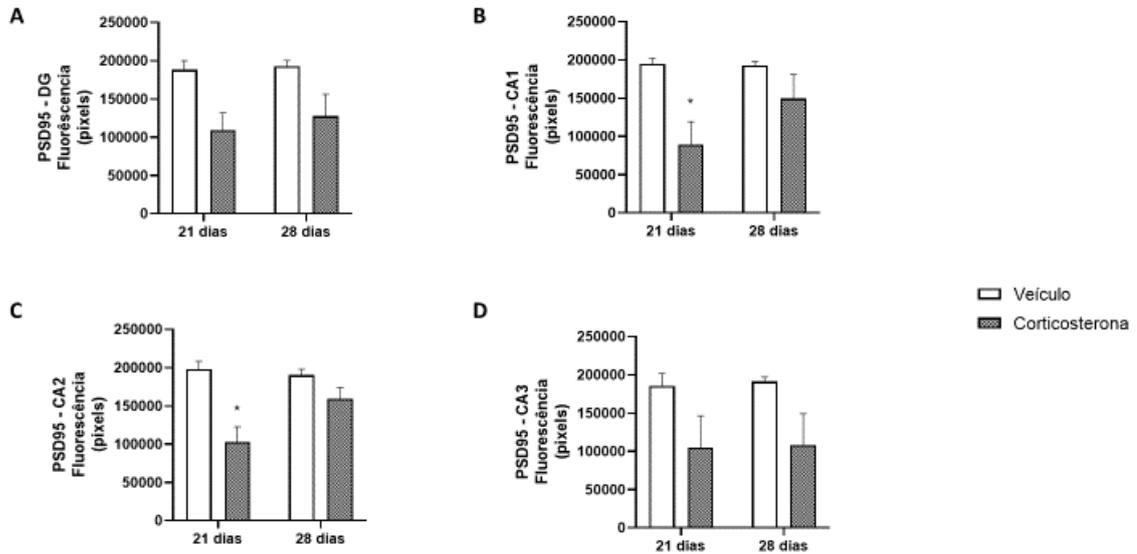






Fonte: dados da pesquisa. verde: PSD95; azul: DAPI (marcador nuclear). Aumento: 200 x.  
 Escala: 100  $\mu$ m. Abreviações: DG: giro denteado; CA: *Cornu Ammonis*; CORT: Corticosterona; VEIC: Veículo; CORT-S: Corticosterona + período de suspensão da droga; VEIC-S: Veículo + período de suspensão do veículo; Merge: sobreposição

**Figura 16.** Efeito da administração de corticosterona e da suspensão do fármaco na imunopressão de PSD95 no hipocampo



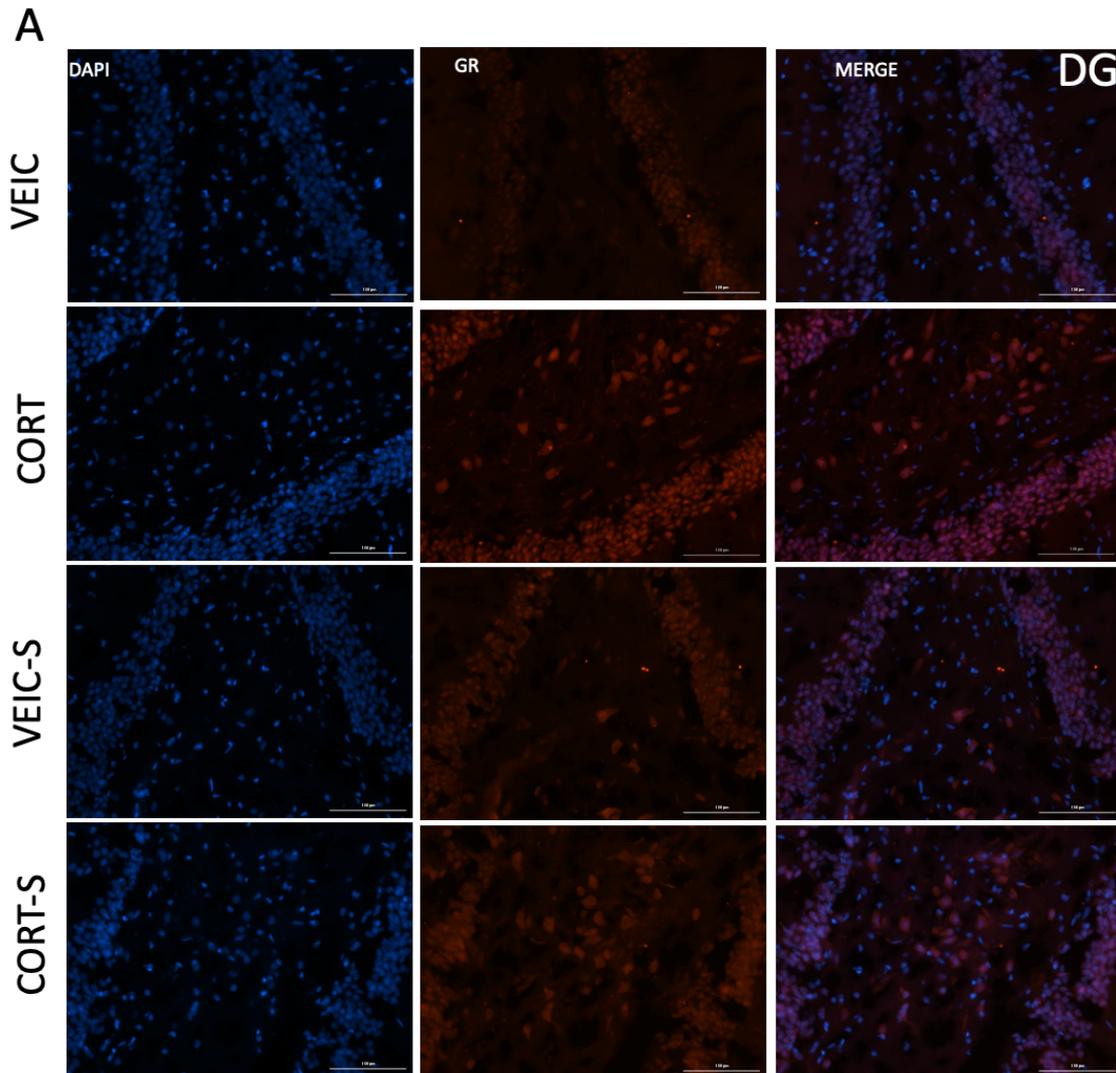
Ratos foram tratados com veículo ou corticosterona (40 mg/kg (s.c) durante 21 dias. Os animais dos grupos VEIC-S e CORT-S permaneceram 7 dias sem manipulações experimentais. Cada barra representa a média  $\pm$  erro padrão da média (SEM) da intensidade de fluorescência de acordo com ANOVA de duas vias seguida pelo teste *post-hoc* Tukey. ( $p < 0,05$ ) (\* Grupos diferentes do grupo VEIC;  $p < 0,05$ ). Abreviações: VEIC = veículo; CORT = corticosterona; VEIC-S = veículo com período de suspensão; CORT = corticosterona com período de suspensão.

### 5.5.3 Imunomarcção de GR

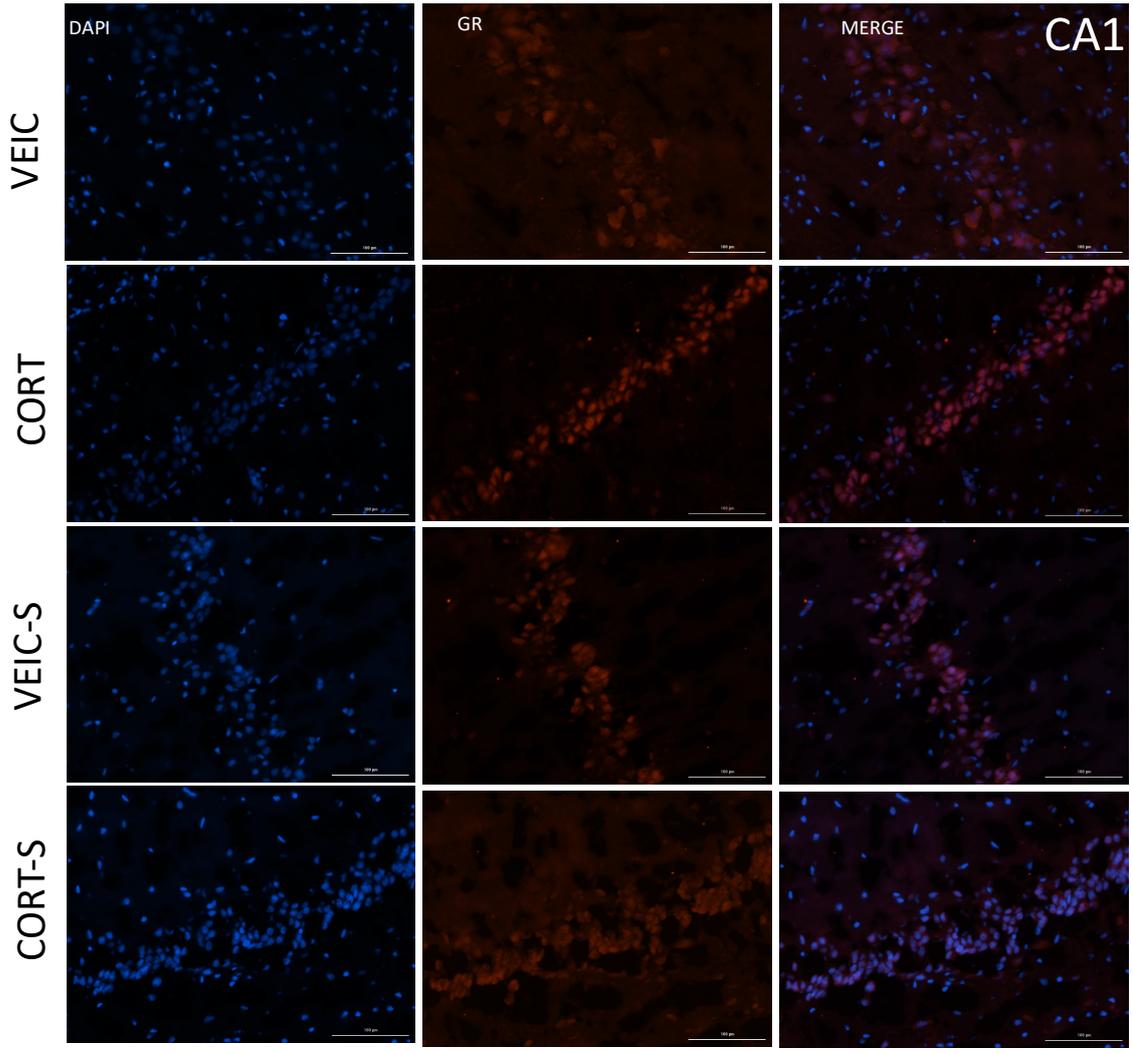
A imunofluorescência para GR no hipocampo de ratos de todos os grupos experimentais foi analisada a partir de fotomicrografias pela intensidade de fluorescência da região marcada (Figura 17A-D).

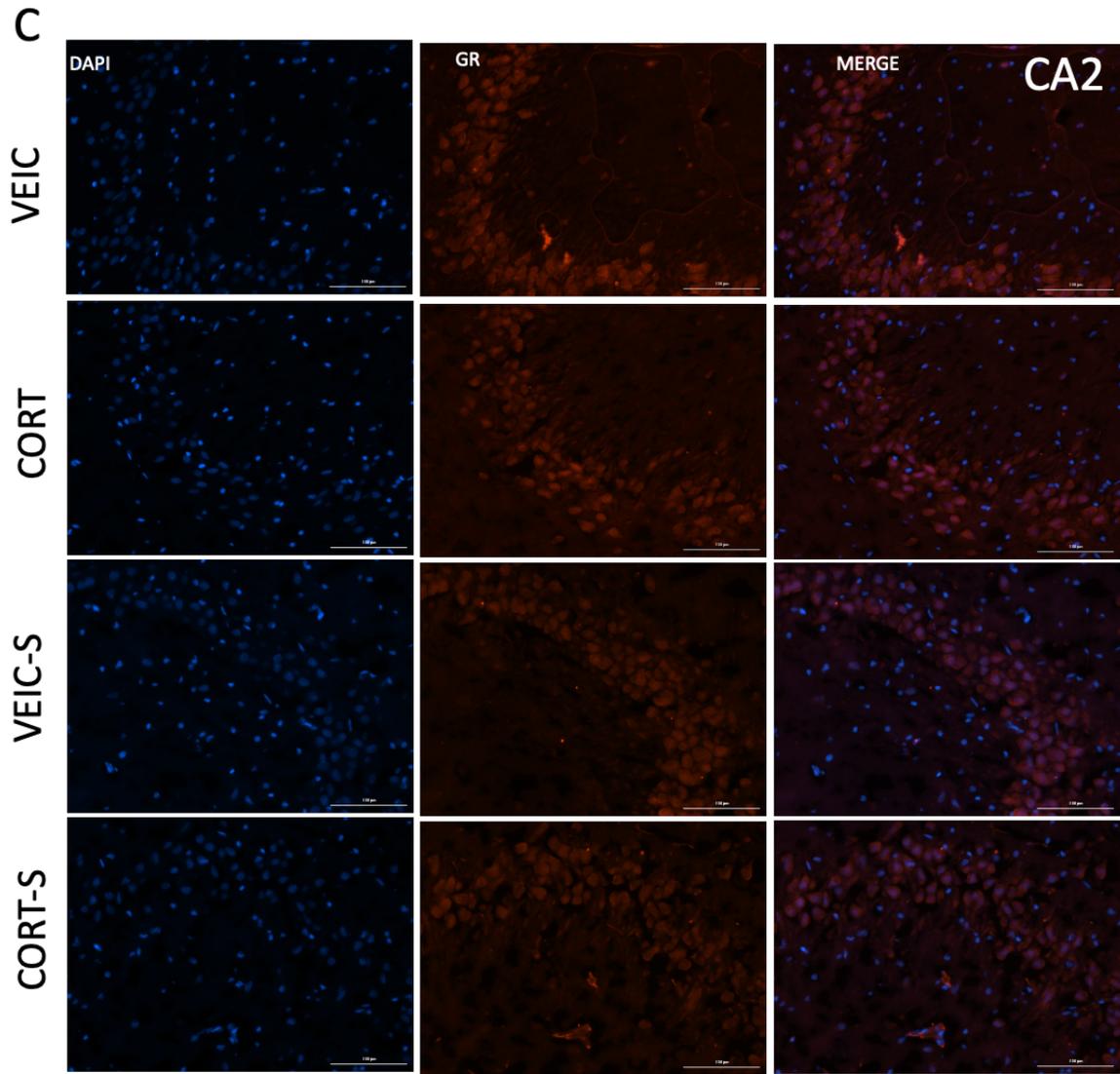
Nossos resultados não revelaram diferença significativa entre os grupos experimentais analisados. O grupo CORT em relação ao grupo VEIC nas regiões DG [MD: -12081; 95,00% IC da dif.: -28609 to 4446;  $P = 0.1868$ ], CA1 [MD: -33381; 95,00% IC da dif.: -69835 to 3073;  $P = 0.0767$ ], CA2 [MD: -5693; 95,00% IC da dif.: 38445 to 27059;  $P = 0.9536$ ] e CA3 [MD: -10851; 95,00% IC da dif.: -34498 to 12797;  $P = 0.5441$ ]. Do mesmo modo, não houve diferença na expressão de GR entre os grupos VEIC-S e CORT-S nas regiões analisadas. (Figura 18A-D)

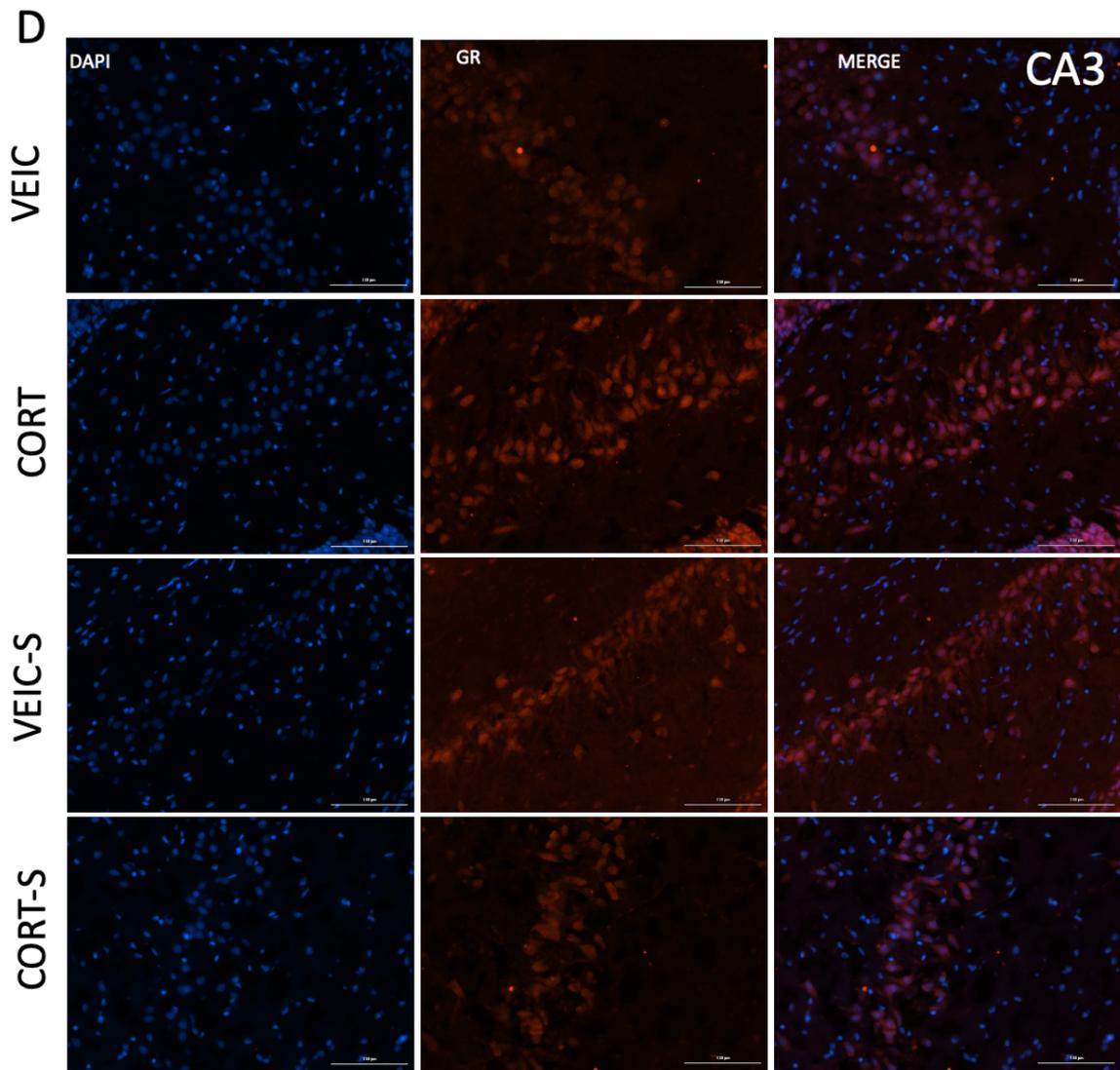
**Figura 17.** Imunoexpressão do marcador GR nas regiões DG, CA1, CA2 e CA3 do hipocampo de ratos submetidos ao modelo de depressão induzida por corticosterona e após suspensão do fármaco.



B

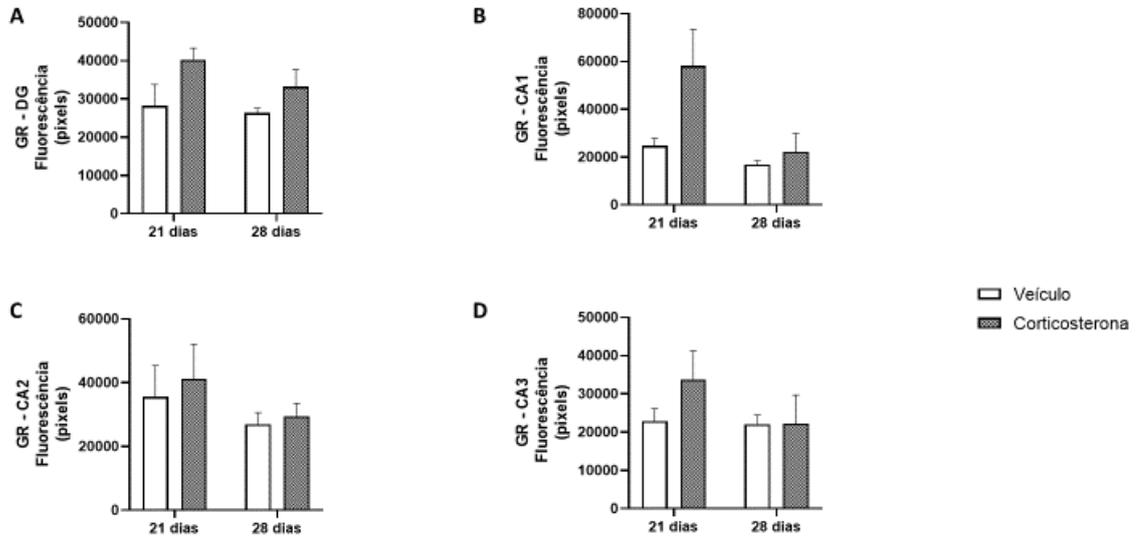






Fonte: dados da pesquisa. vermelho: GR; azul: DAPI (marcador nuclear). Aumento: 200 x.  
 Escala: 100 µm. Abreviações: DG: giro dentado; CA: *Cornu Ammonis*; CORT: Corticosterona; VEIC: Veículo; CORT-S: Corticosterona + período de suspensão da droga; VEIC-S: Veículo + período de suspensão do veículo; Merge: sobreposição

**Figura 18.** Efeito da administração de corticosterona e da suspensão do fármaco na imunoe expressão de GR no hipocampo



Ratos foram tratados com veículo ou corticosterona (40 mg/kg (s.c) durante 21 dias. Os animais dos grupos VEIC-S e CORT-S permaneceram 7 dias sem manipulações experimentais. Cada barra representa a média  $\pm$  erro padrão da média (SEM) da intensidade de fluorescência de acordo com ANOVA de duas vias seguida pelo teste *post-hoc* Tukey. ( $p > 0,05$ ). Abreviações: VEIC = veículo; CORT = corticosterona; VEIC-S = veículo com período de suspensão; CORT = corticosterona com período de suspensão.

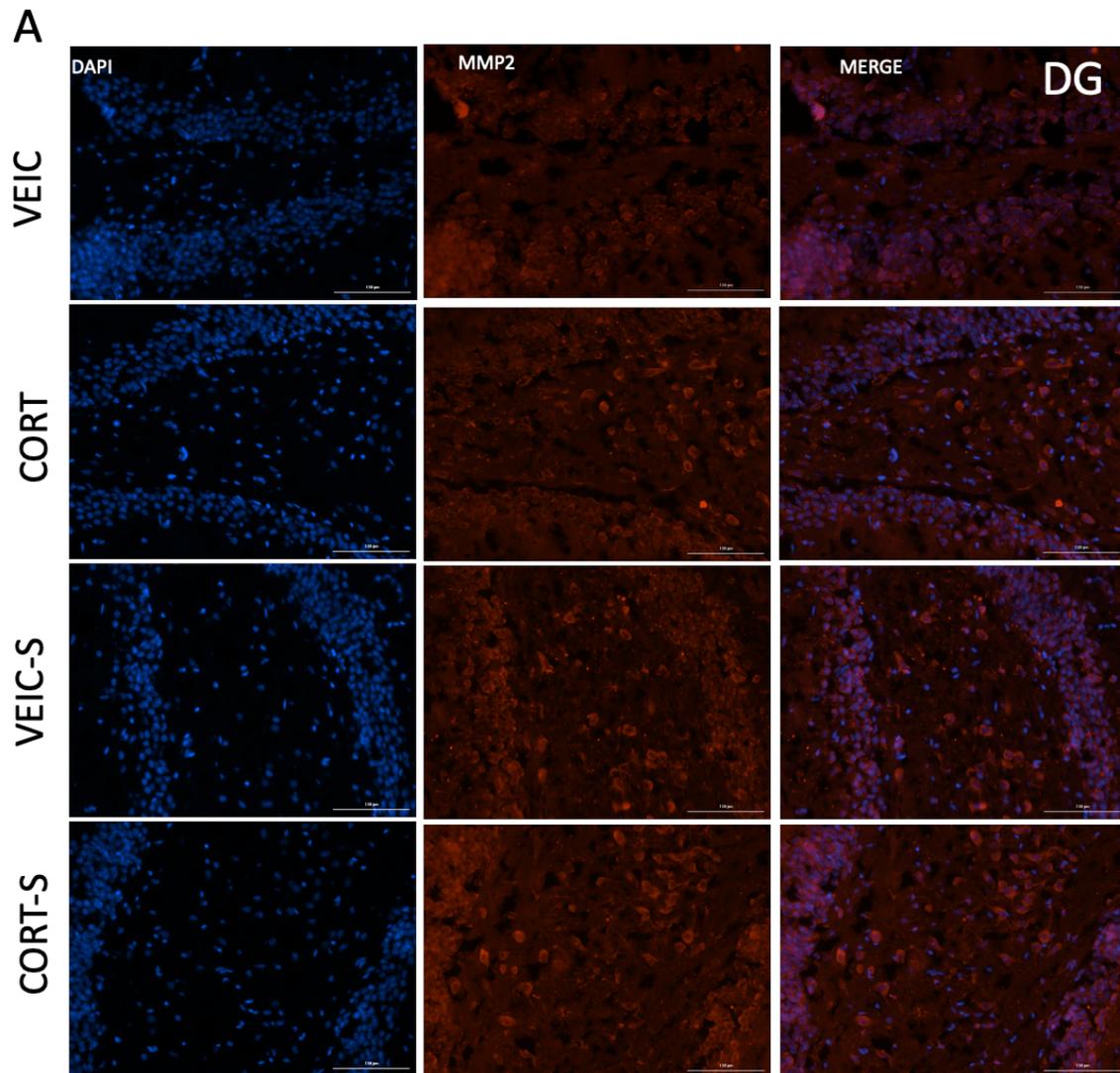
### 5.5.3 Imunomarcção de MMP2

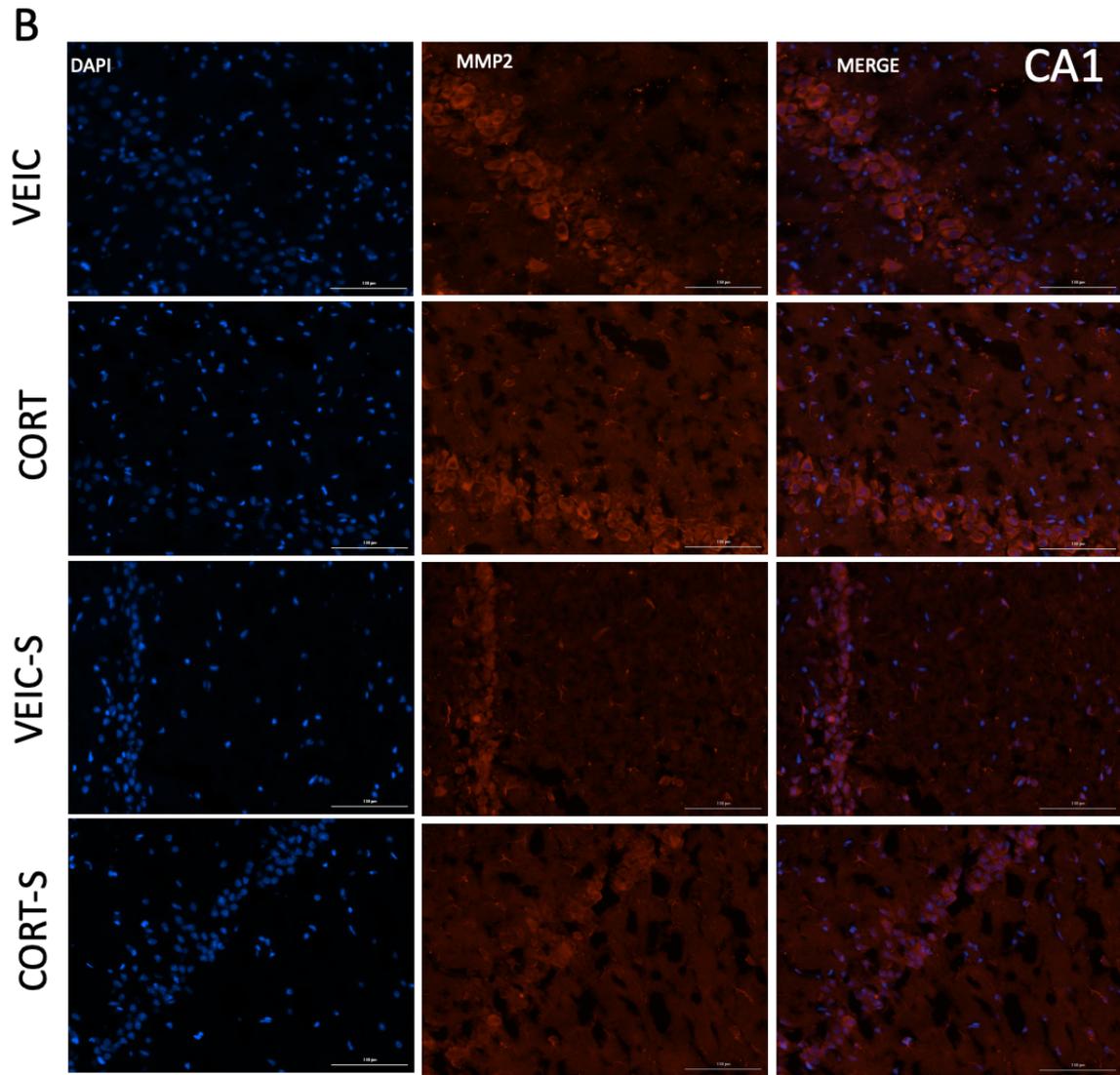
A imunofluorescência para MMP2 no hipocampo de ratos de todos os grupos experimentais foi analisada a partir de fotomicrografias pela intensidade de fluorescência da região marcada (Figura 19A-D).

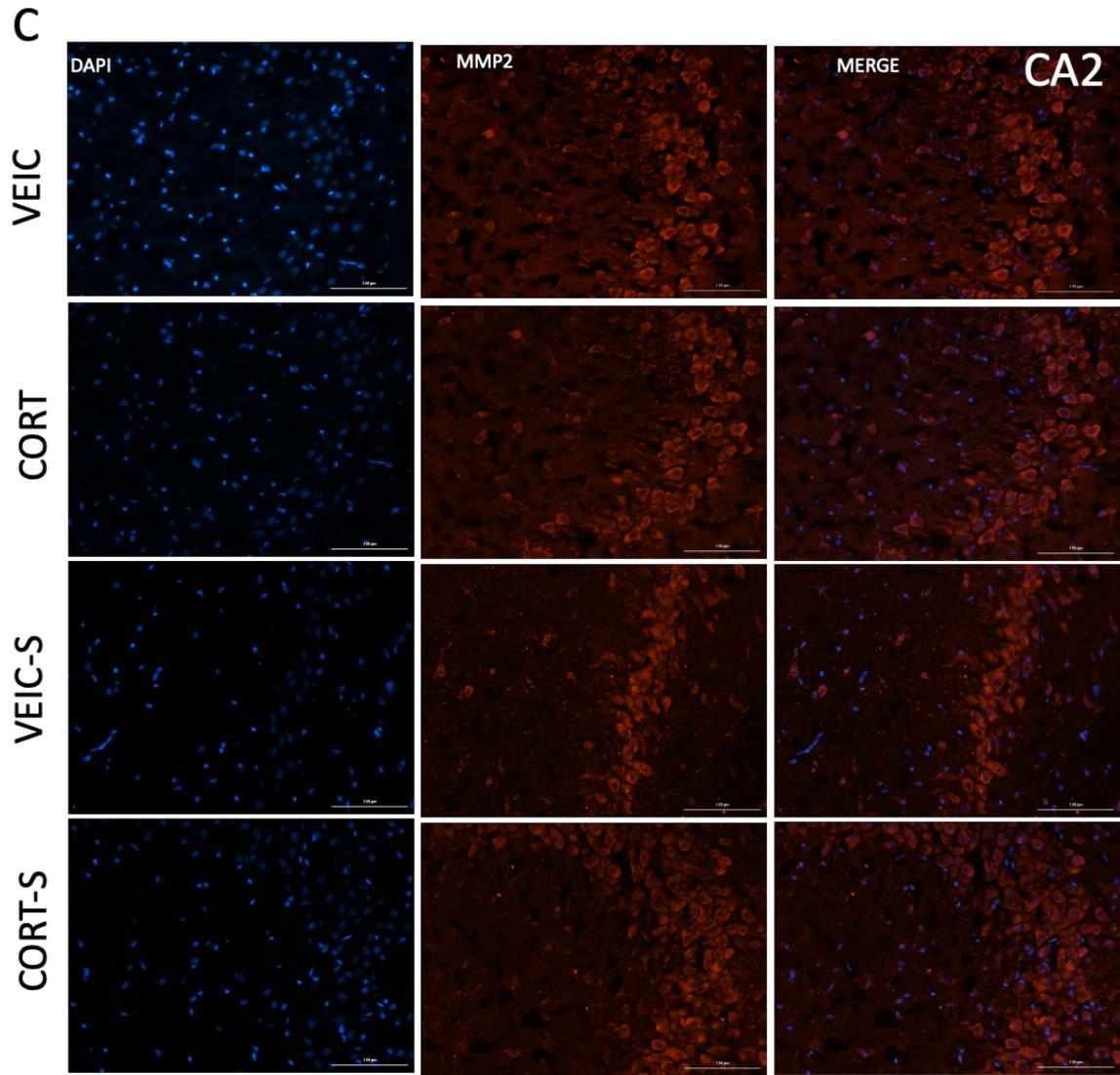
Na região DG, a análise ANOVA de duas vias mostrou efeito significativo do fatores “duração do protocolo” [ $F(1, 12) = 6.514$ ;  $P = 0.0254$ ] e “tratamento” [ $F(1, 12) = 18.70$ ;  $P = 0.0010$ ]. Houve aumento da intensidade média de fluorescência no grupo CORT em comparação ao grupo VEIC ( $p = 0,0044$ ) e redução da fluorescência no grupo CORT-S em relação ao grupo CORT ( $p = 0,0388$ ). Não foram observadas diferenças entre os grupos VEIC-S e CORT-S ( $p = 0,3125$ ) e entre os grupos CORT e CORT-S ( $p = 0,3433$ ). (Figura 20A)

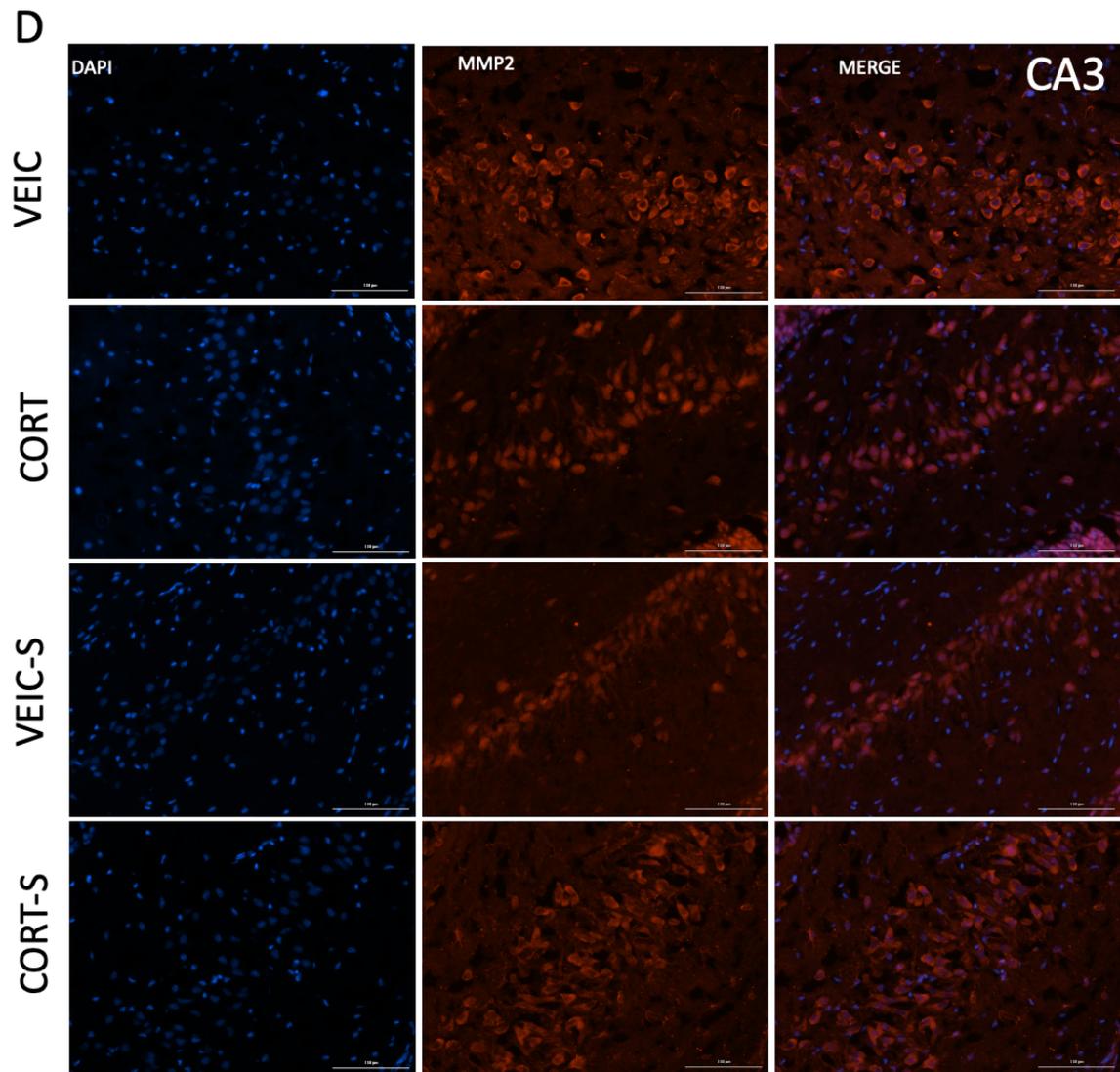
Não houve diferença nas demais regiões entre os grupos analisados. (Figura 20B-D)

**Figura 19.** Imunoexpressão do marcador MMP2 nas regiões DG, CA1, CA2 e CA3 do hipocampo de ratos submetidos ao modelo de depressão induzida por corticosterona e após suspensão do fármaco.



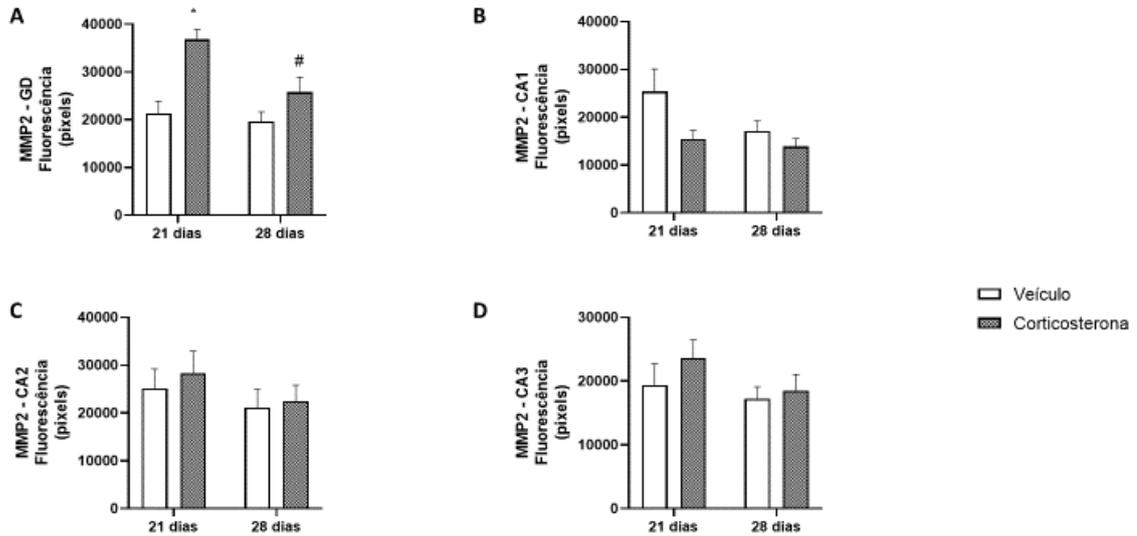






Fonte: dados da pesquisa. vermelho: MMP2; azul: DAPI (marcador nuclear). Aumento: 200 x.  
 Escala: 100  $\mu$ m. Abreviações: DG: giro dentado; CA: *Cornu Ammonis*; CORT: Corticosterona; VEIC: Veículo; CORT-S: Corticosterona + período de suspensão da droga; VEIC-S: Veículo + período de suspensão do veículo; Merge: sobreposição

**Figura 20.** Efeito da administração de corticosterona e da suspensão do fármaco na imunoe expressão de MMP2 no hipocampo



Ratos foram tratados com veículo ou corticosterona (40 mg/kg (s.c) durante 21 dias. Os animais dos grupos VEIC-S e CORT-S permaneceram 7 dias sem manipulações experimentais. Cada barra representa a média  $\pm$  erro padrão da média (SEM) da intensidade de fluorescência de acordo com ANOVA de duas vias seguida pelo teste *post-hoc* Tukey. ( $p < 0,05$ ) (\* Grupos diferentes do grupo VEIC # Grupos diferentes do grupo CORT  $p < 0,05$ ). Abreviações: VEIC = veículo; CORT = corticosterona; VEIC-S = veículo com período de suspensão; CORT = corticosterona com período de suspensão.

## 6 DISCUSSÃO

O presente estudo se propôs a avaliar alterações do modelo de depressão induzida pela administração de corticosterona durante 21 dias e após 7 dias de suspensão do fármaco em relação ao fenótipo depressivo, à expressão gênica em hipocampo e hipotálamo e à expressão de marcadores histológicos em hipocampo.

Inicialmente, quanto à evolução ponderal dos animais, verificamos que nos animais tratados com corticosterona o ganho de peso foi menor que nos animais tratados com salina, em concordância com trabalhos anteriores (GREGUS *et al.*, 2005b; JOHNSON; FOURNIER; KALYNCHUK, 2006; XIE *et al.*, 2020). A perda de peso é um indicativo importante do fenótipo depressivo em ratos no modelo de indução com corticosterona (STERNER; KALYNCHUK, 2010) e a diferença de peso entre os ratos CORT-S e VEIC-S se manteve durante o período de suspensão da droga, consistente com estudos que mostram a persistência desse efeito por até 21 dias (BUSH *et al.*, 2003; LEBEDEVA *et al.*, 2020; LEBEDEVA; CARUNCHO; KALYNCHUK, 2017b). A falha desses animais em recuperar o peso pode ser devido à insuficiência adrenal instalada durante o tratamento. Como esperado, houve marcante redução no peso das adrenais dos grupos CORT em comparação com seus respectivos controles, evidenciando que a produção de corticosterona endógena praticamente cessou e a supressão do eixo HPA já bem caracterizada nesse modelo (STANIĆ *et al.*, 2017).

O tratamento com corticosterona não alterou a atividade locomotora dos animais no teste do campo aberto em concordância com outros estudos (DING *et al.*, 2018; MARKS; FOURNIER; KALYNCHUK, 2009) e em modelos de indução da depressão baseados no estresse (LIU, Li *et al.*, 2019), embora resultados de aumento da atividade locomotora pela corticosterona também sejam relatados (BADR; ATTIA; AL-RASHEED, 2020).

A depressão – e a exposição ao estresse ou aos glicocorticóides – é frequentemente associada a cognição prejudicada, com déficits observados na memória de trabalho verbal e espacial e na função executiva – formas de memória dependentes do hipocampo em humanos (REPPERMUND *et al.*, 2009; WITHALL; HARRIS; CUMMING, 2010). Consistente com estudos em humanos, roedores expostos repetidamente ao estresse ou à corticosterona exibem déficits em várias tarefas que refletem habilidades espaciais e funções executivas (HUGHES, 2004; MARAMIS; MAHAJUDIN; KHOTIB, 2021). Entretanto, nossos resultados não mostraram diferenças na avaliação da memória de trabalho no teste do labirinto em Y. Isso pode ser devido ao fato de as deficiências cognitivas induzidas pelo estresse poderem ser dose e

tempo dependentes (STERNER; KALYNCHUK, 2010b). A administração de corticosterona durante 21 dias prejudica orientação espacial no labirinto de Barnes, mas não a memória de trabalho no labirinto em Y, a qual é encontrada alterada apenas após 56 dias de administração de corticosterona (COBURN-LITVAK *et al.*, 2003). De fato, ratos mostram alternância espontânea diminuída em um labirinto radial de 8 braços após 9 semanas de implante de liberação de corticosterona (COBURN-LITVAK *et al.*, 2003; DACHIR *et al.*, 1993).

Os resultados dos testes da suspensão pela cauda e do nado forçado mostraram que os animais do grupo CORT apresentaram um fenótipo depressivo-símile, demonstrado pelo tempo de imobilidade aumentado e comportamentos de fuga reduzidos. Esse efeito foi mantido mesmo após 7 dias da suspensão da corticosterona. Sabe-se que o teste do nado forçado é usado frequentemente para avaliação de resposta a drogas antidepressivas, mas nem todos os antidepressivos resultam em diminuição do tempo de imobilidade no teste e no reteste (CRYAN; VALENTINO; LUCKI, 2005). A resposta de imobilidade no teste do nado forçado é criticamente dependente da ação dos glicocorticóides durante ou logo após o teste inicial (REUL, 2014). Os glicocorticóides intermediam a aquisição de memória relacionada ao estresse. Evidências apontam para participação dos GR, e não dos MR, nessa resposta: o pré-tratamento com antagonista de GR, mas não com espirolactona, prejudica o tempo de imobilidade no reteste. Esse mesmo efeito é observado em ratos adrenalectomizados e pode ser resgatado pela administração de glicocorticóides, mas não pela administração de mineralocorticóides (DE KLOET; MOLENDIJK, 2016).

É interessante observar que no teste da suspensão pela cauda houve diferença entre os grupos CORT e CORT-S, com o tempo de imobilidade aumentando nesse último. Estudos anteriores demonstram que o envelhecimento e o peso corporal influenciam o tempo de imobilidade nesse teste (BOGDANOVA *et al.*, 2013; SHOJI; MIYAKAWA, 2019). No presente trabalho, é improvável que isso seja um artefato devido a alterações da atividade locomotora, uma vez que o tratamento com corticosterona não produziu efeitos no teste do campo aberto. O fato de todos os animais terem sido expostos ao teste apenas uma vez elimina a possibilidade de habituação ao teste. Tomados em conjunto, esses dados endossam a persistência do fenótipo depressivo mesmo após a suspensão da corticosterona, sugerindo que seria necessário um tempo superior a 7 dias para recuperação dos sintomas.

Recentemente, estudos envolvendo os mecanismos comportamentais, cognitivos e fisiológicos têm ajudado na compreensão da consolidação da resposta ao estresse. Muitas memórias emocionais são armazenadas inconscientemente na amígdala e no hipocampo e

podem emergir no contexto da exposição a uma situação ou local que ativou o sistema de estresse anos antes (PALOMERO-GALLAGHER; AMUNTS, 2022). Déficits no processamento de emoções são características patológicas centrais do TDM, cujos doentes tendem a recrutar um nível anormalmente alto de emoções negativas e um nível anormalmente baixo de emoções positivas (PENG *et al.*, 2020).

A ansiedade que surge durante a resposta ao estresse, mantém a atenção do indivíduo no estímulo ameaçador, ignorando estímulos menos críticos. Entretanto, respostas adaptativas, quando desreguladas, podem tornar-se doença (GOLD, 2015b). Fortes estressores psicológicos tem impacto duradouro no comportamento e sua consolidação envolve mudanças moleculares, (REUL, 2014), morfológicas (ZHANG *et al.*, 2018) e funcionais em regiões límbicas do cérebro, como hipocampo e amígdala (KAISER *et al.*, 2015).

Considerando a susceptibilidade do hipocampo ao estresse, dado os altos níveis de GR e glutamato, sua participação da regulação do eixo HPA (LIU, Wei *et al.*, 2017) e sua relação com a recorrência de episódios depressivos ao longo da vida (JURUENA, 2014), o presente trabalho avaliou o efeito da corticosterona na expressão do receptor NMDA. Foi encontrado aumento da expressão do receptor NMDA (NR2B) no giro denteado de ratos do grupo CORT. Os receptores contendo as subunidades NR2A e NR2B são considerados os subtipos predominantes de receptores NMDA funcionais nos neurônios (WANG, QIN; WANG; CHEN, 2021). Foi demonstrado que o tratamento de dez dias com corticosterona aumenta a expressão de mRNA das subunidades NR2A e NR2B no CA1 (WEILAND; ORCHINIK; TANAPAT, 1997), bem como a corticosterona administrada por três semanas na água de beber provoca aumento dos níveis da subunidade NR2B no hipocampo dorsal de camundongos machos (KLUG *et al.*, 2012).

De modo similar, o estresse crônico imprevisível provoca aumento da expressão gênica e proteica da subunidade obrigatória NR1, bem como das subunidades NR2A e NR2B no hipocampo ventral em ratos adultos (CALABRESE *et al.*, 2012). No mesmo modelo, há aumento dos níveis de NR1 em frações da membrana sináptica do hipocampo dos ratos estressados e uma tendência de aumento na expressão das subunidades de NR2B, sem alterações de NR2A, mas nenhuma alteração é observada quando foram estudados homogenatos de todo o hipocampo (ELHUSSINY *et al.*, 2021).

A corticosterona promove aumento rápido e transitório na sinalização de Ca<sup>2+</sup> mediada pelo receptor NMDA em cultura de neurônios do hipocampo de ratos neonatos. Os autores sugerem que esse efeito pode ser mediado pela ligação da corticosterona a receptores na

membrana celular, pois quando ligada à albumina de soro bovino (molécula não permeável à membrana celular) o efeito é mantido (TAKAHASHI *et al.*, 2002). Em contraste, quando são estudados neurônios de animais adultos o efeito observado é de redução da sinalização  $Ca^{2+}$ /NMDA na região CA1 (SATO *et al.*, 2004). É interessante destacar que no período neonatal, nos receptores NMDA sinápticos predominam a subunidade NR2B e, com o desenvolvimento, há aumento da subunidade NR2A, que conferem a característica de menor motilidade aos receptores NMDA e consequente maior estabilidade à sinapse glutamatérgica no adulto (TSE; BAGOTU; WONG, 2012). Adicionalmente, a exposição a corticosterona aumenta o dano celular, mensurado pela captação de iodeto de propídio, em cada região do hipocampo - efeitos que foram evitados pela co-exposição ao antagonista de NMDA, mas não pela co-exposição aos antagonistas de GR e MR, sugerindo que elevações relativamente breves nos níveis de corticosterona podem sensibilizar o hipocampo à lesão via receptores NMDA, independentemente da atividade do GR (MULHOLLAND *et al.*, 2006).

Um mecanismo importante para a expressão de LTP envolve o aumento do número de receptores AMPA na membrana plasmática nas sinapses (MALENKA; BEAR, 2004). A ativação do receptor NMDA pode ter diferentes efeitos no tráfego do receptor AMPA. Em cultura de neurônios maduros, o predomínio da subunidade NR2A promove a expressão de receptores AMPA na membrana celular, enquanto a NR2B a inibe (MYUNG *et al.*, 2005).

É interessante citar que segundo alguns autores a subunidade NR2B tem pouca influência na LTP mediada pelo receptores NMDA no hipocampo de animais adultos (ZHONG *et al.*, 2006), sendo mais influenciada pela sinalização mediada pela subunidade NR2A (KÖHR *et al.*, 2003). Alternativamente, a proporção de receptores NR2A:NR2B tem sido proposta como um determinante da direção da plasticidade sináptica, alterando o equilíbrio entre LTP e LTD (MACDONALD; JACKSON; BEAZELY, 2006; MALLON; AUBERSON; STONE, 2005).

No presente trabalho, a expressão de *GRIN1* (NR1) no hipotálamo estava reduzida. A sinalização hipocampo-hipotálamo constitui um importante regulador da atividade do eixo HPA. O hipotálamo, junto com tronco cerebral e amígdala, recebe sinais durante o estresse agudo (KHAN *et al.*, 2011), promovendo potencialização de curto prazo na sinapses em resposta ao estímulo e que pode persistir por dias. Interações sociais (STERLEY *et al.*, 2018) ou estressores como imobilização ou exposição a predador podem promover LTD da função dos receptores NMDA pós-sinápticos dependente de CRH, mas os mecanismos ainda são incertos (KUZMISKI *et al.*, 2010). Entretanto, quando submetidos ao estresse crônico

imprevisível o resultado foi o aumento da subunidade NR1 no PVN (ZHOU *et al.*, 2018). Em condições basais, os receptores NMDA têm ação inibitória do tônus no PVN e do eixo HPA (MARTY *et al.*, 2020). Assim, infere-se que uma redução na expressão dos receptores NMDA contribua para desinibição do eixo HPA, acentuando a resposta ao estresse.

O presente estudo mostrou redução na expressão da proteína PSD95 nas regiões CA1 e CA2 hipocampo de animais do grupo CORT em consonância com outros estudos (CAMARGO; DALMAGRO; DE SOUZA; *et al.*, 2020; CAMARGO *et al.*, 2021). A proteína PSD95 é uma proteína de andaime localizada em sinapses excitatórias e está envolvida na estabilização, recrutamento e tráfego de receptores NMDA e AMPA para a membrana pós-sináptica (COLEY; GAO, 2018). Sugere-se que a PSD95 atue como um regulador de LTP e/ou LTD, determinando assim o tamanho, a forma e o número de espinhas dendríticas para transmissão sináptica (EL-HUSSEINI *et al.*, 2000; SHINOHARA, 2012). De fato, o tratamento com LPS e o estresse crônico imprevisível promovem a redução da expressão de PSD95 no hipocampo (SONG *et al.*, 2020). Interessante destacar que ratos machos expostos a estresse pré-natal apresentam maior susceptibilidade à depressão e exibem menor expressão de PSD95 no hipocampo, evidenciando a indução de mudanças ao longo da vida nas respostas comportamentais e neurofisiológicas a condições ambientais adversas (WANG, Y. *et al.*, 2015).

O achado de redução da expressão de *DLG4* no hipotálamo no presente trabalho é congruente com outros trabalhos que evidenciam redução da expressão gênica de *DLG4* no hipotálamo de camundongos submetidos ao estresse crônico imprevisível (ZHUANG *et al.*, 2016) e a redução da proteína PSD95 no hipotálamo de animais submetidos a modelo de depressão na perimenopausa e no estresse crônico (YANG *et al.*, 2019). Outros estudos usando o modelo de estresse crônico, porém, falharam em demonstrar o mesmo resultado (LIU, Xiao Long *et al.*, 2015). Por outro lado, são relatados que o enriquecimento ambiental aumenta plasticidade dependente da experiência resultando níveis aumentados de PSD95 no hipotálamo de camundongos, dentre outras áreas cerebrais (NITHIANANTHARAJAH; LEVIS; MURPHY, 2004). O rearranjo estrutural hipotalâmico parece estar envolvido nos efeitos endócrinos de longo prazo observados após estresse crônico pré-natal e no adulto. Os resultados diferem dependendo do sexo do animal afetado, sendo detectados níveis de PSD95 aumentados no hipotálamo de fêmeas e diminuídos nos machos tanto por estresse pré-natal e como no adulto (GARCÍA-CÁCERES *et al.*, 2010). Apesar de sua importância na regulação do eixo HPA, a plasticidade no hipotálamo não é tão bem estudada como no hipocampo e nossos achados

somam informações inéditas sobre a plasticidade sináptica no hipotálamo no modelo de depressão induzido por corticosterona.

A plasticidade neural é um mecanismo fundamental da adaptação neuronal e está comprometida na depressão. Essa afirmação é reforçada pela eficácia terapêutica positiva dos antagonistas do receptor NMDA no TDM(HO; ZHANG, 2016; LIU, Wei *et al.*, 2017; MARCATILI *et al.*, 2020). Nossos resultados indicam o envolvimento da plasticidade sináptica mediada pelo NMDA no modelo de depressão induzido pela administração de corticosterona, representada pelo aumento da expressão de NMDA no DG e redução da expressão de PSD95 em CA1 e CA2. No entanto, 7 dias após suspensão da corticosterona, não foi possível observar a persistência das alterações nessas vias, sugerindo que os efeitos da exposição ao corticosterona sobre o NMDA são reversíveis e que, provavelmente, essa via não é a responsável pela manutenção do fenótipo depressivo observado nos animais.

Apesar de não observarmos diferenças quanto à expressão dos genes *NR3C1* (GR) no hipocampo ou hipotálamo, a exposição a corticosterona tem sido relacionada tanto a redução (CAMARGO; DALMAGRO; M. ROSA; *et al.*, 2020) quanto ao aumento da expressão de GR no hipocampo (PEREIRA *et al.*, 2020). Estresse psicológico agudo grave, representando pela exposição a um predador, também promove aumento da expressão de GR no hipocampo dos animais estressados (WANG, Qingsong *et al.*, 2012). Por outro lado, no estresse crônico de contenção, o efeito encontrado é de redução na expressão de GR no hipocampo (CHIBA *et al.*, 2012), resultado também obtido em animais submetidos a estresse pré-natal e a combinação de estresse crônico e agudo (GREEN *et al.*, 2011). Na depressão tem sido implicados tanto o excesso de glicocorticóides exercendo efeitos prejudiciais via GRs funcionais, como GRs disfuncionais falhando em exercer feedback negativo e aumentando os níveis de glicocorticóides (ANACKER *et al.*, 2011). Tem sido proposto que o balanço dessa resposta depende da natureza do estímulo estressante, da experiência anterior e da ativação relativa de MRs, GRs e de outros sistemas neuromoduladores (SOUSA, Nuno; CERQUEIRA; ALMEIDA, 2008).

Encontramos aumento na expressão de *NR3C2* no grupo CORT-S em comparação ao CORT. Esse achado contribui para destacar a importância do MR na funcionalidade do eixo HPA e na suscetibilidade a transtornos psiquiátricos relacionados ao estresse (VINKERS *et al.*, 2015). Recentemente, o aumento da atividade ou expressão de MR cerebrais tem sido implicado na prevenção ou reversão os sintomas da depressão relacionada ao estresse, destacando-se como um possível mecanismo de resiliência no TDM (TER HEEGDE; DE RIJK; VINKERS, 2015).

A resiliência é um processo dinâmico que possibilita ao sujeito superar as consequências deletérias do estresse, mantendo o funcionamento físico e mental normal (SURGET; BELZUNG, 2022). O aumento de expressão do gene *NR3C2* observado após suspensão da corticosterona pode representar um mecanismo de recuperação do eixo-HPA após cessado o estresse, embora a reversão do fenótipo depressivo possa demorar até 21 dias (GREGUS *et al.*, 2005b).

Metaloproteinases de matriz estão implicadas em muitos processos, como sobrevivência celular, sinalização, angiogênese, inflamação e motilidade celular (CANDELARIO-JALIL; YANG; ROSENBERG, 2009). As células cerebrais expressam MMPs constitutivas e induzíveis em resposta ao estresse e, nesse contexto, as alterações na matriz extracelular tem sido alvo de crescente interesse (BLANCO; CONANT, 2021). Um dos mecanismos observados a partir de estudos em ratos cronicamente estressados é a redução da concentração da forma madura de fatores de crescimento neural no hipotálamo, via degradação dependente de metaloproteinases de matriz e relacionado ao aumento de MMP2 e MMP9 ativados (KUCHARCZYK *et al.*, 2016). Esses dados sugerem que moduladores psicológicos podem influenciar, ainda que indiretamente, as atividades das diversas MMPs (BEROUN *et al.*, 2019)

Encontramos aumento da expressão de MMP2 no DG no grupo CORT. O equilíbrio entre os papéis benéficos e prejudiciais das MMPs é variável conforme a localização e fonte celular e a condição clínica em questão (LARONHA; CALDEIRA, 2020). Nossos resultados apontam para um papel deletério da MMP2, uma vez que está superexpressa em animais com fenótipo depressivo em comparação a animais controle. Adicionalmente, denotam uma reversibilidade desse mecanismo, considerando a redução na expressão de MMP2 no grupo CORT-S em comparação ao grupo CORT.

Como limitação do nosso estudo apontamos a necessidade de identificar o momento em que o fenótipo depressivo é revertido e os mecanismos neuroquímicos atuantes nesse processo. São necessários estudos que avaliem o modelo depois de outros intervalos de suspensão do fármaco, a fim de apontar as vias atuantes tanto na manutenção como na reversão do comportamento depressivo-símile.

Em síntese, esse trabalho explorou vias que recentemente tem sido implicadas na patogênese da depressão, trazendo evidências da sua recuperação após cessada a administração exógena de corticosterona. Demonstramos que após 7 dias de suspensão da corticosterona, os animais apresentavam comportamento depressivo símile, apesar da tendência de recuperação das vias estudadas.

## 7 CONCLUSÃO

A partir do desenvolvimento deste estudo foi possível concluir que aumento da expressão do receptor NMDA (NR2B) observado no DG de animais do grupo CORT pôde predispor a lesão de hipocampo e a redução da expressão de *GRIN1* (NR1) no hipotálamo pode estar relacionada ao aumento da atividade do eixo HPA e da resposta ao estresse. A redução da expressão de *DLG4* (PSD95) no hipotálamo evidencia a atuação dos glicocorticoides no rearranjo estrutural hipotalâmico.

O aumento da expressão de *NR3C2* (MR) no grupo CORT-S em comparação ao CORT pode representar um mecanismo inicial de recuperação dos sintomas depressivo-símile. O aumento da expressão de MMP2 no DG no grupo CORT realça a função deletéria, porém reversível, de MMP2 no modelo de depressão induzida por corticosterona.

Diversos mecanismos biológicos estão implicados na depressão, que em um primeiro momento aparentem não estarem conectados, podem indicar que todos esses mecanismos estão relacionados e interconectados no TDM. E uma teoria capaz de incorporá-los e explicá-los poderia embasar futuras pesquisas e tratamentos melhor direcionados a heterogeneidade da depressão.

## REFERÊNCIAS

- AHMED, A. T.; FRYE, M. A.; RUSH, A. J.; BIERNACKA, J. M.; CRAIGHEAD, W. E.; MCDONALD, W. M.; BOBO, W. V.; RIVA-POSSE, P.; TYE, S. J.; MAYBERG, H. S.; FLAVIN, D. H.; SKIME, M. K.; JENKINS, G. D.; WANG, L.; KRISHNAN, R. R.; WEINSHILBOUM, R. M.; KADDURAH-DAOUK, R.; DUNLOP, B. W. Mapping depression rating scale phenotypes onto research domain criteria (RDoC) to inform biological research in mood disorders. **Journal of Affective Disorders**, vol. 238, 2018. <https://doi.org/10.1016/j.jad.2018.05.005>.
- ALAIYED, S.; MCCANN, M.; MAHAJAN, G.; RAJKOWSKA, G.; STOCKMEIER, C. A.; KELLAR, K. J.; WU, J. Y.; CONANT, K. Venlafaxine stimulates an MMP-9-dependent increase in excitatory/inhibitory balance in a stress model of depression. **Journal of Neuroscience**, vol. 40, no. 22, 2020. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.2387-19.2020>.
- ANACKER, C.; ZUNSZAIN, P. A.; CARVALHO, L. A.; PARIANTE, C. M. The glucocorticoid receptor: Pivot of depression and of antidepressant treatment? **Psychoneuroendocrinology**, vol. 36, no. 3, 2011. <https://doi.org/10.1016/j.psyneuen.2010.03.007>.
- ANDERZHANOVA, E.; KIRMEIER, T.; WOTJAK, C. T. Animal models in psychiatric research: The RDoC system as a new framework for endophenotype-oriented translational neuroscience. **Neurobiology of Stress**, vol. 7, 2017. <https://doi.org/10.1016/j.ynstr.2017.03.003>.
- ARAKI, R.; TACHIOKA, H.; KITA, A.; FUJIWARA, H.; TOUME, K.; MATSUMOTO, K.; YABE, T. Kihito prevents corticosterone-induced brain dysfunctions in mice. **Journal of Traditional and Complementary Medicine**, May 2021. <https://doi.org/10.1016/j.jtcme.2021.05.002>.
- ARCHER, J. Tests for emotionality in rats and mice: A review. **Animal Behaviour**, vol. 21, no. 2, 1973. [https://doi.org/10.1016/S0003-3472\(73\)80065-X](https://doi.org/10.1016/S0003-3472(73)80065-X).
- BADR, A. M.; ATTIA, H. A.; AL-RASHEED, N. Oleuropein Reverses Repeated Corticosterone-Induced Depressive-Like Behavior in mice: Evidence of Modulating Effect on Biogenic Amines. **Scientific Reports**, vol. 10, no. 1, 2020. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-60026-1>.
- BAO, A. M.; HESTIANTORO, A.; VAN SOMEREN, E. J. W.; SWAAB, D. F.; ZHOU, J. N. Colocalization of corticotropin-releasing hormone and oestrogen receptor- $\alpha$  in the

- paraventricular nucleus of the hypothalamus in mood disorders. **Brain**, vol. 128, no. 6, 2005. <https://doi.org/10.1093/brain/awh448>.
- BARABÁS, K.; GODÓ, S.; LENGYEL, F.; ERNSZT, D.; PÁL, J.; ÁBRAHÁM, I. M. Rapid non-classical effects of steroids on the membrane receptor dynamics and downstream signaling in neurons. **Hormones and Behavior**, vol. 104, 2018. <https://doi.org/10.1016/j.yhbeh.2018.05.008>.
- BERARDELLI, R.; KARAMOUZIS, I.; D'ANGELO, V.; ZICHI, C.; FUSSOTTO, B.; GIORDANO, R.; GHIGO, E.; ARVAT, E. Role of mineralocorticoid receptors on the hypothalamus-pituitary-adrenal axis in humans. **Endocrine**, vol. 43, no. 1, 2013. <https://doi.org/10.1007/s12020-012-9750-8>.
- BEROUN, A.; MITRA, S.; MICHALUK, P.; PIJET, B.; STEFANIUK, M.; KACZMAREK, L. MMPs in learning and memory and neuropsychiatric disorders. **Cellular and Molecular Life Sciences**, vol. 76, no. 16, 2019. <https://doi.org/10.1007/s00018-019-03180-8>.
- BLANCO, I.; CONANT, K. Extracellular matrix remodeling with stress and depression: Studies in human, rodent and zebrafish models. **European Journal of Neuroscience**, vol. 53, no. 12, 2021. <https://doi.org/10.1111/ejn.14910>.
- BOBIŃSKA, K.; SZEMRAJ, J.; CZARNY, P.; GAŁECKI, P. Expression and activity of metalloproteinases in depression. **Medical Science Monitor**, vol. 22, 2016a. <https://doi.org/10.12659/MSM.895978>.
- BOBIŃSKA, K.; SZEMRAJ, J.; CZARNY, P.; GAŁECKI, P. Role of MMP-2, MMP-7, MMP-9 and TIMP-2 in the development of recurrent depressive disorder. **Journal of Affective Disorders**, vol. 205, 2016b. <https://doi.org/10.1016/j.jad.2016.03.068>.
- BOGDANOVA, O. v.; KANEKAR, S.; D'ANCI, K. E.; RENSHAW, P. F. Factors influencing behavior in the forced swim test. **Physiology and Behavior**, vol. 118, p. 227–239, 3 Jun. 2013. <https://doi.org/10.1016/j.physbeh.2013.05.012>.
- BUSH, V. L.; MIDDLEMISS, D. N.; MARSDEN, C. A.; FONE, K. C. F. Implantation of a slow release corticosterone pellet induces long-term alterations in serotonergic neurochemistry in the rat brain. **Journal of Neuroendocrinology**, vol. 15, no. 6, 2003. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2826.2003.01034.x>.
- CALABRESE, F.; GUIDOTTI, G.; MOLTENI, R.; RACAGNI, G.; MANCINI, M.; RIVA, M. A. Stress-induced changes of hippocampal NMDA receptors: Modulation by duloxetine treatment. **PLoS ONE**, vol. 7, no. 5, 2012. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0037916>.
- CAMARGO, A.; DALMAGRO, A. P.; DE SOUZA, M. M.; ZENI, A. L. B.; RODRIGUES, A. L. S. Ketamine, but not guanosine, as a prophylactic agent against corticosterone-induced

- depressive-like behavior: Possible role of long-lasting pro-synaptogenic signaling pathway. **Experimental Neurology**, vol. 334, 2020. <https://doi.org/10.1016/j.expneurol.2020.113459>.
- CAMARGO, A.; DALMAGRO, A. P.; M. ROSA, J.; ANA, A. L.; P. KASTER, M.; TASCA, C. I.; ANA, A. L. Subthreshold doses of guanosine plus ketamine elicit antidepressant-like effect in a mouse model of depression induced by corticosterone: Role of GR/NF- $\kappa$ B/IDO-1 signaling. **Neurochemistry International**, vol. 139, 2020. <https://doi.org/10.1016/j.neuint.2020.104797>.
- CAMARGO, A.; DALMAGRO, A. P.; WOLIN, I. A. V.; SITENESKI, A.; ZENI, A. L. B.; RODRIGUES, A. L. S. A low-dose combination of ketamine and guanosine counteracts corticosterone-induced depressive-like behavior and hippocampal synaptic impairments via mTORC1 signaling. **Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry**, vol. 111, 2021. <https://doi.org/10.1016/j.pnpbp.2021.110371>.
- CANDELARIO-JALIL, E.; YANG, Y.; ROSENBERG, G. A. Diverse roles of matrix metalloproteinases and tissue inhibitors of metalloproteinases in neuroinflammation and cerebral ischemia. **Neuroscience**, vol. 158, no. 3, 2009. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2008.06.025>.
- CARTER, R. N.; PATERSON, J. M.; TWOROWSKA, U.; STENVERS, D. J.; MULLINS, J. J.; SECKL, J. R.; HOLMES, M. C. Hypothalamic-pituitary-adrenal axis abnormalities in response to deletion of 11 $\beta$ -HSD1 is strain-dependent. **Journal of Neuroendocrinology**, vol. 21, no. 11, 2009. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2826.2009.01899.x>.
- CERNACKOVA, A.; DURACKOVA, Z.; TREBATICKA, J.; MRAVEC, B. Neuroinflammation and depressive disorder: The role of the hypothalamus. **Journal of Clinical Neuroscience**, vol. 75, 2020. <https://doi.org/10.1016/j.jocn.2020.03.005>.
- CHANG, J. J.; STANFILL, A.; POURMOTABBED, T. The role of matrix metalloproteinase polymorphisms in ischemic stroke. **International Journal of Molecular Sciences**, vol. 17, no. 8, 2016. <https://doi.org/10.3390/ijms17081323>.
- CHAVES, R. de C.; MALLMANN, A. S. V.; OLIVEIRA, N. F.; OLIVEIRA, I. C. M.; CAPIBARIBE, V. C. C.; DA SILVA, D. M. A.; LOPES, I. S.; VALENTIM, J. T.; DE CARVALHO, A. M. R.; MACÊDO, D. S.; VASCONCELOS, S. M. M.; GUTIERREZ, S. J. C.; BARBOSA FILHO, J. M.; DE SOUSA, F. C. F. Reversal effect of Riparin IV in depression and anxiety caused by corticosterone chronic administration in mice. **Pharmacology Biochemistry and Behavior**, vol. 180, 2019. <https://doi.org/10.1016/j.pbb.2019.03.005>.
- CHENG, D.; HOOGENRAAD, C. C.; RUSH, J.; RAMM, E.; SCHLAGER, M. A.; DUONG, D. M.; XU, P.; WIJAYAWARDANA, S. R.; HANFELT, J.; NAKAGAWA, T.; SHENG, M.;

- PENG, J. Relative and absolute quantification of postsynaptic density proteome isolated from rat forebrain and cerebellum. **Molecular and Cellular Proteomics**, vol. 5, no. 6, 2006. <https://doi.org/10.1074/mcp.D500009-MCP200>.
- CHIBA, S.; NUMAKAWA, T.; NINOMIYA, M.; RICHARDS, M. C.; WAKABAYASHI, C.; KUNUGI, H. Chronic restraint stress causes anxiety- and depression-like behaviors, downregulates glucocorticoid receptor expression, and attenuates glutamate release induced by brain-derived neurotrophic factor in the prefrontal cortex. **Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry**, vol. 39, no. 1, 2012. <https://doi.org/10.1016/j.pnpbp.2012.05.018>.
- COBURN-LITVAK, P. S.; POTHAKOS, K.; TATA, D. A.; MCCLOSKEY, D. P.; ANDERSON, B. J. Chronic administration of corticosterone impairs spatial reference memory before spatial working memory in rats. **Neurobiology of Learning and Memory**, vol. 80, no. 1, 2003. [https://doi.org/10.1016/S1074-7427\(03\)00019-4](https://doi.org/10.1016/S1074-7427(03)00019-4).
- COLEY, A. A.; GAO, W. J. PSD95: A synaptic protein implicated in schizophrenia or autism? **Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry**, vol. 82, 2018. <https://doi.org/10.1016/j.pnpbp.2017.11.016>.
- COLLINGRIDGE, G. L.; ABRAHAM, W. C. Glutamate receptors and synaptic plasticity: The impact of Evans and Watkins. **Neuropharmacology**, vol. 206, 2022. <https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2021.108922>.
- COSTA, B. M.; KWAPISZ, L. C.; MEHRKENS, B.; BLEDSOE, D. N.; VACCA, B. N.; JOHNSTON, T. v.; RAZZAQ, R.; MANICKAM, D.; KLEIN, B. G. A glutamate concentration-biased allosteric modulator potentiates NMDA-induced ion influx in neurons. **Pharmacology Research and Perspectives**, vol. 9, no. 5, 2021. <https://doi.org/10.1002/prp2.859>.
- CRYAN, J. F.; VALENTINO, R. J.; LUCKI, I. Assessing substrates underlying the behavioral effects of antidepressants using the modified rat forced swimming test. **Neuroscience and Biobehavioral Reviews**, vol. 29, no. 4–5, 2005. <https://doi.org/10.1016/j.neubiorev.2005.03.008>.
- CUI, X. Y.; YANG, G.; CUI, S. Y.; CAO, Q.; HUANG, Y. L.; DING, H.; YE, H.; ZHANG, X. Q.; WANG, Z. J.; ZHANG, Y. H. Sleep patterns deteriorate over time in chronic corticosterone-treated rats. **Neuroscience Letters**, vol. 682, no. May 2016, p. 74–78, 2018. <https://doi.org/10.1016/j.neulet.2018.06.017>.

- CUTHBERT, B. N. The NIMH Research Domain Criteria Project. **Genomics, Circuits, and Pathways in Clinical Neuropsychiatry**. [*S. l.: s. n.*], 2016. <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-800105-9.00026-3>.
- DACHIR, S.; KADAR, T.; ROBINZON, B.; LEVY, A. Cognitive deficits induced in young rats by long-term corticosterone administration. **Behavioral and Neural Biology**, vol. 60, no. 2, 1993. [https://doi.org/10.1016/0163-1047\(93\)90173-F](https://doi.org/10.1016/0163-1047(93)90173-F).
- DAVID, D. J.; SAMUELS, B. A.; RAINER, Q.; WANG, J. W.; MARSTELLER, D.; MENDEZ, I.; DREW, M.; CRAIG, D. A.; GUIARD, B. P.; GUILLOUX, J. P.; ARTYMYSHYN, R. P.; GARDIER, A. M.; GERALD, C.; ANTONIJEVIC, I. A.; LEONARDO, E. D.; HEN, R. Neurogenesis-Dependent and -Independent Effects of Fluoxetine in an Animal Model of Anxiety/Depression. **Neuron**, vol. 62, no. 4, 2009. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2009.04.017>.
- DE KLOET, E. R.; MOLENDIJK, M. L. Coping with the Forced Swim Stressor: Towards Understanding an Adaptive Mechanism. **Neural Plasticity**, vol. 2016, 2016. <https://doi.org/10.1155/2016/6503162>.
- DE SOUSA, C. N. S.; MEDEIROS, I. da S.; VASCONCELOS, G. S.; DE AQUINO, G. A.; CYSNE FILHO, F. M. S.; DE ALMEIDA CYSNE, J. C.; MACÊDO, D. S.; VASCONCELOS, S. M. M. Involvement of oxidative pathways and BDNF in the antidepressant effect of carvedilol in a depression model induced by chronic unpredictable stress. **Psychopharmacology**, vol. 239, no. 1, 2022. <https://doi.org/10.1007/s00213-021-05994-6>.
- DEAN, J.; KESHAVAN, M. The neurobiology of depression: An integrated view. **Asian Journal of Psychiatry**, vol. 27, 2017. <https://doi.org/10.1016/j.ajp.2017.01.025>.
- DIERING, G. H.; HUGANIR, R. L. The AMPA Receptor Code of Synaptic Plasticity. **Neuron**, vol. 100, no. 2, 2018. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2018.10.018>.
- DING, H.; CUI, X. Y.; CUI, S. Y.; YE, H.; HU, X.; ZHAO, H. L.; LIU, Y. T.; ZHANG, Y. H. Depression-like behaviors induced by chronic corticosterone exposure via drinking water: Time-course analysis. **Neuroscience Letters**, vol. 687, 2018. <https://doi.org/10.1016/j.neulet.2018.09.059>.
- DIONYSOPOULOU, S.; CHARMANDARI, E.; BARGIOTA, A.; VLACHOS, N.; MASTORAKOS, G.; VALSAMAKIS, G. The role of hypothalamic inflammation in diet-induced obesity and its association with cognitive and mood disorders. **Nutrients**, vol. 13, no. 2, 2021. <https://doi.org/10.3390/nu13020498>.
- DOBLER, V. B.; NEUFELD, S. A. S.; FLETCHER, P. F.; PEREZ, J.; SUBRAMANIAM, N.; TEUFEL, C.; GOODYER, I. M. Disaggregating physiological components of cortisol output:

- A novel approach to cortisol analysis in a clinical sample – A proof-of-principle study. **Neurobiology of Stress**, vol. 10, 2019. <https://doi.org/10.1016/j.ynstr.2019.100153>.
- DUMA, D.; JEWELL, C. M.; CIDLOWSKI, J. A. Multiple glucocorticoid receptor isoforms and mechanisms of post-translational modification. **Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology**, vol. 102, no. 1-5 SPEC. ISS., 2006. <https://doi.org/10.1016/j.jsbmb.2006.09.009>.
- EL-HUSSEINI, A. E.-D.; SCHNELL, E.; CHETKOVICH, D. M.; NICOLL, R. A.; BREDT, D. S. PSD-95 Involvement in Maturation of Excitatory Synapses. **Science**, vol. 290, no. 5495, 2000. <https://doi.org/10.1126/science.290.5495.1364>.
- ELHUSSINY, M. E. A.; CARINI, G.; MINGARDI, J.; TORNESE, P.; SALA, N.; BONO, F.; FIORENTINI, C.; LA VIA, L.; POPOLI, M.; MUSAZZI, L.; BARBON, A. Modulation by chronic stress and ketamine of ionotropic AMPA/NMDA and metabotropic glutamate receptors in the rat hippocampus. **Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry**, vol. 104, 2021. <https://doi.org/10.1016/j.pnpbp.2020.110033>.
- FINSTERWALD, C.; ALBERINI, C. M. Stress and glucocorticoid receptor-dependent mechanisms in long-term memory: From adaptive responses to psychopathologies. **Neurobiology of Learning and Memory**, vol. 112, 2014. <https://doi.org/10.1016/j.nlm.2013.09.017>.
- FU, C. H. Y.; FAN, Y.; DAVATZIKOS, C. Widespread Morphometric Abnormalities in Major Depression: Neuroplasticity and Potential for Biomarker Development. **Neuroimaging Clinics of North America**, vol. 30, no. 1, 2020. <https://doi.org/10.1016/j.nic.2019.09.008>.
- GARCÍA-CÁCERES, C.; LAGUNAS, N.; CALMARZA-FONT, I.; AZCOITIA, I.; DIZ-CHAVES, Y.; GARCÍA-SEGURA, L. M.; BAQUEDANO, E.; FRAGO, L. M.; ARGENTE, J.; CHOWEN, J. A. Gender differences in the long-term effects of chronic prenatal stress on the HPA axis and hypothalamic structure in rats. **Psychoneuroendocrinology**, vol. 35, no. 10, 2010. <https://doi.org/10.1016/j.psyneuen.2010.05.006>.
- GERHARD, D. M.; WOHLEB, E. S.; DUMAN, R. S. Emerging treatment mechanisms for depression: Focus on glutamate and synaptic plasticity. **Drug Discovery Today**, vol. 21, no. 3, 2016. <https://doi.org/10.1016/j.drudis.2016.01.016>.
- GJERSTAD, J. K.; LIGHTMAN, S. L.; SPIGA, F. Role of glucocorticoid negative feedback in the regulation of HPA axis pulsatility. **Stress**, vol. 21, no. 5, 2018. <https://doi.org/10.1080/10253890.2018.1470238>.
- GLOBAL, REGIONAL, AND NATIONAL BURDEN OF 12 MENTAL DISORDERS IN 204 COUNTRIES AND TERRITORIES, 1990–2019: A SYSTEMATIC ANALYSIS FOR THE

- GLOBAL BURDEN OF DISEASE STUDY 2019. **The Lancet Psychiatry**, vol. 9, no. 2, 2022. [https://doi.org/10.1016/S2215-0366\(21\)00395-3](https://doi.org/10.1016/S2215-0366(21)00395-3).
- GOLD, P. W. The organization of the stress system and its dysregulation in depressive illness. **Molecular Psychiatry**, vol. 20, no. 1, p. 32–47, 2015a. DOI 10.1038/mp.2014.163. Available at: <http://dx.doi.org/10.1038/mp.2014.163>.
- GOLD, P. W. The organization of the stress system and its dysregulation in depressive illness. **Molecular Psychiatry**, vol. 20, no. 1, p. 32–47, 5 Feb. 2015b. <https://doi.org/10.1038/mp.2014.163>.
- GOSHEN, I.; YIRMIYA, R. Interleukin-1 (IL-1): A central regulator of stress responses. **Frontiers in Neuroendocrinology**, vol. 30, no. 1, 2009. <https://doi.org/10.1016/j.yfrne.2008.10.001>.
- GREEN, M. K.; RANI, C. S. S.; JOSHI, A.; SOTO-PIÑA, A. E.; MARTINEZ, P. A.; FRAZER, A.; STRONG, R.; MORILAK, D. A. Prenatal stress induces long term stress vulnerability, compromising stress response systems in the brain and impairing extinction of conditioned fear after adult stress. **Neuroscience**, vol. 192, 2011. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2011.06.041>.
- GREGUS, A.; WINTINK, A. J.; DAVIS, A. C.; KALYNCHUK, L. E. Effect of repeated corticosterone injections and restraint stress on anxiety and depression-like behavior in male rats. **Behavioural Brain Research**, vol. 156, no. 1, p. 105–114, 2005a. <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2004.05.013>.
- GREGUS, A.; WINTINK, A. J.; DAVIS, A. C.; KALYNCHUK, L. E. Effect of repeated corticosterone injections and restraint stress on anxiety and depression-like behavior in male rats. **Behavioural Brain Research**, vol. 156, no. 1, p. 105–114, 6 Jan. 2005b. <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2004.05.013>.
- GURURAJAN, A.; REIF, A.; CRYAN, J. F.; SLATTERY, D. A. The future of rodent models in depression research. **Nature Reviews Neuroscience**, vol. 20, no. 11, 2019. <https://doi.org/10.1038/s41583-019-0221-6>.
- HARRIS, A. P.; HOLMES, M. C.; DE KLOET, E. R.; CHAPMAN, K. E.; SECKL, J. R. Mineralocorticoid and glucocorticoid receptor balance in control of HPA axis and behaviour. **Psychoneuroendocrinology**, vol. 38, no. 5, 2013. <https://doi.org/10.1016/j.psyneuen.2012.08.007>.
- HERMAN, J. P.; CULLINAN, W. E. Neurocircuitry of stress: Central control of the hypothalamo-pituitary-adrenocortical axis. **Trends in Neurosciences**, vol. 20, no. 2, 1997. [https://doi.org/10.1016/S0166-2236\(96\)10069-2](https://doi.org/10.1016/S0166-2236(96)10069-2).

- HO, R. C. M.; ZHANG, M. W. Ketamine as a rapid antidepressant: the debate and implications. **BJPsych Advances**, vol. 22, no. 4, 2016. <https://doi.org/10.1192/apt.bp.114.014274>.
- HUGHES, R. N. The value of spontaneous alternation behavior (SAB) as a test of retention in pharmacological investigations of memory. **Neuroscience and Biobehavioral Reviews**, vol. 28, no. 5, 2004. <https://doi.org/10.1016/j.neubiorev.2004.06.006>.
- JOHNSON, S. A.; FOURNIER, N. M.; KALYNCHUK, L. E. Effect of different doses of corticosterone on depression-like behavior and HPA axis responses to a novel stressor. **Behavioural Brain Research**, vol. 168, no. 2, 2006. <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2005.11.019>.
- JURUENA, M. F. Early-life stress and HPA axis trigger recurrent adulthood depression. **Epilepsy and Behavior**, vol. 38, 2014. <https://doi.org/10.1016/j.yebeh.2013.10.020>.
- KADRIU, B.; MUSAZZI, L.; HENTER, I. D.; GRAVES, M.; POPOLI, M.; ZARATE, C. A. Glutamatergic Neurotransmission: Pathway to Developing Novel Rapid-Acting Antidepressant Treatments. **International Journal of Neuropsychopharmacology**, vol. 22, no. 2, 2019. <https://doi.org/10.1093/ijnp/pyy094>.
- KAISER, R. H.; ANDREWS-HANNA, J. R.; WAGER, T. D.; PIZZAGALLI, D. A. Large-scale network dysfunction in major depressive disorder: A meta-analysis of resting-state functional connectivity. **JAMA Psychiatry**, 2015. <https://doi.org/10.1001/jamapsychiatry.2015.0071>.
- KARACA, Z.; GROSSMAN, A.; KELESTIMUR, F. Investigation of the Hypothalamo-pituitary-adrenal (HPA) axis: a contemporary synthesis. **Reviews in Endocrine and Metabolic Disorders**, vol. 22, no. 2, 2021. <https://doi.org/10.1007/s11154-020-09611-3>.
- KARST, H.; JOËLS, M. Corticosterone slowly enhances miniature excitatory postsynaptic current amplitude in mice CA1 hippocampal cells. **Journal of Neurophysiology**, vol. 94, no. 5, 2005. <https://doi.org/10.1152/jn.00143.2005>.
- KELLER-WOOD, M. Hypothalamic-pituitary-adrenal axis-feedback control. **Comprehensive Physiology**, vol. 5, no. 3, 2015. <https://doi.org/10.1002/cphy.c140065>.
- KESSELS, H. W.; MALINOW, R. Synaptic AMPA Receptor Plasticity and Behavior. **Neuron**, vol. 61, no. 3, 2009. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2009.01.015>.
- KHAN, A. M.; KAMINSKI, K. L.; SANCHEZ-WATTS, G.; PONZIO, T. A.; BRENT KUZMISKI, J.; BAINS, J. S.; WATTS, A. G. MAP kinases couple hindbrain-derived catecholamine signals to hypothalamic adrenocortical control mechanisms during glycemia-related challenges. **Journal of Neuroscience**, vol. 31, no. 50, 2011. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.4785-11.2011>.

- KLUG, M.; HILL, R. A.; CHOY, K. H. C.; KYRIOS, M.; HANNAN, A. J.; VAN DEN BUUSE, M. Long-term behavioral and NMDA receptor effects of young-adult corticosterone treatment in BDNF heterozygous mice. **Neurobiology of Disease**, vol. 46, no. 3, 2012. <https://doi.org/10.1016/j.nbd.2012.03.015>.
- KÖHLER, C.; CARLSTRÖM, G.; GUNNARSSON, A.; WEININGER, U.; TÅNGEFJORD, S.; ULLAH, V.; LEPISTÖ, M.; KARLSSON, U.; PAPA VOINE, T.; EDMAN, K.; AKKE, M. Dynamic allosteric communication pathway directing differential activation of the glucocorticoid receptor. **Science Advances**, vol. 6, no. 29, 2020. <https://doi.org/10.1126/sciadv.abb5277>.
- KÖHR, G.; JENSEN, V.; KOESTER, H. J.; MIHALJEVIC, A. L. A.; UTVIK, J. K.; KVELLO, A.; OTTERSEN, O. P.; SEEBURG, P. H.; SPRENGEL, R.; HVALBY, Ø. Intracellular Domains of NMDA Receptor Subtypes Are Determinants for Long-Term Potentiation Induction. **Journal of Neuroscience**, vol. 23, no. 34, 2003. <https://doi.org/10.1523/jneurosci.23-34-10791.2003>.
- KRISHNAN, V.; NESTLER, E. J. The molecular neurobiology of depression. **Nature**, 2008. <https://doi.org/10.1038/nature07455>.
- KUCHARCZYK, M.; KUREK, A.; DETKA, J.; SLUSARCZYK, J.; PAPP, M.; TOTA, K.; BASTA-KAIM, A.; KUBERA, M.; LASON, W.; BUDZISZEWSKA, B. Chronic mild stress influences nerve growth factor through a matrix metalloproteinase-dependent mechanism. **Psychoneuroendocrinology**, vol. 66, 2016. <https://doi.org/10.1016/j.psyneuen.2015.12.019>.
- KUZMISKI, J. B.; MARTY, V.; BAIMOUKHAMETOVA, D. v.; BAINS, J. S. Stress-induced priming of glutamate synapses unmasks associative short-term plasticity. **Nature Neuroscience**, vol. 13, no. 10, 2010. <https://doi.org/10.1038/nn.2629>.
- LARONHA, H.; CALDEIRA, J. Structure and Function of Human Matrix Metalloproteinases. **Cells**, vol. 9, no. 5, 2020. <https://doi.org/10.3390/cells9051076>.
- LEBEDEVA, K. A.; ALLEN, J.; KULHAWY, E. Y.; CARUNCHO, H. J.; KALYNCHUK, L. E. Cyclical administration of corticosterone results in aggravation of depression-like behaviors and accompanying downregulations in reelin in an animal model of chronic stress relevant to human recurrent depression. **Physiology and Behavior**, vol. 224, 2020. <https://doi.org/10.1016/j.physbeh.2020.113070>.
- LEBEDEVA, K. A.; CARUNCHO, H. J.; KALYNCHUK, L. E. Cyclical corticosterone administration sensitizes depression-like behavior in rats. **Neuroscience Letters**, vol. 650, p. 45–51, 22 May 2017a. <https://doi.org/10.1016/j.neulet.2017.04.023>.

- LEBEDEVA, K. A.; CARUNCHO, H. J.; KALYNCHUK, L. E. Cyclical corticosterone administration sensitizes depression-like behavior in rats. **Neuroscience Letters**, vol. 650, p. 45–51, 22 May 2017b. <https://doi.org/10.1016/j.neulet.2017.04.023>.
- LEDONNE, A.; MERCURI, N. B. On the modulatory roles of neuregulins/ErbB signaling on synaptic plasticity. **International Journal of Molecular Sciences**, vol. 21, no. 1, 2020. <https://doi.org/10.3390/ijms21010275>.
- LI, H.; SHENG, Z.; KHAN, S.; ZHANG, R.; LIU, Y.; ZHANG, Y.; YONG, V. W.; XUE, M. Matrix Metalloproteinase-9 as an Important Contributor to the Pathophysiology of Depression. **Frontiers in Neurology**, vol. 13, 2022. <https://doi.org/10.3389/fneur.2022.861843>.
- LI, J.; XIE, X.; LI, Y.; LIU, X.; LIAO, X.; SU, Y. A.; SI, T. Differential behavioral and neurobiological effects of chronic corticosterone treatment in adolescent and adult rats. **Frontiers in Molecular Neuroscience**, vol. 10, 2017. <https://doi.org/10.3389/fnmol.2017.00025>.
- LIMA-OJEDA, J. M.; RUPPRECHT, R.; BAGHAI, T. C. Neurobiology of depression: A neurodevelopmental approach. **World Journal of Biological Psychiatry**, vol. 19, no. 5, 2018. <https://doi.org/10.1080/15622975.2017.1289240>.
- LISMAN, J. Glutamatergic synapses are structurally and biochemically complex because of multiple plasticity processes: Long-term potentiation, long-term depression, short-term potentiation and scaling. **Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences**, vol. 372, no. 1715, 2017. <https://doi.org/10.1098/rstb.2016.0260>.
- LIU, L.; DONG, Y.; SHAN, X.; LI, L.; XIA, B.; WANG, H. Anti-depressive effectiveness of baicalin in vitro and in vivo. **Molecules**, vol. 24, no. 2, 2019. <https://doi.org/10.3390/molecules24020326>.
- LIU, W.; GE, T.; LENG, Y.; PAN, Z.; FAN, J.; YANG, W.; CUI, R. The Role of Neural Plasticity in Depression: From Hippocampus to Prefrontal Cortex. **Neural Plasticity**, vol. 2017, 2017. <https://doi.org/10.1155/2017/6871089>.
- LIU, X. L.; LUO, L.; MU, R. H.; LIU, B. bin; GENG, D.; LIU, Q.; YI, L. T. Fluoxetine regulates mTOR signalling in a region-dependent manner in depression-like mice. **Scientific Reports**, vol. 5, 2015. <https://doi.org/10.1038/srep16024>.
- LU, N. Z.; CIDLOWSKI, J. A. Glucocorticoid receptor isoforms generate transcription specificity. **Trends in Cell Biology**, vol. 16, no. 6, 2006. <https://doi.org/10.1016/j.tcb.2006.04.005>.

- MA, X.; ZHU, Z.; GUO, S.; DUAN, J. The effect of deoxyschizandrin on chronic unpredictable mild stress-induced depression. **Biotechnology and Applied Biochemistry**, vol. 68, no. 1, 2021. <https://doi.org/10.1002/bab.1893>.
- MACDONALD, J. F.; JACKSON, M. F.; BEAZELY, M. A. Hippocampal long-term synaptic plasticity and signal amplification of NMDA receptors. **Critical Reviews in Neurobiology**, vol. 18, no. 1–2, 2006. <https://doi.org/10.1615/CritRevNeurobiol.v18.i1-2.80>.
- MAGI, S.; PICCIRILLO, S.; AMOROSO, S.; LARICCIA, V. Excitatory amino acid transporters (Eaats): Glutamate transport and beyond. **International Journal of Molecular Sciences**, vol. 20, no. 22, 2019. <https://doi.org/10.3390/ijms20225674>.
- MALENKA, R. C.; BEAR, M. F. LTP and LTD: An embarrassment of riches. **Neuron**, vol. 44, no. 1, 2004. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2004.09.012>.
- MALLON, A. P.; AUBERSON, Y. P.; STONE, T. W. Selective subunit antagonists suggest an inhibitory relationship between NR2B and NR2A-subunit containing N-methyl-D-aspartate receptors in hippocampal slices. **Experimental Brain Research**, vol. 162, no. 3, 2005. <https://doi.org/10.1007/s00221-004-2193-6>.
- MARAMIS, M. M.; MAHAJUDIN, M. S.; KHOTIB, J. Impaired Cognitive Flexibility and Working Memory Precedes Depression: A Rat Model to Study Depression. **Neuropsychobiology**, vol. 80, no. 3, 2021. <https://doi.org/10.1159/000508682>.
- MARCATILI, M.; SALA, C.; DAKANALIS, A.; COLMEGNA, F.; D'AGOSTINO, A.; GAMBINI, O.; DELL'OSSO, B.; BENATTI, B.; CONTI, L.; CLERICI, M. Human induced pluripotent stem cells technology in treatment resistant depression: novel strategies and opportunities to unravel ketamine's fast-acting antidepressant mechanisms. **Therapeutic Advances in Psychopharmacology**, vol. 10, 2020. <https://doi.org/10.1177/2045125320968331>.
- MARKS, W.; FOURNIER, N. M.; KALYNCHUK, L. E. Repeated exposure to corticosterone increases depression-like behavior in two different versions of the forced swim test without altering nonspecific locomotor activity or muscle strength. **Physiology and Behavior**, vol. 98, no. 1–2, 2009. <https://doi.org/10.1016/j.physbeh.2009.04.014>.
- MARSDEN, W. N. Synaptic plasticity in depression: Molecular, cellular and functional correlates. **Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry**, vol. 43, 2013. <https://doi.org/10.1016/j.pnpbp.2012.12.012>.
- MARTINELLI, S.; ANDERZHANOVA, E. A.; BAJAJ, T.; WIECHMANN, S.; DETHLOFF, F.; WECKMANN, K.; HEINZ, D. E.; EBERT, T.; HARTMANN, J.; GEIGER, T. M.; DÖNGI, M.; HAFNER, K.; PÖHLMANN, M. L.; JOLLANS, L.; PHILIPSEN, A.; SCHMIDT, S. v.;

- SCHMIDT, U.; MACCARRONE, G.; STEIN, V.; ... GASSEN, N. C. Stress-primed secretory autophagy promotes extracellular BDNF maturation by enhancing MMP9 secretion. **Nature Communications**, vol. 12, no. 1, 2021. <https://doi.org/10.1038/s41467-021-24810-5>.
- MARTY, V. N.; MULPURI, Y.; MUNIER, J. J.; SPIGELMAN, I. Chronic alcohol disrupts hypothalamic responses to stress by modifying CRF and NMDA receptor function. **Neuropharmacology**, vol. 167, 2020. <https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2020.107991>.
- MAURICE, T.; HIRAMATSU, M.; ITOH, J.; KAMEYAMA, T.; HASEGAWA, T.; NABESHIMA, T. Behavioral evidence for a modulating role of  $\sigma$  ligands in memory processes. I. Attenuation of dizocilpine (MK-801)-induced amnesia. **Brain Research**, vol. 647, no. 1, 1994. [https://doi.org/10.1016/0006-8993\(94\)91397-8](https://doi.org/10.1016/0006-8993(94)91397-8).
- MCEWEN, B. S.; AKIL, H. Revisiting the stress concept: Implications for affective disorders. **Journal of Neuroscience**, vol. 40, no. 1, 2020. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.0733-19.2019>.
- MORRIS, S. E.; CUTHBERT, B. N. Research domain criteria: Cognitive systems, neural circuits, and dimensions of behavior. **Dialogues in Clinical Neuroscience**, vol. 14, no. 1, 2012. <https://doi.org/10.31887/dens.2012.14.1/smorris>.
- MOURTZI, N.; SERTEDAKI, A.; CHARMANDARI, E. Glucocorticoid signaling and epigenetic alterations in stress-related disorders. **International Journal of Molecular Sciences**, vol. 22, no. 11, 2021. <https://doi.org/10.3390/ijms22115964>.
- MULHOLLAND, P. J.; SELF, R. L.; HENSLEY, A. K.; LITTLE, H. J.; LITTLETON, J. M.; PRENDERGAST, M. A. A 24 h corticosterone exposure exacerbates excitotoxic insult in rat hippocampal slice cultures independently of glucocorticoid receptor activation or protein synthesis. **Brain Research**, vol. 1082, no. 1, 2006. <https://doi.org/10.1016/j.brainres.2006.01.069>.
- MUN-BRYCE, S.; LUKES, A.; WALLACE, J.; LUKES-MARX, M.; ROSENBERG, G. A. Stromelysin-1 and gelatinase A are upregulated before TNF- $\alpha$  in LPS-stimulated neuroinflammation. **Brain Research**, vol. 933, no. 1, 2002. [https://doi.org/10.1016/S0006-8993\(02\)02303-X](https://doi.org/10.1016/S0006-8993(02)02303-X).
- MYUNG, J. K.; DUNAH, A. W.; YU, T. W.; SHENG, M. Differential roles of NR2A- and NR2B-containing NMDA receptors in Ras-ERK signaling and AMPA receptor trafficking. **Neuron**, vol. 46, no. 5, 2005. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2005.04.031>.
- N CUTHBERT, B.; INSEL, T. Cuthbert BN, Insel TR. Toward the future of psychiatric diagnosis: the seven pillars of RDoC. **BMC Med** 11: 126. **BMC medicine**, vol. 11, 2013. .

- NESTLER, E. J.; GOULD, E.; MANJI, H. Preclinical models: Status of basic research in depression. **Biological Psychiatry**, vol. 52, no. 6, 2002. [https://doi.org/10.1016/S0006-3223\(02\)01405-1](https://doi.org/10.1016/S0006-3223(02)01405-1).
- NITHIANANTHARAJAH, J.; LEVIS, H. J.; MURPHY, M. Environmental enrichment results in cortical and subcortical changes in levels of synaptophysin and PSD-95 proteins. **Neurobiology of Learning and Memory**, vol. 81, no. 3, 2004. <https://doi.org/10.1016/j.nlm.2004.02.002>.
- NOTARAS, M.; VAN DEN BUUSE, M. Neurobiology of BDNF in fear memory, sensitivity to stress, and stress-related disorders. **Molecular Psychiatry**, vol. 25, no. 10, 2020. <https://doi.org/10.1038/s41380-019-0639-2>.
- NUMAKAWA, T.; ODAKA, H.; ADACHI, N. Actions of brain-derived neurotrophic factor and glucocorticoid stress in neurogenesis. **International Journal of Molecular Sciences**, vol. 18, no. 11, 2017. <https://doi.org/10.3390/ijms18112312>.
- NUSSLOCK, R.; ALLOY, L. B. Reward processing and mood-related symptoms: An RDoC and translational neuroscience perspective. **Journal of Affective Disorders**, vol. 216, 2017. <https://doi.org/10.1016/j.jad.2017.02.001>.
- OAKLEY, R. H.; WHIRLEDGE, S. D.; PETRILLO, M. G.; RIDDICK, N. v.; XU, X.; MOY, S. S.; CIDLOWSKI, J. A. Combinatorial actions of glucocorticoid and mineralocorticoid stress hormone receptors are required for preventing neurodegeneration of the mouse hippocampus. **Neurobiology of Stress**, vol. 15, 2021. <https://doi.org/10.1016/j.ynstr.2021.100369>.
- PALOMERO-GALLAGHER, N.; AMUNTS, K. A short review on emotion processing: a lateralized network of neuronal networks. **Brain Structure and Function**, vol. 227, no. 2, 2022. <https://doi.org/10.1007/s00429-021-02331-7>.
- PANDIT, A.; BEGUM, Y.; SAHA, P.; SRIVASTAVA, A. K.; SWARNAKAR, S. Approaches Toward Targeting Matrix Metalloproteases for Prognosis and Therapies in Gynecological Cancer: MicroRNAs as a Molecular Driver. **Frontiers in Oncology**, vol. 11, 2022. <https://doi.org/10.3389/fonc.2021.720622>.
- PAOLETTI, P.; NEYTON, J. NMDA receptor subunits: function and pharmacology. **Current Opinion in Pharmacology**, vol. 7, no. 1, 2007. <https://doi.org/10.1016/j.coph.2006.08.011>.
- PAXINOS, G.; FRANKLIN, K. B. J. The mouse brain in stereotaxic coordinates: hard cover edition. **Academic Press**, vol. 2nd Editio, 2001. .
- PENG, X.; LAU, W. K. W.; WANG, C.; NING, L.; ZHANG, R. Impaired left amygdala resting state functional connectivity in subthreshold depression individuals. **Scientific Reports**, vol. 10, no. 1, 2020. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-74166-x>.

- PEREIRA, G. C.; ROVERSI, K.; TREVISAN, G.; BURGER, M. E.; BOCHI, G. v. Glucocorticoid and brain-derived neurotrophic factor relationship: a brief investigation into the model of depression by chronic administration of corticosterone. **Behavioural Pharmacology**, vol. 31, no. 4, 2020. <https://doi.org/10.1097/FBP.0000000000000547>.
- PLANCHEZ, B.; SURGET, A.; BELZUNG, C. Animal models of major depression: drawbacks and challenges. **Journal of Neural Transmission**, vol. 126, no. 11, 2019. <https://doi.org/10.1007/s00702-019-02084-y>.
- POPOLI, M.; YAN, Z.; MCEWEN, B. S.; SANACORA, G. The stressed synapse: The impact of stress and glucocorticoids on glutamate transmission. **Nature Reviews Neuroscience**, vol. 13, no. 1, 2012. <https://doi.org/10.1038/nrn3138>.
- PORSOLT, R. D.; LE PICHON, M.; JALFRE, M. Depression: A new animal model sensitive to antidepressant treatments [27]. **Nature**, 1977. <https://doi.org/10.1038/266730a0>.
- PRICE, J. L.; DREVETS, W. C. Neurocircuitry of mood disorders. **Neuropsychopharmacology**, vol. 35, no. 1, 2010. <https://doi.org/10.1038/npp.2009.104>.
- RAUBENHEIMER, P. J.; YOUNG, E. A.; ANDREW, R.; SECKL, J. R. The role of corticosterone in human hypothalamic-pituitary-adrenal axis feedback. **Clinical Endocrinology**, vol. 65, no. 1, 2006. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2265.2006.02540.x>.
- REMUS, J. L.; JAMISON, D.; JOHNSON, J. D. 14. An animal model of recurrent depression: Sensitized depression-like behavior when rats are re-exposed to chronic mild stress. **Brain, Behavior, and Immunity**, vol. 32, 2013. <https://doi.org/10.1016/j.bbi.2013.07.026>.
- REPPERMUND, S.; ISING, M.; LUCAE, S.; ZIHL, J. Cognitive impairment in unipolar depression is persistent and non-specific: Further evidence for the final common pathway disorder hypothesis. **Psychological Medicine**, vol. 39, no. 4, 2009. <https://doi.org/10.1017/S003329170800411X>.
- REUL, J. M. H. M. Making memories of stressful events: A journey along epigenetic, gene transcription, and signaling pathways. **Frontiers in Psychiatry**, vol. 5, no. JAN, 2014. <https://doi.org/10.3389/fpsy.2014.00005>.
- ROSENBERG, G. A. Matrix metalloproteinases in neuroinflammation. **GLIA**, vol. 39, no. 3, 2002. <https://doi.org/10.1002/glia.10108>.
- ROSS, R. A.; FOSTER, S. L.; IONESCU, D. F. The Role of Chronic Stress in Anxious Depression. **Chronic Stress**, vol. 1, 2017. <https://doi.org/10.1177/2470547016689472>.
- SALLES, J.; LACASSAGNE, E.; BENVENU, G.; BERTHOUMIEU, S. Ç.; FRANCHITTO, N.; TAUBER, M. The RDoC approach for translational psychiatry: Could a genetic disorder

- with psychiatric symptoms help fill the matrix? the example of Prader–Willi syndrome. **Translational Psychiatry**, vol. 10, no. 1, 2020. <https://doi.org/10.1038/s41398-020-00964-6>.
- SATO, S.; OSANAI, H.; MONMA, T.; HARADA, T.; HIRANO, A.; SAITO, M.; KAWATO, S. Acute effect of corticosterone on N-methyl-d-aspartate receptor-mediated Ca<sup>2+</sup> elevation in mouse hippocampal slices. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, vol. 321, no. 2, 2004. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2004.06.168>.
- SCHINDLER, S.; GEYER, S.; STRAUSS, M.; ANWANDER, A.; HEGERL, U.; TURNER, R.; SCHÖNKNECHT, P. Structural studies of the hypothalamus and its nuclei in mood disorders. **Psychiatry Research - Neuroimaging**, vol. 201, no. 1, 2012. <https://doi.org/10.1016/j.psychresns.2011.06.005>.
- SHI, F.; DUAN, S.; CUI, J.; YAN, X.; LI, H.; WANG, Y.; CHEN, F.; ZHANG, L.; LIU, J.; XIE, X. Induction of Matrix Metalloproteinase-3 (MMP-3) Expression in the Microglia by Lipopolysaccharide (LPS) via Upregulation of Glycoprotein Nonmetastatic Melanoma B (GPNMB) Expression. **Journal of Molecular Neuroscience**, vol. 54, no. 2, 2014. <https://doi.org/10.1007/s12031-014-0280-0>.
- SHINOHARA, Y. Quantification of postsynaptic density proteins: Glutamate receptor subunits and scaffolding proteins. **Hippocampus**, vol. 22, no. 5, 2012. <https://doi.org/10.1002/hipo.20950>.
- SHOJI, H.; MIYAKAWA, T. Age-related behavioral changes from young to old age in male mice of a C57BL/6J strain maintained under a genetic stability program. **Neuropsychopharmacology Reports**, vol. 39, no. 2, 2019. <https://doi.org/10.1002/npr2.12052>.
- SHONESY, B. C.; JALAN-SAKRIKAR, N.; CAVENER, V. S.; COLBRAN, R. J. CaMKII: A molecular substrate for synaptic plasticity and memory. **Progress in Molecular Biology and Translational Science**. [S. l.: s. n.], 2014. vol. 122, . <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-420170-5.00003-9>.
- SONG, Z.; SHEN, F.; ZHANG, Z.; WU, S.; ZHU, G. Calpain inhibition ameliorates depression-like behaviors by reducing inflammation and promoting synaptic protein expression in the hippocampus. **Neuropharmacology**, vol. 174, 2020. <https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2020.108175>.
- SOUSA, N.; CERQUEIRA, J. J.; ALMEIDA, O. F. X. Corticosteroid receptors and neuroplasticity. **Brain Research Reviews**, vol. 57, no. 2, 2008. <https://doi.org/10.1016/j.brainresrev.2007.06.007>.

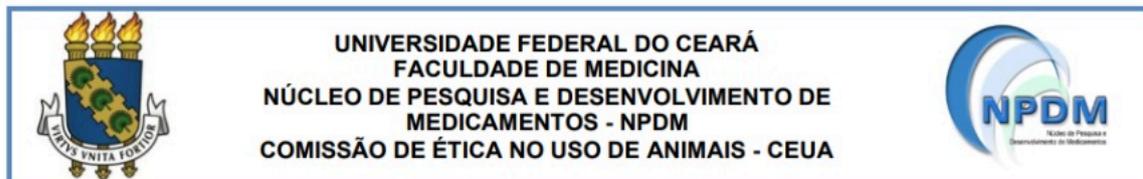
- STANIĆ, D.; PLEĆAŠ-SOLAROVIĆ, B.; MIRKOVIĆ, D.; JOVANOVIĆ, P.; DRONJAK, S.; MARKOVIĆ, B.; ĐORĐEVIĆ, T.; IGNJATOVIĆ, S.; PEŠIĆ, V. Oxytocin in corticosterone-induced chronic stress model: Focus on adrenal gland function. **Psychoneuroendocrinology**, vol. 80, 2017. <https://doi.org/10.1016/j.psyneuen.2017.03.011>.
- STERLEY, T. L.; BAIMOUKHAMETOVA, D.; FÜZESI, T.; ZUREK, A. A.; DAVIU, N.; RASIAH, N. P.; ROSENEGGER, D.; BAINS, J. S. Social transmission and buffering of synaptic changes after stress. **Nature Neuroscience**, vol. 21, no. 3, 2018. <https://doi.org/10.1038/s41593-017-0044-6>.
- STERNER, E. Y.; KALYNCHUK, L. E. Behavioral and neurobiological consequences of prolonged glucocorticoid exposure in rats: Relevance to depression. **Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry**, vol. 34, no. 5, p. 777–790, Jun. 2010. <https://doi.org/10.1016/j.pnpbp.2010.03.005>.
- STERU, L.; CHERMAT, R.; THIERRY, B.; SIMON, P. The tail suspension test: A new method for screening antidepressants in mice. **Psychopharmacology**, vol. 85, no. 3, 1985. <https://doi.org/10.1007/BF00428203>.
- STREKALOVA, T.; LIU, Y.; KISELEV, D.; KHAIRUDDIN, S.; CHIU, J. L. Y.; LAM, J.; CHAN, Y. S.; PAVLOV, D.; PROSHIN, A.; LESCH, K. P.; ANTHONY, D. C.; LIM, L. W. Chronic mild stress paradigm as a rat model of depression: facts, artifacts, and future perspectives. **Psychopharmacology**, vol. 239, no. 3, 2022. <https://doi.org/10.1007/s00213-021-05982-w>.
- SUDHEIMER, K.; KELLER, J.; GOMEZ, R.; TENNAKOON, L.; REISS, A.; GARRETT, A.; KENNA, H.; O'HARA, R.; SCHATZBERG, A. F. Decreased hypothalamic functional connectivity with subgenual cortex in psychotic major depression. **Neuropsychopharmacology**, vol. 40, no. 4, 2015. <https://doi.org/10.1038/npp.2014.259>.
- SÜDHOF, T. C. The cell biology of synapse formation. **Journal of Cell Biology**, vol. 220, no. 7, 2021. <https://doi.org/10.1083/jcb.202103052>.
- SURGET, A.; BELZUNG, C. Adult hippocampal neurogenesis shapes adaptation and improves stress response: a mechanistic and integrative perspective. **Molecular Psychiatry**, vol. 27, no. 1, 2022. <https://doi.org/10.1038/s41380-021-01136-8>.
- TAKAHASHI, T.; KIMOTO, T.; TANABE, N.; HATTORI, T. aki; YASUMATSU, N.; KAWATO, S. Corticosterone acutely prolonged N-methyl-D-aspartate receptor-mediated Ca<sup>2+</sup> elevation in cultured rat hippocampal neurons. **Journal of Neurochemistry**, vol. 83, no. 6, 2002. <https://doi.org/10.1046/j.1471-4159.2002.01251.x>.

- TER HEEGDE, F.; DE RIJK, R. H.; VINKERS, C. H. The brain mineralocorticoid receptor and stress resilience. **Psychoneuroendocrinology**, vol. 52, no. 1, 2015. <https://doi.org/10.1016/j.psyneuen.2014.10.022>.
- TESEN, H.; WATANABE, K.; OKAMOTO, N.; IKENOUCI, A.; IGATA, R.; KONISHI, Y.; KAKEDA, S.; YOSHIMURA, R. Volume of Amygdala Subregions and Clinical Manifestations in Patients With First-Episode, Drug-Naïve Major Depression. **Frontiers in Human Neuroscience**, vol. 15, 2022. <https://doi.org/10.3389/fnhum.2021.780884>.
- TODA, T.; PARYLAK, S. L.; LINKER, S. B.; GAGE, F. H. The role of adult hippocampal neurogenesis in brain health and disease. **Molecular Psychiatry**, vol. 24, no. 1, 2019. <https://doi.org/10.1038/s41380-018-0036-2>.
- TRECCANI, G.; MUSAZZI, L.; PEREGO, C.; MILANESE, M.; NAVA, N.; BONIFACINO, T.; LAMANNA, J.; MALGAROLI, A.; DRAGO, F.; RACAGNI, G.; NYENGAARD, J. R.; WEGENER, G.; BONANNO, G.; POPOLI, M. Stress and corticosterone increase the readily releasable pool of glutamate vesicles in synaptic terminals of prefrontal and frontal cortex. **Molecular Psychiatry**, vol. 19, no. 4, 2014. <https://doi.org/10.1038/mp.2014.5>.
- TSE, Y. C.; BAGOTU, R. C.; WONG, T. P. Dynamic regulation of NMDAR function in the adult brain by the stress hormone corticosterone. **Frontiers in Cellular Neuroscience**, no. MARCH, 2012. <https://doi.org/10.3389/fncel.2012.00009>.
- VERSLEGGERS, M.; LEMMENS, K.; VAN HOVE, I.; MOONS, L. Matrix metalloproteinase-2 and -9 as promising benefactors in development, plasticity and repair of the nervous system. **Progress in Neurobiology**, vol. 105, 2013. <https://doi.org/10.1016/j.pneurobio.2013.03.004>.
- VINKERS, C. H.; JOËLS, M.; MILANESCHI, Y.; GERRITSEN, L.; KAHN, R. S.; PENNINX, B. W. J. H.; BOKS, M. P. M. Mineralocorticoid receptor haplotypes sex-dependently moderate depression susceptibility following childhood maltreatment. **Psychoneuroendocrinology**, vol. 54, 2015. <https://doi.org/10.1016/j.psyneuen.2015.01.018>.
- VOS, T.; ABAJOBIR, A. A.; ABBAFATI, C.; ABBAS, K. M.; ABATE, K. H.; ABD-ALLAH, F.; ABDULLE, A. M.; ABEBO, T. A.; ABERA, S. F.; ABOYANS, V.; ABU-RADDAD, L. J.; ACKERMAN, I. N.; ADAMU, A. A.; ADETOKUNBOH, O.; AFARIDEH, M.; AFSHIN, A.; AGARWAL, S. K.; AGGARWAL, R.; AGRAWAL, A.; ... MURRAY, C. J. L. Global, regional, and national incidence, prevalence, and years lived with disability for 328 diseases and injuries for 195 countries, 1990-2016: A systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2016. **The Lancet**, 2017. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(17\)32154-2](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(17)32154-2).

- WANG, H. Q.; WANG, Z. Z.; CHEN, N. H. The receptor hypothesis and the pathogenesis of depression: Genetic bases and biological correlates. **Pharmacological Research**, vol. 167, 2021. <https://doi.org/10.1016/j.phrs.2021.105542>.
- WANG, Q.; YU, K.; WANG, J.; LIN, H.; WU, Y.; WANG, W. Predator stress-induced persistent emotional arousal is associated with alterations of plasma corticosterone and hippocampal steroid receptors in rat. **Behavioural Brain Research**, vol. 230, no. 1, 2012. <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2012.01.051>.
- WANG, Y.; MA, Y.; HU, J.; CHENG, W.; JIANG, H.; ZHANG, X.; LI, M.; REN, J.; LI, X. Prenatal chronic mild stress induces depression-like behavior and sex-specific changes in regional glutamate receptor expression patterns in adult rats. **Neuroscience**, vol. 301, 2015. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2015.06.008>.
- WEILAND, N. G.; ORCHINIK, M.; TANAPAT, P. Chronic corticosterone treatment induces parallel changes in N-methyl-D-aspartate receptor subunit messenger RNA levels and antagonist binding sites in the hippocampus. **Neuroscience**, vol. 78, no. 3, 1997. [https://doi.org/10.1016/S0306-4522\(96\)00619-7](https://doi.org/10.1016/S0306-4522(96)00619-7).
- WILLNER, P. Chronic mild stress (CMS) revisited: Consistency and behavioural-neurobiological concordance in the effects of CMS. **Neuropsychobiology**, vol. 52, no. 2, 2005. <https://doi.org/10.1159/000087097>.
- WILLNER, P.; SCHEEL-KRÜGER, J.; BELZUNG, C. The neurobiology of depression and antidepressant action. **Neuroscience and Biobehavioral Reviews**, 2013. <https://doi.org/10.1016/j.neubiorev.2012.12.007>.
- WITHALL, A.; HARRIS, L. M.; CUMMING, S. R. A longitudinal study of cognitive function in melancholic and non-melancholic subtypes of Major Depressive Disorder. **Journal of Affective Disorders**, vol. 123, no. 1–3, 2010. <https://doi.org/10.1016/j.jad.2009.07.012>.
- WOODY, M. L.; GIBB, B. E. Integrating NIMH Research Domain Criteria (RDoC) into depression research. **Current Opinion in Psychology**, vol. 4, 2015. <https://doi.org/10.1016/j.copsyc.2015.01.004>.
- XIE, X.; SHEN, Q.; MA, L.; CHEN, Y.; ZHAO, B.; FU, Z. Chronic corticosterone-induced depression mediates premature aging in rats. **Journal of Affective Disorders**, vol. 229, p. 254–261, 2018. <https://doi.org/10.1016/j.jad.2017.12.073>.
- XIE, X.; SHEN, Q.; YU, C.; XIAO, Q.; ZHOU, J.; XIONG, Z.; LI, Z.; FU, Z. Depression-like behaviors are accompanied by disrupted mitochondrial energy metabolism in chronic corticosterone-induced mice. **Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology**, vol. 200, 2020. <https://doi.org/10.1016/j.jsbmb.2020.105607>.

- YAMADA, K.; NODA, Y.; HASEGAWA, T.; KOMORI, Y.; NIKAI, T.; SUGIHARA, H.; NABESHIMA, T. The role of nitric oxide in dizocilpine-induced impairment of spontaneous alternation behavior in mice. **Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, vol. 276, no. 2, 1996. .
- YANG, J.; ZHANG, L.; CAO, L. L.; QI, J.; LI, P.; WANG, X. P.; SUN, X. L. MicroRNA-99a is a potential target for regulating hypothalamic synaptic plasticity in the peri/postmenopausal depression model. **Cells**, vol. 8, no. 9, 2019. <https://doi.org/10.3390/cells8091081>.
- YONG, V. W.; POWER, C.; EDWARDS, D. R. Metalloproteinases in biology and pathology of the nervous system. **Nature Reviews Neuroscience**, vol. 2, no. 7, 2001. <https://doi.org/10.1038/35081571>.
- YUEN, E. Y.; WEI, J.; YAN, Z. Molecular and epigenetic mechanisms for the complex effects of stress on synaptic physiology and cognitive functions. **International Journal of Neuropsychopharmacology**, vol. 20, no. 11, 2017. <https://doi.org/10.1093/ijnp/pyx052>.
- ZHANG, F. F.; PENG, W.; SWEENEY, J. A.; JIA, Z. Y.; GONG, Q. Y. Brain structure alterations in depression: Psychoradiological evidence. **CNS Neuroscience and Therapeutics**, vol. 24, no. 11, p. 994–1003, 1 Nov. 2018. <https://doi.org/10.1111/cns.12835>.
- ZHONG, W. X.; DONG, Z. F.; TIAN, M.; CAO, J.; XU, L.; LUO, J. H. N-methyl-d-aspartate receptor-dependent long-term potentiation in CA1 region affects synaptic expression of glutamate receptor subunits and associated proteins in the whole hippocampus. **Neuroscience**, vol. 141, no. 3, 2006. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2006.04.070>.
- ZHOU, J. J.; GAO, Y.; ZHANG, X.; KOSTEN, T. A.; LI, D. P. Enhanced Hypothalamic NMDA Receptor Activity Contributes to Hyperactivity of HPA Axis in Chronic Stress in Male Rats. **Endocrinology**, vol. 159, no. 3, 2018. <https://doi.org/10.1210/en.2017-03176>.
- ZHUANG, F.; LI, M.; GAO, X.; WANG, Y.; WANG, D.; MA, X.; MA, T.; GU, S. The antidepressant-like effect of alarin is related to TrkB-mTOR signaling and synaptic plasticity. **Behavioural Brain Research**, vol. 313, 2016. <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2016.06.057>.

## APÊNDICE A Aprovação do projeto pela Comissão de Ética no Uso de Animais



UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ  
FACULDADE DE MEDICINA  
NÚCLEO DE PESQUISA E DESENVOLVIMENTO DE  
MEDICAMENTOS - NPDM  
COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS - CEUA

### CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada **"INVESTIGAÇÃO MOLECULAR DO POTENCIAL TERAPEUTICO DO CHÁ HOASCA EM RATOS WINSTAR SUBMETIDOS A UM MODELO DE DEPRESSÃO INDUZIDA POR CORTICOSTERONA."**, registrada com o protocolo **12130320-0**, sob a responsabilidade de **David Freitas de Lucena e Camilla Teixeira Pinheiro Gusmão** que envolve a produção, manutenção ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto humanos), para fins de pesquisa científica (ou ensino) - 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 de Experimentação Animal (CONCEA), foi **APROVADA** pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) do Núcleo de Pesquisa e Desenvolvimento de Medicamentos (NPDM) da Universidade Federal do Ceará, na reunião de 19 / 05 / 2020.

We hereby certify that the project entitled **"ASSESSING THE THERAPEUTIC POTENTIAL OF AYAHUASCA IN WINSTAR RATS EXPOSED TO CHRONIC CORTICOSTERONE-INDUCED DEPRESSION MODEL"**, identified by the protocol number **12130320-0**, and conducted by **David Freitas de Lucena and Camilla Teixeira Pinheiro Gusmão** which involves the production, maintenance or use of animals belonging to the filo Chordata, sub-vertebrate Vertebrata (except humans), for the purpose of scientific research (or teaching) - is in accordance with the provisions of the Law number 11,794, from October 8th, 2008, of Decree number 6,899, from July 15th, 2009, and with the regulations issued by the National Council for the Control of Animal Experimentation (CONCEA), was **APPROVED** by the Ethics Committee on Animal Use (CEUA) from the Center for Research and Development of Medicines (NPDM) of the Federal University of Ceará, in a meeting of 05 / 19 / 2020.

Finalidade	( ) Ensino ( X ) Pesquisa Científica
Vigência da autorização	Início: JULHO/2020 Fim: JULHO/2022
Espécie	Rato heterogênico
Linhagem	wistar
Nº de animais autorizados	48
Peso	180g
Idade	6 semanas
Sexo	Macho
Origem (fornecedor)	Biotério do NPDM
Local do experimento	Biotério do NPDM

Fortaleza, Ceará, 09 de junho de 2020

Coordenação da Comissão de Ética e Uso de Animais  
Núcleo de Pesquisas e Desenvolvimento de Medicamentos  
Universidade Federal do Ceará