



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA  
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM NEUROCIÊNCIAS

Laura Menegatti Bevilacqua

**O envolvimento do sistema adenosinérgico na resposta resiliente ao estresse crônico de  
derrota social em camundongos machos**

Florianópolis

2023

Laura Menegatti Bevilacqua

**O envolvimento do sistema adenosinérgico na resposta resiliente ao estresse crônico de  
derrota social em camundongos machos**

Dissertação submetida ao Programa de Pós-Graduação  
em Neurociências da Universidade Federal de Santa  
Catarina para a obtenção do título de Mestre em  
Neurociências.

Orientadora: Prof<sup>ª</sup> Manuella Pinto Kaster, Dr.<sup>a</sup>

Florianópolis

2023

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor,  
através do Programa de Geração Automática da Biblioteca Universitária da UFSC.

Bevilacqua, Laura Menegatti

O envolvimento do sistema adenosinérgico na resposta resiliente ao estresse crônico de derrota social em camundongos machos / Laura Menegatti Bevilacqua ; orientador, Manuella Pinto Kaster, 2023.

103 p.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Santa Catarina, Centro de Ciências Biológicas, Programa de Pós Graduação em Neurociências, Florianópolis, 2023.

Inclui referências.

1. Neurociências. 2. Adenosina. 3. Transtornos Psiquiátricos. 4. Estresse. 5. Resiliência. I. Kaster, Manuella Pinto. II. Universidade Federal de Santa Catarina. Programa de Pós-Graduação em Neurociências. III. Título.

Laura Menegatti Bevilacqua

**O envolvimento do sistema adenosinérgico na resposta resiliente ao estresse crônico de  
derrota social em camundongos machos**

O presente trabalho em nível de Mestrado foi avaliado e aprovado por banca  
examinadora composta pelos seguintes membros:

Prof<sup>ª</sup>. Ana Lúcia Severo Rodrigues, Dr<sup>ª</sup>.  
Universidade Federal de Santa Catarina

Prof<sup>ª</sup>. Joana Margarida Navalho Gaspar, Dr<sup>ª</sup>.  
Universidade Federal de Santa Catarina

Prof<sup>ª</sup>. Patrícia de Souza Brocardo, Dr<sup>ª</sup>.  
Universidade Federal de Santa Catarina

Certificamos que esta é a **versão original e final** do trabalho de conclusão que foi  
julgado adequado para obtenção do título de Mestre em Neurociências.

---

Prof. Dr. Aderbal Silva Aguiar Junior  
Coordenador do Programa

---

Prof<sup>ª</sup>. Manuella Pinto Kaster, Dr<sup>ª</sup>.  
Orientadora

Florianópolis, 2023.

## AGRADECIMENTOS

À Prof<sup>a</sup>. Manuella por ter me recebido com tanta disponibilidade, carinho e pelo apoio incondicional durante o mestrado. Obrigada por compartilhar de forma tão genuína seu conhecimento e experiência, por ser uma fonte constante de inspiração e por ter permitido com que eu crescesse tanto num período tão curto.

Aos meus colegas do Laboratório de Neurociência Translacional. Isabele, obrigada pelo apoio no início do trabalho. Bruna e Caibe, todos os ensinamentos nos experimentos, conselhos sobre a vida acadêmica e constante apoio jamais serão esquecidos. Francisco, obrigada por recarregar minhas energias no período final do trabalho. Nicolle e Cibele, não tenho palavras suficientes para agradecer a parceria na execução do manual de sobrevivência ao *blotting*. A trajetória com vocês duas tornou tudo mais leve e possível. Muito obrigada por todo o apoio e por terem se tornado amigas tão especiais!

À toda equipe do Laboratório de Imunologia Aplicada à Aquicultura, em especial ao Prof. Rafael, que admiro desde a graduação, e à Beatriz, colega indispensável na execução deste trabalho. Muito obrigada por todo esforço e paciência que despenderam ao me apresentar o mundo da biologia molecular.

Aos colegas do Laboratório de Neurobiologia da Depressão, Ana Paula, Julie, Pedro e Louise. A convivência e os cafés com vocês foram essenciais.

Agradeço imensamente à minha família, em especial à minha mãe Dolores e à minha madrinha Cleci. Vocês são meu porto seguro e minha inspiração como mulheres. Obrigada por cuidarem com tanto carinho de mim e por ajudarem a tornar meus sonhos possíveis. Eu amo muito vocês!

Ao Axel, meu namorado e o maior incentivador deste trabalho. Agradeço por ter me ajudado e acolhido tanto, mesmo antes de se tornar minha dupla na vida. Obrigada por encarar essa jornada sempre com bom humor, (muita) paciência, compreensão e por me encorajar nas escolhas pessoais e profissionais. É uma honra poder crescer, compartilhar e celebrar a vida contigo. Sou imensamente grata ao mestrado por ter unido nossos caminhos.

Por último, à Universidade Federal de Santa Catarina, ao Programa de Pós-graduação em Neurociências, ao CNPq e ao corpo técnico-científico do LAMEB/CCB, em especial à Bibiana e Flávia pelo auxílio prestado nos experimentos.

*“Suba o primeiro degrau com fé.  
Não é necessário que você veja toda a escada.  
Apenas dê o primeiro passo.”*

***(Martin Luther King)***

## RESUMO

A adenosina é um neuromodulador endógeno derivado do ATP que atua através de receptores metabotrópicos. No encéfalo, os receptores inibitórios do subtipo A1 e os receptores estimulatórios do subtipo A2A são os mais amplamente expressos. Ao regular a liberação de neurotransmissores como a dopamina, serotonina, GABA e glutamato, a adenosina e seus receptores são capazes de modular o humor e respostas comportamentais. O presente estudo teve como objetivo investigar o impacto do estresse crônico de derrota social (ECDS) sobre a expressão e densidade dos receptores de adenosina A1 e A2A em regiões encefálicas envolvidas no controle emocional, mais especificamente, no núcleo accumbens (NAc), no hipocampo dorsal e ventral (dHIP, vHIP). Além disso, investigamos a densidade das proteínas sinápticas envolvidas na exocitose de neurotransmissores e na manutenção da densidade pós-sináptica. Para isso, 40 camundongos machos C57BL/6 (3 a 4 meses de idade) foram submetidos ao ECDS por 10 dias consecutivos. Vinte e quatro horas após o protocolo de estresse, a sociabilidade foi avaliada e os animais foram divididos em resilientes (índice de interação social igual ou maior que 1) e suscetíveis (índice de interação social menor que 1). O comportamento emocional foi avaliado nos animais controle, resilientes e suscetíveis pelo teste de suspensão pela cauda (TSC), campo aberto e labirinto em cruz elevado (LCE). A avaliação da expressão de mRNA dos receptores A1 e A2A foi realizada por RT-qPCR, e a densidade proteica dos receptores A1, A2A e das proteínas sinápticas foi mensurada por *Western Blotting* nas regiões de interesse. Após o ECDS, 50% dos animais foram considerados suscetíveis e 50% animais foram considerados resilientes ao estresse social. As estratégias de enfrentamento adotadas durante o confronto físico não foram diferentes entre os animais resilientes e suscetíveis ao estresse. Com relação ao comportamento emocional, o tempo e a latência para imobilidade no TSC não foram diferentes entre os grupos. No entanto, os camundongos suscetíveis exibiram um aumento de comportamentos relacionados à ansiedade, incluindo declínio na avaliação de risco no LCE, e diminuição no número de entradas e tempo total passado no centro do campo aberto. No vHIP, enquanto a expressão gênica dos receptores A1 foi reduzida após o ECDS tanto nos animais resilientes quanto nos suscetíveis, a expressão do receptor A2A aumentou nos animais suscetíveis, sugerindo um efeito do estresse. Por outro lado, houve uma redução no mRNA do gene ADORA2A no NAc de animais resilientes. Curiosamente, apenas os animais resilientes apresentaram mudanças na densidade proteica, incluindo a redução nos receptores A2A do NAc, dHIP e vHIP, bem como a diminuição de PSD-95 e o aumento de sinapsina-I no NAc. Os níveis do receptor A1 e das proteínas GluA1, gefirina e GR permaneceram inalterados após o ECDS. Os resultados indicam que a resposta resiliente está relacionada a adaptações no sistema adenosinérgico e em proteínas sinápticas nas regiões avaliadas. Esses resultados contribuem na compreensão dos mecanismos subjacentes à resposta ao estresse, e sugerem que a modulação dos receptores A2A pode ser crucial na manutenção do fenótipo resiliente.

**Palavras-chave:** Adenosina. Transtornos psiquiátricos. Estresse. Resiliência.

## ABSTRACT

Adenosine is an endogenous neuromodulator derived from ATP that acts through metabotropic receptors. In the brain, inhibitory A1 receptors and stimulatory A2A receptors are the most widely expressed. By regulating the release of neurotransmitters such as dopamine, serotonin, GABA and glutamate, adenosine and its receptors can modulate mood and behavioral responses. This study aimed to investigate the impact of A1 and A2A receptors in brain regions involved in emotional control, more specifically, the nucleus accumbens (NAc), dorsal and ventral hippocampus (dHIP, vHIP). We also investigated the density of synaptic proteins involved in neurotransmitter exocytosis and postsynaptic density maintenance. To this, 40 male C57BL/6 mice (3 to 4 months old) were subjected to CSDS to 10 consecutive days. Twenty-four hours after the stress protocol, sociability was evaluated, and animals were divided into resilient (social interaction index equal or greater than 1) and susceptible (social interaction index less than 1). Emotional behavior was evaluated in control, resilient and susceptible animals by the tail suspension test (TST), open field (OF) and elevated plus maze (EPM). RT-qPCR was used to evaluate mRNA expression of the A1 and A2A receptors, and the protein density of A1, A2A receptors, and synaptic proteins was measured by Western Blotting in the regions of interest. After CSDS, 50% of the animals were considered susceptible and 50% of the animals were considered resilient to stress. The coping strategies adopted during the physical confrontation were not different between the resilient and susceptible animals. Regarding the emotional behavior, the time and latency to immobility in the TST were not different between the groups. However, susceptible mice showed an increase in anxiety-related behaviors, including a decline in risk assessment in the LCE, and a decrease in the number of entries and total time spent in the center of the OF. In the vHIP, while the gene expression of the A1 receptors was reduced in both resilient and susceptible animals, the expression of A2A receptors had an increase in susceptible mice, suggesting a stress effect. On the other hand, there was a reduction in ADORA2A mRNA expression in the NAc of resilient animals. Interestingly, only resilient mice showed changes in protein density, including a reduction in the A2A receptors of the NAc, dHIP and vHIP, as well as a decrease in PSD-95 and an increase in synapsin-I in the NAc. The levels of the A1 receptor and the GluA1, gephyrin and GR proteins remained unchanged after the CSDS. The results indicate that the resilient response is related to adaptations in the adenosine system and in synaptic proteins. These results contribute to the understanding of the mechanisms underlying stress responses and suggest that the modulation of A2A receptors may be crucial in maintaining the resilient phenotype.

**Keywords:** Adenosine. Psychiatric disorders. Stress. Resilience.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Ativação dos eixos SAM e HHA em resposta a eventos estressores.....	20
Figura 2. Conectividade entre as regiões dorsal e ventral do HIP com o NAc .....	27
Figura 3. Projeções responsáveis pela conectividade do NAc .....	29
Figura 4. Modulação da transmissão glutamatérgica através dos receptores de adenosina .....	32
Figura 5. Estrutura química da adenosina .....	34
Figura 6. Metabolismo da adenosina e sinalização desencadeada pela ativação dos receptores A1 e A2A.....	37
Figura 7 – Delineamento experimental .....	44
Figura 8 - Representação do aparato do teste de interação social. ....	46
Figura 9. Efeito do ECDS no comportamento social .....	54
Figura 10. Número de ataques realizados pelos animais agressores e o efeito do ECDS nas estratégias de enfrentamento .....	55
Figura 11. Avaliação de parâmetros associados ao estresse nos animais controle e submetidos ao ECDS .....	56
Figura 12. Efeito do ECDS no comportamento do tipo-depressivo no TSC.....	57
Figura 13. Efeito do ECDS na atividade locomotora e em parâmetros associados à ansiedade no TCA.....	58
Figura 14. Efeito do ECDS em parâmetros associados à ansiedade no LCE.....	59
Figura 15. Efeito do ECDS na expressão de mRNA e níveis proteicos dos receptores A1 e A2A de adenosina no NAc.....	61
Figura 16. Expressão de mRNA dos receptores A1 e A2A e níveis proteicos no vHIP após o ECDS.....	63
Figura 17. Avaliação da densidade dos receptores A2A no dHIP de animais submetidos ao ECDS.....	64
Figura 18. Avaliação dos níveis de GluA1, PSD-95, gefirina e sinapsina-I em animais submetidos ao ECDS.....	66
Figura 19. Efeito do ECDS nas avaliações comportamentais, bioquímicas e moleculares.....	78

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Especificações dos anticorpos .....	52
---	----

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AC – adenilato ciclase  
ACTH – hormônio adenocorticotrófico  
ADA – adenosina deaminase  
AK – adenosina cinase  
AMP – adenosina 5' - monofosfato  
AMPA – alfa-amino-3-hidroxi-metil-5-4-isoxazolpropiónico  
AMPc – adenosina 5' - monofostato cíclico  
AMY - amígdala  
ANOVA – análise de variância  
ATP – adenosina 5' - trifosfato  
BDNF – fator neurotrófico derivado do encéfalo  
BSA – albumina de soro bovino  
CCVD – canal de cálcio voltagem dependente  
cDNA – DNA complementar  
CREB – proteína de ligação responsiva ao AMPc  
CRH – hormônio liberador de corticotrofina  
DAG – diacilglicerol  
dCA1 – região CA1 do hipocampo dorsal  
dHIP – hipocampo dorsal  
ECDS – estresse crônico de derrota social  
ENT – transportador equilibrativo de nucleosídeos  
EPM – erro padrão da média  
GABA – ácido gama-aminobutírico  
GC – glicocorticoides  
GnRH – hormônio liberador de gonadotrofina  
GRs – receptor de glicocorticoides  
HHA – hipotálamo-hipófise-adrenal  
iGluR – receptor ionotrópico de glutamato  
IIS – índice de interação social  
IL – interleucina  
IP3 – inositol 1,4,5-trifosfato  
KO – *knockout*  
LCE – labirinto em cruz elevado  
LH – habenula lateral  
mGluR – receptor de glutamato metabotrópico  
mPFC – córtex pré-frontal medial  
NAc – núcleo accumbens  
NMDA – N-metil D-Aspartato  
NTPDase – nucleosídeo trifostato difosfoidrolase  
PFC – córtex pré-frontal

PKA – proteína cinase A  
PKC – proteína cinase C  
PLC – fosfolipase C  
PMSF – fenilmetilsulfonilo  
PSD-95 – proteína de densidade pós-sináptica de 95 kDa  
RT-qPCR – transcriptase reversa da reação em cadeia da polimerase em tempo real  
SAH – S-adenosil-L-homocisteína  
SAM – simpático-adrenal-medular  
SNC – sistema nervoso central  
TCA – teste do campo aberto  
TDM – transtorno depressivo maior  
TGI – trato gastrointestinal  
TIS – teste de interação social  
TSC – teste de suspensão pela cauda  
vCA1 – região CA1 do hipocampo ventral  
vGAT – transportador vesicular de GABA  
vGLUT – transportador vesicular de glutamato  
vHIP – hipocampo ventral  
VTA – área tegmental ventral  
ZIS – zona de interação social

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	<b>15</b>
1.1	CONCEITO DE ESTRESSE.....	16
1.2	BIOLOGIA DO ESTRESSE.....	18
1.3	TRANSTORNO DEPRESSIVO MAIOR E TRANSTORNOS DE ANSIEDADE.....	21
1.4	RESILIÊNCIA E SUSCETIBILIDADE.....	23
1.5	HIPOCAMPO E NÚCLEO ACCUMBENS.....	25
1.6	MODULAÇÃO DA EXCITABILIDADE NEURONAL.....	30
1.7	SISTEMA ADENOSINÉRGICO.....	33
1.8	SISTEMA ADENOSINÉRGICO E MODULAÇÃO DO COMPORTAMENTO EMOCIONAL.....	38
1.8	JUSTIFICATIVA E HIPÓTESE.....	40
<b>2</b>	<b>OBJETIVOS</b> .....	<b>42</b>
2.1	Objetivo Geral.....	42
2.2	Objetivos Específicos.....	42
<b>3</b>	<b>MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	<b>43</b>
3.1	ANIMAIS.....	43
3.2	DELINEAMENTO EXPERIMENTAL.....	43
3.3	PROTOCOLO DE ESTRESSE.....	44
3.4	AVALIAÇÕES COMPORTAMENTAIS.....	45
3.4.1	Teste de interação social.....	45
3.4.2	Estratégias de enfrentamento.....	47
3.4.3	Teste de suspensão pela cauda.....	47
3.4.4	Teste do campo aberto.....	48
3.4.5	Teste do labirinto em cruz elevado.....	48
3.5	EXPRESSÃO GÊNICA DOS RECEPTORES A1 E A2A.....	49
3.5.1	Extração do RNA total e síntese do DNA complementar.....	49
3.5.2	PCR quantitativa em tempo real.....	49
3.6	IMUNODETECÇÃO DE PROTEÍNAS POR WESTERN BLOTTING.....	50
3.6.1	Preparação das amostras.....	50
3.6.2	Dosagem de proteínas.....	51
3.6.3	Eletroforese e imunodeteção.....	51
3.7	ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	52
<b>4</b>	<b>RESULTADOS</b> .....	<b>53</b>
4.1	EFEITO DO ECDS NO COMPORTAMENTO SOCIAL E ESTRATÉGIAS DE ENFRENTAMENTO.....	53

4.2	EFEITO DO ESTRESSE SOBRE O GANHO DE PESO E DENSIDADE DE RECEPTORES DE GLICOCORTICOIDES (GRS).....	55
4.3	EFEITO DO ECDS NO COMPORTAMENTO EMOCIONAL.....	57
4.3.1	<b>Avaliação do comportamento tipo-depressivo.....</b>	<b>57</b>
4.3.2	<b>Avaliação da atividade locomotora e comportamento tipo-ansioso.....</b>	<b>57</b>
4.4	EFEITO DO ECDS NA EXPRESSÃO E DENSIDADE DOS RECEPTORES DE ADENOSINA A1 E A2A.....	60
4.4.1	<b>Núcleo accumbens.....</b>	<b>60</b>
4.4.2	<b>Hipocampo ventral.....</b>	<b>62</b>
4.4.3	<b>Hipocampo dorsal.....</b>	<b>64</b>
4.5	EFEITO DO ECDS NO IMUNOCONTEÚDO DE PROTEINAS SINÁPTICAS .....	65
5	<b>DISCUSSÃO .....</b>	<b>67</b>
6	<b>CONCLUSÃO .....</b>	<b>78</b>
7	<b>PERSPECTIVAS .....</b>	<b>80</b>
8	<b>REFERÊNCIAS .....</b>	<b>81</b>

## 1 INTRODUÇÃO

O conceito de “estresse” tem sido atualizado à medida que a compreensão dos mecanismos de resposta evolui. No entanto, é consenso que eventos estressores são inevitáveis ao longo da vida, o que torna os processos adaptativos essenciais para mitigar desfechos prejudiciais. Após a exposição a um estressor, o organismo desencadeia respostas neuroendócrinas para promover a manutenção dos parâmetros fisiológicos (SELYE, 1950; MURISON, 2016; CATHOMAS *et al.*, 2019). Quando as respostas ocorrem de forma adaptativa, os parâmetros são restaurados após o estressor cessar. No entanto, estressores crônicos ou intensos são capazes de resultar em desfechos deletérios à saúde e no desenvolvimento de transtornos psiquiátricos, tais como o transtorno depressivo maior (TDM) e os transtornos de ansiedade (MCEWEN; GRAY; NASCA, 2015; MURISON, 2016). Contudo, apesar de o estresse ser o principal fator ambiental na gênese de tais condições, alguns indivíduos possuem uma maior capacidade de recuperação. Os mecanismos biológicos que caracterizam essa resiliência não são totalmente compreendidos, mas dependem de fatores ambientais, comportamentais, neuroquímicos e genéticos (MÉNARD *et al.*, 2016; CATHOMAS *et al.*, 2019).

O hipocampo (HIP) é uma região encefálica extremamente plástica, na qual a atividade e as conexões neuronais podem ser modificadas por fatores ambientais como o estresse. Enquanto o HIP dorsal (dHIP) está principalmente envolvido no processamento da memória espacial, o HIP ventral (vHIP) está associado a memórias emocionais e reações de resposta ao estresse (FANSELOW; DONG, 2010). O HIP também apresenta conexões extrínsecas envolvidas no controle do comportamento emocional. Entre elas, destacamos o núcleo accumbens (NAc), uma região envolvida em comportamentos motivados, hedônicos, de recompensa e de respostas aversivas (STRANGE *et al.*, 2014). Assim, prejuízos na função e neuroplasticidade de ambas as estruturas estão associados ao desenvolvimento de transtornos psiquiátricos em pacientes e a danos cognitivos e emocionais em modelos animais (RUSSO; NESTLER, 2013)

Diversos estudos buscam compreender os mecanismos neuroquímicos da resiliência, sendo que no modelo de Estresse crônico de derrota social (ECDS), a suscetibilidade está associada ao aumento do tônus glutamatérgico no HIP e NAc (RUSSO *et al.*, 2012; SALGADO; KAPLITT, 2015). Bagot e colaboradores (2015) demonstraram que a ativação

optogenética de projeções glutamatérgicas do circuito vHIP-NAc induzem o fenótipo suscetível, e sua inibição resulta no fenótipo resiliente (MUIR *et al.*, 2020).

A transmissão glutamatérgica pode ser modulada a partir de receptores de adenosina, os inibitórios do subtipo A1, e os excitatórios do subtipo A2A. No HIP, os receptores adenosinérgicos estão colocalizados principalmente nos terminais sinápticos, controlando a liberação de neurotransmissores e a excitabilidade neuronal. No NAc, os receptores A1 e A2A localizam-se majoritariamente de forma pós-sináptica nos neurônios espinhosos médios, em associação com os receptores de dopamina do subtipo D1 e D2, respectivamente (REBOLA *et al.*, 2005; FUXE *et al.*, 2010). Foi demonstrado que o estresse crônico está associado a um aumento nos níveis sinápticos de receptores A2A nos neurônios glutamatérgicos do HIP, levando ao comprometimento da memória e ao fenótipo do tipo depressivo, sendo tais disfunções restauradas após a inativação farmacológica dos receptores A2A (KASTER *et al.*, 2015). Dessa forma, sugere-se que o sistema adenosinérgico pode contribuir para a heterogeneidade das respostas comportamentais decorrentes de eventos estressores (CORRADETTI *et al.*, 1984; CIRUELA *et al.*, 2011; DIAS *et al.*, 2013).

Considerando isso, este trabalho avaliou o efeito do estresse no sistema adenosinérgico e em proteínas sinápticas em camundongos machos resilientes e suscetíveis ao ECDS. Nossa hipótese é de que o ECDS promove aumento na expressão e densidade de receptores A2A no vHIP de animais suscetíveis, acompanhado do aumento de proteínas relacionadas a sinapses excitatórias no NAc. Portanto, como fundamentação teórica, inicialmente será apresentado o conceito e fisiologia do estresse e resiliência, seguido pela modulação da excitabilidade do circuito HIP-NAc através do sistema adenosinérgico. Em seguida, será descrito o uso do ECDS como modelo experimental, e discutidos os resultados de sua influência nos parâmetros comportamentais, nos receptores de adenosina e em proteínas sinápticas do dHIP, vHIP e NAc de animais suscetíveis e resilientes.

## 1.1 CONCEITO DE ESTRESSE

Originalmente, o conceito de “estresse” era usado pela física e engenharia para se referir à deformidade de uma superfície sob ação de uma força externa. No entanto, em 1950, o endocrinologista Hans Selye cunhou o termo para se referir a eventos biológicos, e, desde então, tem sido amplamente utilizado e debatido. Nesse sentido, o estresse biológico foi descrito

como um conjunto de “respostas inespecíficas do corpo a qualquer mudança ou ameaça” (LAZARUS, 1993; KOOLHAAS *et al.*, 2011; MURISON, 2016).

As adaptações do organismo aos estímulos foram denominadas por Seyle como “síndrome da adaptação geral” (SAG). A síndrome descrita era subdividida em três fases: de alarme, de resistência e de exaustão. Segundo Seyle, na fase de alarme, o organismo libera hormônios, como a noradrenalina, e os glicocorticoides (GCs), para aumentar a demanda energética e preparar o corpo para enfrentar a ameaça ou desafio. Na fase de resistência, ocorrem adaptações frente às mudanças na tentativa de restaurar os parâmetros basais do corpo. No entanto, se a exposição ao estressor for prolongada, o organismo pode entrar na fase de exaustão, na qual as adaptações fisiológicas falham e promovem danos aos tecidos (SELYE, 1936).

Embora as definições de Seyle sejam de extrema relevância para o estudo biológico do estresse, são insuficientes para explicar todos os desfechos comportamentais e metabólicos observados. A SAG é alvo de diversas críticas, principalmente pela fase de exaustão ser estabelecida como um estágio final e irreversível (KOOLHAAS *et al.*, 2011). Além disso, o endocrinologista considerava apenas estímulos de natureza física como fonte de adversidades, paradigma que foi alterado após a publicação de uma revisão por John Mason (1975), consolidando a importância de estressores psicológicos.

Anterior às definições de Selye, Walter Cannon (1932) utilizou o termo “homeostasia” para descrever a manutenção de variáveis fisiológicas dentro dos limites ideais para o organismo. Além disso, descreveu a ativação do sistema nervoso central (SNC) e periférico na resposta de “luta ou fuga”, incluindo a liberação de catecolaminas, como a adrenalina e noradrenalina (CANNON, 1932). Diante disso, por muito tempo foi aceito que estressores são os estímulos que alteram a homeostasia, e que a resposta ao estresse é a reação do corpo na tentativa de restaurar o estado homeostático (MCEWEN; WINGFIELD, 2003). No entanto, o surgimento do termo “alostasia” expandiu essa compreensão, uma vez que há intervalos de alteração aceitáveis, mesmo que não ideais. Desse modo, a alostasia foi designada para descrever o processo de aquisição da estabilidade através dos ajustes necessários, considerando o estímulo e as condições do organismo (STERLING; EYER, 1998). Tal conceito também sofreu atualizações e passou a incluir estratégias comportamentais aliadas aos mecanismos neuroendócrinos (ROMERO; DICKENS; CYR, 2009).

Uma abordagem mais integrativa dessas definições destaca a importância da percepção e interpretação do estressor, bem como os diferentes desfechos individuais. Nesse contexto, o

estresse é compreendido através de quatro elementos: estímulo, percepção, resposta e impacto. O estímulo é o fator estressor em si. A percepção é a forma como o SNC e os sistemas sensoriais detectam e interpretam o estímulo. A resposta inclui as mudanças desencadeadas pelo sistema nervoso, endócrino e estratégias comportamentais na busca de preparar o organismo, sendo o impacto resultante de alterações fisiológicas e emocionais, patológicas ou não (LEVINE; URSIN, 1991; MCEWEN; STELLAR, 1993; LEVINE, 2005). Portanto, de forma mais recente, o estresse é considerado uma resposta consciente e inconsciente a demandas alostáticas, sendo o encéfalo o órgão responsável por processar e coordenar as manutenções apropriadas (MCEWEN; WINGFIELD, 2003).

## 1.2 BIOLOGIA DO ESTRESSE

Apesar do extenso debate sobre a definição terminológica de estresse, historicamente as alterações do sistema neuroendócrino são enfatizadas. Em mamíferos, os mecanismos de resposta e adaptação são bem elucidados, sendo realizados de forma complementar pelos eixos simpático-adrenal-medular (SAM) e hipotálamo-hipófise-adrenal (HHA), demonstrados na Figura 1. Ambos os eixos mobilizam e redistribuem a demanda metabólica de forma coordenada, integrando os sistemas periférico e central (SAPOLSKY; ROMERO; MUNCK, 2000; MURISON, 2016).

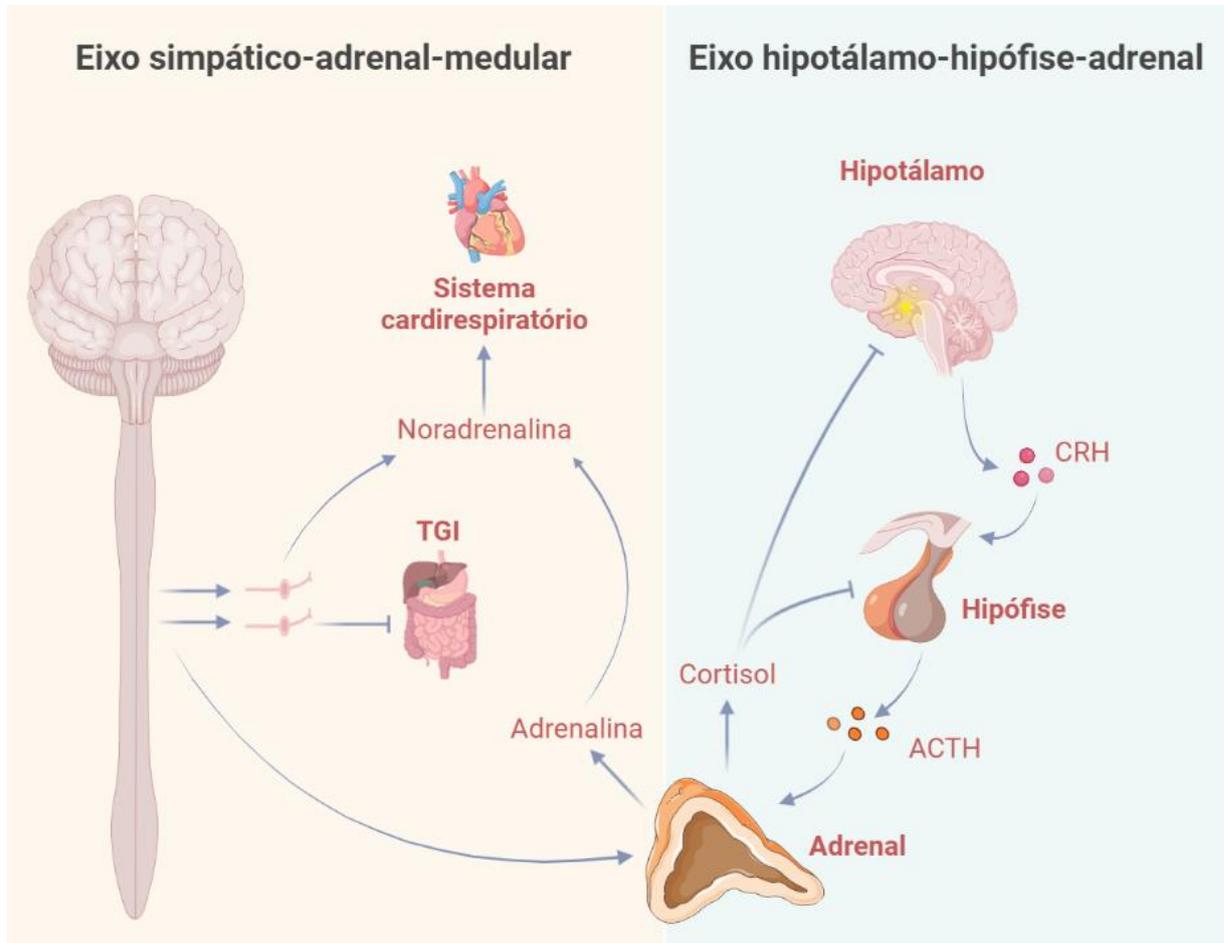
A exposição do corpo a estressores promove sucessivos mecanismos de resposta. Os primeiros processos ocorrem em segundos e induzem a secreção de catecolaminas diretamente pelo eixo SAM, desencadeando uma resposta de “luta ou fuga”. Além disso, ocorre a ativação de neurônios pré-ganglionares do sistema nervoso simpático, que emitem projeções para os gânglios vertebrais e órgãos periféricos efetores. Essa ativação promove a liberação de catecolaminas, sendo a medula da glândula adrenal responsável pela síntese e liberação de adrenalina, e os nervos simpáticos pela noradrenalina. Como resultado, há o aumento da frequência cardíaca, a vasoconstrição periférica e a mobilização do metabolismo energético. Em contraste, o sistema parassimpático é inibido, reduzindo processos digestivos, de fome e de sono (SAPOLSKY; ROMERO; MUNCK, 2000; EVEN; DEVAUD; BARRON, 2012).

Paralelamente, a nível de SNC, ocorre a ativação do eixo HHA. Em um primeiro momento, os núcleos paraventriculares do hipotálamo secretam o hormônio liberador de corticotrofina (CRH), que rapidamente atua na região anterior da adeno-hipófise e induz a

produção e liberação do hormônio adrenocorticotrófico (ACTH). Essa ativação atua inibindo a produção de hormônios gonadais hipotalâmicos e hipofisários, como o hormônio liberador de gonadotrofinas (GnRH). Inicia-se então uma resposta mais lenta e duradoura, promovida pela ação de hormônios esteroides. Em resposta ao hormônio ACTH, o córtex das glândulas adrenais produz e secreta GCs, como o cortisol e a corticosterona, principais GCs em humanos e em roedores, respectivamente (DE KLOET; JOËLS; HOLSBOER, 2005; ULRICH-LAI; HERMAN, 2009; EVEN; DEVAUD; BARRON, 2012).

Os GCs desempenham diferentes funções no organismo. Em níveis basais, ativam receptores mineralocorticoides e atuam de forma permissiva, facilitando a ativação dos eixos de resposta ao estresse e preparando o corpo para adversidades. Contudo, o aumento da concentração sistêmica ativa receptores de menor afinidade, caracterizados como receptores de glicocorticoides (GRs, do inglês “*glucocorticoid receptors*”). A distribuição de tais receptores é ampla, sendo encontrados no tecido muscular, adiposo e nervoso. Quando ativados, os GRs inibem as atividades consideradas não essenciais, como a mobilidade do trato gastrointestinal (SAPOLSKY; ROMERO; MUNCK, 2000; DE KLOET; JOËLS; HOLSBOER, 2005). Além disso, os GCs mobilizam estoques energéticos do organismo e, a partir de *feedback* negativo, promovem a retroinibição de sua secreção, tornando-se essenciais para a manutenção apropriada do eixo HHA. O HIP se destaca como uma região encefálica abundante em GRs, exercendo modulação do eixo HHA a partir da inibição da atividade do hipotálamo. Dessa forma, os efeitos dos GCs variam dependendo da intensidade e duração do estímulo. (DE KLOET; JOËLS; HOLSBOER, 2005; ULRICH-LAI; HERMAN, 2009; EVEN; DEVAUD; BARRON, 2012).

**Figura 1. Ativação dos eixos SAM e HHA em resposta a eventos estressores**



**Figura 1.** Os eventos estressores desencadeiam a ativação dos sistemas nervoso e endócrino. O eixo SAM medeia as respostas ao estresse inibindo o TGI e induzindo a liberação de catecolaminas de forma direta ou pela glândula adrenal. Tais hormônios mobilizam o metabolismo energético a partir da inibição da produção de insulina, aumento dos níveis de glicose sanguínea e da oxidação de ácidos graxos, além de ativarem o sistema cardiorrespiratório. Concomitantemente, é iniciada a resposta do eixo HHA pela estimulação dos núcleos paraventriculares do hipotálamo, que liberam o hormônio CRH na hipófise anterior. O CRH, por sua vez, induz a secreção de ACTH pela hipófise anterior, que atinge a circulação sistêmica. No córtex das glândulas adrenais, o ACTH estimula a síntese e secreção sistêmica de glicocorticoides (GCs), como o cortisol. Os GCs atuam em um mecanismo de *feedback* negativo, inibindo a produção dos hormônios hipotalâmicos e hipofisários de resposta ao estresse. ACTH: hormônio adrenocorticotrófico; CRH: hormônio liberador de corticotrofina; HHA – hipotálamo-hipófise-adrenal; SAM – simpático-adrenal-medular; TGI – trato gastrointestinal. Fonte: adaptado de EVEN; DEVAUD; BARRON, 2012. Elaborado pela autora utilizando imagens do Biorender e Servier Medical-Art.

Em roedores, os níveis basais de GCs plasmáticos permanecem em torno de 239 ng/mL e atingem a concentração média de 480,35 ng/mL entre 15-30 minutos após o início do estressor (PÉREZ-NIEVAS *et al.*, 2007). A resposta apropriada termina em conjunto com o fim do

estímulo, o que garante a restauração dos parâmetros energéticos e imunológicos (MCEWEN, 1998). Embora necessários para a sobrevivência a adversidades, o aumento sustentado de GCs é capaz de promover desfechos comportamentais e fisiológicos deletérios (DE KLOET; JOËLS; HOLSBOER, 2005).

É recorrente o aparecimento de doenças cardiovasculares promovidas pelo aumento da pressão sanguínea e batimentos cardíacos (WIRTZ; VON KÄNEL, 2017). Também são observados distúrbios digestivos e o desenvolvimento de doenças metabólicas, como o diabetes (MÖNNIKES *et al.*, 2001; TAMASHIRO *et al.*, 2011). Além disso, as alterações no sistema imune inato e adaptativo aumentam a vulnerabilidade a infecções. O aumento de citocinas inflamatórias, como das interleucinas (IL) IL-1 $\beta$ , IL-6 e o fator de necrose tumoral TNF- $\alpha$  é observado de forma sistêmica em roedores (MÉNARD *et al.*, 2016), sendo que esses níveis continuam elevados por até 1 mês após o término do protocolo de ECDS. Em humanos, o aumento de IL-6 também é observado em pacientes com transtorno depressivo maior (TDM) (HODES *et al.*, 2014).

No SNC, o aumento prolongado de GCs promove alterações sinápticas, na morfologia neuronal e funcionalidade de diversos circuitos encefálicos, como o córtex pré-frontal (PFC, do inglês “*pre-frontal cortex*”), HIP, amígdala e estriado (MUHAMMAD; CARROLL; KOLB, 2012). Alterações em fatores neurotróficos e no sistema imune também são observadas, apresentando ativação da sinalização do inflamassoma NLRP3 e NFk- $\beta$  (PFAU; RUSSO, 2015). Tais alterações estão comumente associadas a doenças neurodegenerativas, como a doença de Alzheimer e de Parkinson (MACHADO *et al.*, 2014), além de disfunções comportamentais e condições psiquiátricas, como o TDM e os transtornos de ansiedade (KINO, 2015; MÉNARD *et al.*, 2016).

### 1.3 TRANSTORNO DEPRESSIVO MAIOR E TRANSTORNOS DE ANSIEDADE

O desenvolvimento dos transtornos psiquiátricos é influenciado por fatores biopsicossociais, como aspectos genéticos, socioeconômicos, a presença de comorbidades psiquiátricas na família e fatores ambientais. Dessa forma, sua causa e progressão são consideradas multifatoriais. Entre os fatores ambientais, o estresse é considerado o mais importante na gênese e progressão dos transtornos psiquiátricos (AGID; KOHN; LERER, 2000; CHARNEY; MANJI, 2004; KRISHNAN; NESTLER, 2008; MCEWEN, 2011; CHOI; KIM; JEON, 2020). De acordo com a Organização Mundial da Saúde, as condições psiquiátricas mais

comuns e incapacitantes são o TDM e os transtornos de ansiedade, sendo que o Brasil ocupa o primeiro lugar no mundo em termos diagnósticos de ansiedade e o segundo lugar em relação ao TDM (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2017). É recorrente o aparecimento de ambos de forma concomitante, sugerindo a possibilidade de mecanismos biológicos comuns entre as condições psiquiátricas. Cerca de 85% das pessoas com TDM apresentam algum tipo de transtorno de ansiedade. A porcentagem aumenta para 90% tratando-se de indivíduos diagnosticados com transtornos de ansiedade que apresentam quadros depressivos em algum momento da vida (KAUFMAN; CHARNEY, 2000; CHOI; KIM; JEON, 2020).

Os diagnósticos psiquiátricos são baseados no Manual Diagnóstico e Estatístico de Transtornos Mentais (DSM) da Associação de Psiquiatria Americana, que está na 5ª Edição (DSM-5). No TDM, o paciente deve apresentar pelo menos cinco dos seguintes sintomas, por um período mínimo de duas semanas: I) humor deprimido; II) anedonia; III) fadiga; IV) culpa; V) sensação de inutilidade; VI) dificuldade de concentração; VII) ideações suicidas; VIII) alterações no apetite, sono e locomoção, sendo ao menos um dos dois primeiros essencialmente presentes. Além disso, os sintomas precisam apresentar impacto negativo na vida do indivíduo e não podem estar associados ao uso de medicamentos ou outras doenças (AMERICAN PSYCHIATRIC ASSOCIATION, 2014). Estima-se que um a cada seis homens e uma a cada quatro mulheres apresentará um episódio depressivo ao longo da vida, sendo que ao menos 50% dessas pessoas terão episódios recorrentes (BURCUSA; IACONO, 2007; KESSLER; MERIKANGAS; WANG, 2007).

Já a ansiedade é uma resposta normal do organismo. No entanto, quando exagerada e persistente pode promover disfunções que configuram o transtorno, caracterizado pela presença de medo e ansiedade excessivos. Os transtornos de ansiedade podem ser categorizados de acordo com os sintomas físicos e psicológicos, como sudorese, taquicardia, falta de ar, dificuldades de concentração, alteração no sono e rigidez muscular (CRASKE *et al.*, 2009; STEIN; SAREEN, 2015). Dentre os diferentes perfis biológicos, destaca-se o transtorno de ansiedade generalizada, agorafobia, crises de pânico e fobias específicas (STEIN; STEIN, 2008; CRASKE; STEIN, 2016; CRASKE *et al.*, 2017)

Devido à alta prevalência, o TDM e os transtornos de ansiedade são considerados problemas de saúde pública, capazes de gerar incapacidade e prejuízos na qualidade de vida dos indivíduos afetados e de seus familiares (BURCUSA; IACONO, 2007; KESSLER, 2012; HENDERSON; EVANS-LACKO; THORNICROFT, 2013). Esse cenário se agravou em

decorrência da pandemia de COVID-19, que devido às incertezas, inseguranças sociais, financeiras e de saúde pública, além do possível efeito direto da infecção, aumentou de forma expressiva os diagnósticos psiquiátricos (SANTOMAURO *et al.*, 2021).

Apesar de os mecanismos biológicos ainda não serem totalmente elucidados, os transtornos psiquiátricos estão associados a alteração em diversos parâmetros fisiológicos, tais como a redução da diversidade da microbiota gastrointestinal, a ativação de vias imunológicas, o aumento do tônus glutamatérgico, além de disfunções de fatores neurotróficos e nos níveis de monoaminas encefálicas (MARTINOWICH; MANJI; LU, 2007; TORDERA *et al.*, 2007; KRISHNAN; NESTLER, 2008; SANACORA; TRECCANI; POPOLI, 2012; HAMON; BLIER, 2013; MURROUGH; ABDALLAH; MATHEW, 2017).

Apesar de condições estressoras não serem obrigatoriamente um fator causal para o surgimento dos transtornos psiquiátricos, a ativação crônica dos eixos de resposta ao estresse, em conjunto com os demais fatores biológicos e psicossociais, contribui para a sua gênese e desenvolvimento (KRISHNAN; NESTLER, 2008; CRASKE; STEIN, 2016). Contudo, as respostas não são iguais entre os indivíduos, sendo que alguns podem apresentar um fenótipo resiliente, com menor impacto, severidade, cronicidade ou maior capacidade de recuperação. Nesse sentido, a compreensão dos fatores individuais capazes de conferir resiliência ao estresse e minimizar desfechos psiquiátricos é um campo em ascensão nas Neurociências (SOUTHWICK; VYTHILINGAM; CHARNEY, 2005; MCEWEN, 2011; PFAU; RUSSO, 2015).

#### 1.4 RESILIÊNCIA E SUSCETIBILIDADE

Desde o início dos estudos relacionados ao estresse, compreende-se que indivíduos produzem respostas diferentes aos estímulos. Selye utilizava os termos “eustresse”, para se referir a respostas bem adaptativas e “distresse” para descrever respostas mal adaptativas (SELYE, 1976). No final dos anos 1970, se iniciaram ensaios clínicos com adultos expostos à eventos traumáticos durante a infância, como vulnerabilidade socioeconômica, abuso, negligência parental e problemas de saúde. Neste estudo, se observou que alguns indivíduos possuíam capacidade de manter boas relações interpessoais e demonstravam adaptabilidade a novas situações, permanecendo mentalmente saudáveis. Esses indivíduos foram classificados como “invulneráveis”, termo que posteriormente foi substituído por “resilientes” (WERNER; SMITH, 1995; MASTEN, 2001; PFAU; RUSSO, 2015).

A palavra “resiliência” deriva do latim *resilire* e significa “voltar atrás”. Assim como o termo “estresse”, foi empregado das ciências exatas, onde é usado para descrever a capacidade de um material de retornar ao seu estado original após sofrer diferentes tipos de estresses (MASTEN, 2001; RUTTER, 2012). De forma similar, em contexto biológico, a resiliência é um processo dinâmico que busca restaurar o estado basal do organismo frente a eventos estressores. Embora ainda não se tenha total compreensão dos mecanismos envolvidos, acredita-se que é um processo integrativo que envolve estratégias comportamentais e neuroquímicas (CATHOMAS *et al.*, 2019; HAN; RUSSO; NESTLER, 2019).

Atualmente, se compreende que em humanos a resiliência é promovida a partir de mecanismos ativos de enfrentamento e por alterações moleculares que ajudam a promover um comportamento funcional, envolvendo fatores como suporte social e traços comportamentais, como otimismo frente a adversidades. Em animais, a resiliência é manifestada por estratégias de enfrentamento ativas, como a busca por abrigo ou proteção, menor esquiva social e a manutenção apropriada do comportamento emocional (SOUTHWICK; VYTHILINGAM; CHARNEY, 2005; CATHOMAS *et al.*, 2019).

Diversos estudos têm buscado compreender os aspectos neuroquímicos da resiliência, destacando as alterações hipocâmpais (RUSSO *et al.*, 2012; DUDEK *et al.*, 2019). Animais suscetíveis apresentam uma maior ativação do HIP, bem como a redução do volume estrutural e alterações na expressão gênica (SALA *et al.*, 2004; NASCA *et al.*, 2019). Em geral, sugere-se que há disfunções no tônus glutamatérgico do HIP que interferem na resposta resiliente e suscetível ao estresse (RUSSO *et al.*, 2012; NASCA *et al.*, 2019; LAROSA; WONG, 2022).

Apesar das limitações na reprodução das complexidades dos transtornos psiquiátricos de humanos para roedores, diferentes modelos animais foram desenvolvidos para tentar simular os aspectos centrais de tais disfunções. Estes protocolos incluem abordagens farmacológicas, manipulações genéticas e protocolos de estresse, que podem ser utilizados separadamente ou em conjunto. No entanto, a alta prevalência de estímulos estressores na rotina contemporânea torna os modelos de estresse essenciais para compreender os mecanismos neuroquímicos e comportamentais envolvidos. Alguns destes protocolos permitem a subdivisão entre dois grupos heterogêneos: os animais resilientes, com menores alterações emocionais, e animais suscetíveis, com prejuízo emocional acentuado. Nesse sentido, destacam-se o modelo de desamparo aprendido e o ECDS (SCHARF; SCHMIDT, 2012; CATHOMAS *et al.*, 2019).

No modelo de desamparo aprendido, os animais são expostos a sessões de choques, seguido por sessões onde é permitido o escape da situação. Entre 20% e 90% dos animais demonstram uma maior latência e menores tentativas de escape, sendo considerados suscetíveis. Entretanto, além da grande disparidade da apresentação do fenótipo suscetível, as alterações comportamentais possuem curta duração, com uma estimativa entre 2 e 3 dias (PFAU; RUSSO, 2015; SILLIVAN *et al.*, 2017).

No modelo de ECDS, a vulnerabilidade é induzida de forma mais consistente, com maior índice de animais suscetíveis e respostas prolongadas. O protocolo consiste em expor um animal de forma crônica e intensa a um estressor social físico e sensorial. Ao contrário dos demais modelos, que promovem estressores através do experimentador, o ECDS reproduz uma adversidade recorrente e natural aos animais, sendo capaz de mimetizar as respostas exibidas em seu habitat natural. Além disso, as alterações são observadas por até 6 meses, tornando-se uma importante ferramenta para avaliar *in vivo* as teorias moleculares dos transtornos de humor a médio e longo prazo (KRISHNAN *et al.*, 2007; GOLDEN *et al.*, 2011; RUSSO *et al.*, 2012; WANG *et al.*, 2021). Neste modelo, a suscetibilidade é caracterizada por esquiva social, comportamentos anedônicos e desenvolvimento de síndromes metabólicas, afetando cerca de 65% dos animais. A resiliência, por outro lado, é apresentada como uma menor taxa nestes parâmetros (RUSSO *et al.*, 2012; LAROSA; WONG, 2022). Portanto, o ECDS tem potencial de prover informações integrativas sobre os mecanismos de resiliência e suscetibilidade (WANG *et al.*, 2021).

## 1.5 HIPOCAMPO E NÚCLEO ACCUMBENS

O HIP é uma das regiões mais bem estudadas do encéfalo. Em humanos, é uma estrutura alongada localizada no lobo temporal medial. Em roedores, localiza-se abaixo do neocórtex e possui um formato alongado e levemente arredondado. A estrutura faz parte da formação hipocampal, constituída pelo córtex entorrinal, subículo, giro denteado e regiões hipocampais CA1, CA2 e CA3 (WITTER, 2012; KNIERIM, 2015).

A anatomia funcional do HIP é bem descrita e caracteriza-se pelo circuito tri-sináptico, composto por células piramidais em uma única camada que percorrem o eixo longitudinal (STRANGE *et al.*, 2014). Esse circuito interliga as projeções iniciadas no córtex entorrinal com o giro denteado, que envia sinais para a região CA3, as encaminha para a região CA1 e as retorna para o córtex entorrinal. Além disso, as regiões CA3 e CA1 se conectam diretamente

(KNIERIM, 2015). O processamento da informação hipocampal através do circuito tri-sináptico resulta principalmente de conexões entre neurônios inibitórios GABAérgicos e excitatórios glutamatérgicos (STEPAN; DINE; EDER, 2015; WEN *et al.*, 2022).

O eixo longitudinal também permite a subdivisão do HIP em duas regiões: hipocampo ventral (vHIP) e dorsal (dHIP), que apresentam funcionalidade, padrões de expressão gênica e papéis fisiológicos distintos (FANSELOW; DONG, 2010; WITTER, 2012). O vHIP corresponde a 50% da região anterior, e é associado a regulação de comportamentos emocionais e de respostas ao estresse (BANNERMAN *et al.*, 2003; PENTKOWSKI *et al.*, 2006; BAGOT *et al.*, 2015). Já o dHIP se refere à região posterior e está associado principalmente a memória espacial, cognição e processos de aprendizagem (MOSER; MOSER, 1998). Apesar de as conexões intraestruturais serem similares entre o dHIP e vHIP, a distribuição das aferências extraestruturais se diferem entre as sub-regiões CA1 do hipocampo ventral (vCA1) e dorsal (dCA1). A dCA1 recebe projeções principalmente das regiões CA2 e CA3, enquanto a vCA1 possui aferências majoritárias da região CA3, córtex entorrinal, áreas olfatórias e amígdala (TAO *et al.*, 2021).

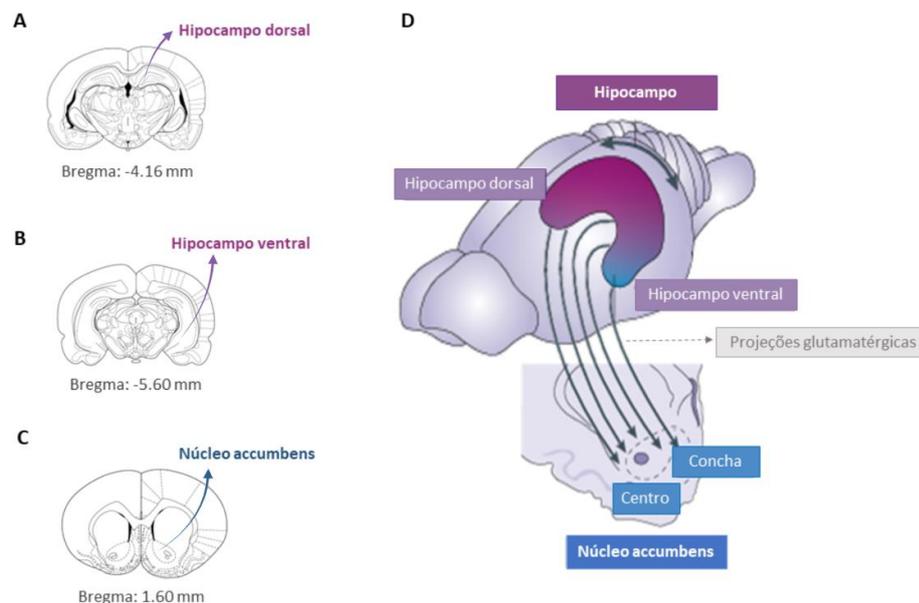
O HIP de mamíferos é uma estrutura extremamente plástica, mesmo após a maturação do encéfalo adulto. Essa característica é devido à presença de neurônios glutamatérgicos na região, que são fortemente modulados por hormônios, condições ambientais e experiências, alterando a morfologia e conexões em busca de adaptar-se a diferentes situações (SEIB; MARTIN-VILLALBA, 2014). Além disso, a alta densidade de receptores mineralocorticoides e GRs tornam o HIP altamente responsivo a eventos estressores (LEVONE; CRYAN; O'LEARY, 2015; KIM; PELLMAN; KIM, 2015; CATHOMAS *et al.*, 2019). Portanto, o HIP vem sendo estudado como uma estrutura que contribui com as respostas suscetível e resiliente ao estresse, dependendo das adaptações sofridas (LAROSA; WONG, 2022).

Após eventos estressores, é observada a redução do volume estrutural (MURISON, 2016), e diminuição na densidade de GRs hipocampais, o que reduz capacidade de inibição do eixo HHA (DE KLOET; JOËLS; HOLSBOER, 2005; ANACKER *et al.*, 2016). Além disso, modelos animais de estresse crônico são capazes alterar os níveis de fator neurotrófico derivado do encéfalo (BDNF) a longo prazo (TOTH *et al.*, 2008). Após o protocolo de ECDS, são observadas alterações neuroquímicas e de neuroplasticidade hipocampal, com diminuição da neurogênese em animais suscetíveis e aumento em animais resilientes (CATHOMAS *et al.*, 2019). Em relação ao sistema glutamatérgico, animais suscetíveis ao estresse crônico

imprevisível apresentam aumento no tônus de glutamato, demonstrado pela quantifica o dos níveis do receptor N-metil-D-aspartato (NMDA) (HAN *et al.*, 2015) e em proteínas associadas   transmissão sináptica, como sinapsina-I e SNAP-25 (proteína associada   sinaptossomas de 25 kDa) (ZHOU *et al.*, 2015). Além disso, camundongos resilientes ao estresse crônico imprevisível e ao ECDS apresentam aumento de receptores mineralocorticoides, GR e BDNF (BERGSTR M *et al.*, 2008; SCHMIDT *et al.*, 2010; HAN *et al.*, 2017), enquanto há redu o nos animais suscetíveis (WANG *et al.*, 2019). Também são observadas altera es na regula o da expressão gênica, como a acetila o de histonas no vHIP de animais submetidos ao ECDS (KENWORTHY *et al.*, 2014). Ademais, animais *knockout* (KO) para proteína de liga o responsiva ao AMPc (CREB) apresentam fenótipo suscetível (MANNERS *et al.*, 2019).

Devido às conexões extraestruturais, as implica es do estresse na neuroquímica do HIP levaram ao estudo de outras regiões encefálicas envolvidas no controle do comportamento (MCEWEN; GRAY; NASCA, 2015). As aferências do HIP prov m majoritariamente do córtex entorrinal, locus coeruleus e núcleos da rafe. Como eferências, o HIP emite proje es glutamatérgicas da região CA1 para o PFC, amígdala e NAc, como destacado na Figura 2 (BAST; ZHANG; FELDON, 2001; STRANGE *et al.*, 2014; KNIERIM, 2015).

**Figura 2. Conectividade entre as regiões dorsal e ventral do HIP com o NAc**



**Figura 2.** Representa o do eixo coronal do encéfalo de roedores, mostrando as se es que cont m o dHIP (A), vHIP (B) e NAc (C). Visão longitudinal das proje es glutamatérgicas da região CA1 do HIP para o NAc (D). A região dorsal do hipocampo está majoritariamente associada a processos cognitivos e de memória, enquanto a região ventral   associada com respostas endócrinas e de comportamento

social. O NAc também é subdividido em duas regiões: o centro, com funções motoras, e o concha, com funções límbicas. Fonte: adaptado de STRANGE *et al.*, 2014; PAXINOS; WATSON, 2018.

A caracterização do NAc em modelos animais iniciou com estudos na década de 1970, que o identificavam anatomicamente distinto das demais regiões do estriado (FLORESCO, 2015). Embora esteja associado ao sistema de recompensa, caracterizações da funcionalidade demonstram sua contribuição em diferentes aspectos comportamentais. Dessa forma, a conectividade entre o NAc com o sistema límbico e motor modula comportamentos aversivos, como o de esquivar social, e a exploração de novos objetos (DELGADO; JOU; PHELPS, 2011).

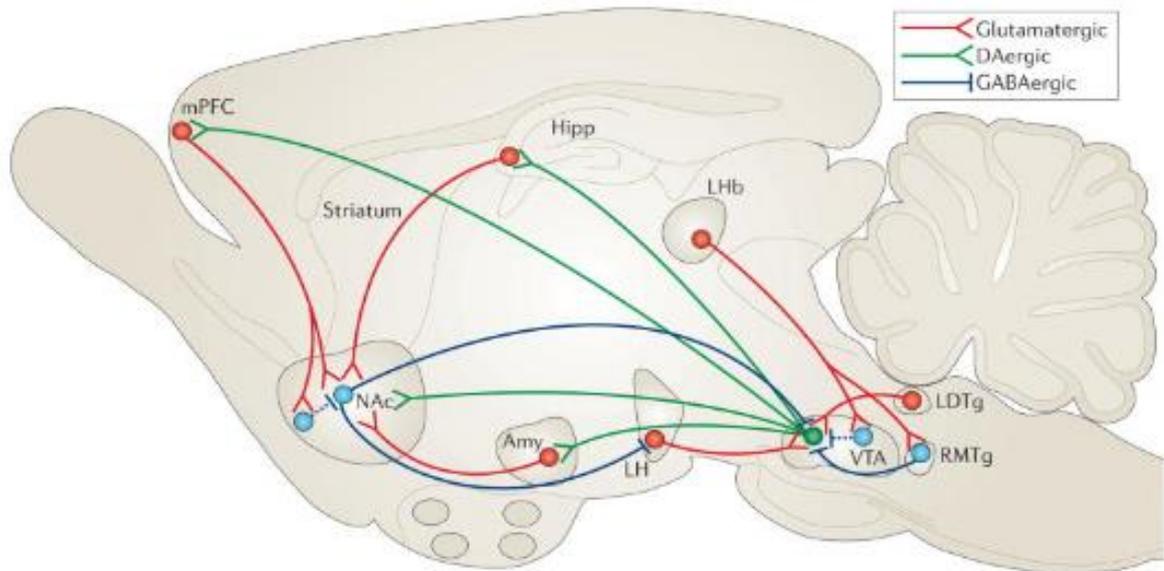
A organização do NAc subdivide-se de acordo com aspectos histológicos e de conexões neuronais. A região lateral é caracterizada como “concha”, do inglês “*shell*”, e a região medial como “centro”, do inglês “*core*”. Enquanto o centro apresenta influência no comportamento motor e a estímulos compensatórios, a concha parece estar associada a inibição de comportamentos aversivos (ZAHM; BROG, 1992; SALGADO; KAPLITT, 2015).

Em humanos, a ativação de neurônios do NAc está principalmente associada à percepção de situações aversivas, sendo estimulada durante comportamentos de evitação ativos (DELGADO; JOU; PHELPS, 2011; LEVITA; HOSKIN; CHAMPI, 2012). Ademais, indivíduos que sofreram estresse infantil apresentam uma diminuição da atividade da região durante a adolescência, característica que se associa à diagnósticos depressivos (GOFF *et al.*, 2013). No entanto, a maior parte da compreensão da funcionalidade do NAc provém de modelos animais. Em roedores, as sub-regiões centro e concha se diferem na composição bioquímica. A concha apresenta uma baixa densidade neuronal e utiliza neurotransmissores como substância P e dopamina. Em contraste, o centro possui uma alta densidade neuronal, e a presença de encefalina, receptores GABA<sub>A</sub> e receptores adenosinérgicos (LOBO *et al.*, 2006). A exposição a adversidades é capaz e promover alterações nessas substâncias, como a redução de encefalina em animais suscetíveis ao ECDS (NAM *et al.*, 2019). Entretanto, a distinção das sub-regiões é possível apenas através de manipulações que avaliam sua funcionalidade, como eletrofisiologia. Portanto, não é possível diferenciar tais regiões em técnicas de coleta que se baseiam somente na avaliação anatômica do encéfalo (SALGADO; KAPLITT, 2015; FOX *et al.*, 2020).

Os neurônios do NAc são formados majoritariamente por neurônios espinhosos médios, que utilizam o ácido  $\gamma$ -aminobutírico (GABA) como neurotransmissor (PENNARTZ; GROENEWEGEN; DA SILVA, 1994; FLORESCO, 2015). Em contraste, recebe aferências

neurônios que utilizam o glutamato como transmissor excitatório. Portanto, como ilustrado pela Figura 3, a excitabilidade da região depende das aferências glutamatérgicas das demais estruturas encefálicas, sendo elas o PFC, HIP e amígdala (RUSSO; NESTLER, 2013).

**Figura 3. Projeções responsáveis pela conectividade do NAc**



**Figura 3.** A figura ilustra a conectividade encefálica envolvendo o NAc. O NAc é composto principalmente por neurônios inibitórios que enviam projeções GABAérgicas para a área tegmentar ventral (VTA) e habenula lateral (LH), destacadas em azul. As eferências glutamatérgicas para o NAc, destacadas em vermelho, são provenientes da região medial do PFC (mPFC), HIP e amígdala (Amy). Além disso, a produção e liberação de dopamina, representada em azul, participa do circuito de recompensa, sendo produzida pela VTA, que emite projeções para o mPFC, HIP, NAc e Amy. Abreviações: Amy – amígdala; HIP – hipocampo; LH – habenula lateral; mPFC – córtex pré-frontal medial; NAc – núcleo accumbens; VTA – área tegmentar ventral. Fonte: RUSSO & NESTLER, 2013.

Enquanto as projeções do PFC são associadas a uma variedade de respostas cognitivas e afetivas, as provenientes da amígdala associam-se com comportamentos aversivos e a percepção do valor de algum estímulo (FLORESCO, 2015). Já as projeções emitidas pelo HIP modulam respostas comportamentais ao estresse (BAGOT *et al.*, 2015; MUIR *et al.*, 2020).

O aumento do tônus glutamatérgico do NAc vem sendo associado à patofisiologia de transtornos psiquiátricos como esquizofrenia, TDM e transtorno obsessivo/compulsivo (RUSSO; NESTLER, 2013; SALGADO; KAPLITT, 2015). Além disso, a suscetibilidade ao ECDS está associada ao aumento da transmissão glutamatérgica e na densidade espinhos

dendríticos, o que se correlaciona com comportamento de esquiva social (FOX *et al.*, 2020). Bagot e colaboradores (2015) demonstraram que quando estimuladas por optogenética, as projeções do HIP, mais especificamente da região ventral, induzem a suscetibilidade ao ECDS. Além disso, a inibição do circuito vHIP-NAc resulta em um fenótipo resiliente. Dessa forma, é possível que alterações na excitabilidade do NAc influenciem nos mecanismos de resiliência a partir das projeções emitidas pelo vHIP (BAGOT *et al.*, 2015; CATHOMAS *et al.*, 2019; MUIR *et al.*, 2020).

## 1.6 MODULAÇÃO DA EXCITABILIDADE NEURONAL

A ação excitatória do glutamato no encéfalo de mamíferos foi descoberta na década de 1950 e desde então é reconhecido como o aminoácido mais abundante do SNC. Seu papel inclui processos intracelulares de indução sináptica, migração, diferenciação, plasticidade e morte celular (ERECINSKA, 1990; NAKANISHI *et al.*, 1998). Através da modulação sináptica, promove a manutenção funcional do encéfalo, participando de processos cognitivos, de aprendizagem e memória (RIEDEL, 2003; ROBBINS; MURPHY, 2006).

Após sintetizado, o glutamato é armazenado em vesículas sinápticas glutamatérgicas (vGLUT) (TAKAMORI, 2006). Quando ocorre influxo de íons cálcio suficiente para despolarizar a membrana pré-sináptica, as vGLUTs utilizam de proteínas sinápticas e de acoplamento, como a sinapsina-I e SNAP-25, para fundir-se a membrana (NICHOLS *et al.*, 1992; BOGEN *et al.*, 2011; ANTONUCCI *et al.*, 2013). Após a exocitose, o glutamato se difunde na fenda sináptica e ativa os receptores ionotrópicos (iGluR) e metabotrópicos (mGluR). Os iGluR possuem três classes: NMDA, alfa-amino-3-hidroxi-5-metil-4-ácido isoxazol propiônico (AMPA) e cainato, que alteram sua conformação após se ligarem ao agonista (BIGGE, 1999; KEW; KEMP, 2005; FERRAGUTI; SHIGEMOTO, 2006).

Os receptores AMPA compreendem quatro subunidades: GluA1-GluA4, que em conjunto com os receptores cainato, promovem a resposta primária de despolarização celular (KESSELS; MALINOW, 2009; LEE *et al.*, 2010). Já os receptores NMDA permanecem ancorados à proteína PSD-95 (proteína pós-sináptica de 95 kDa) e possuem a maior afinidade pelo glutamato. Apesar disso, a ativação dos NMDA depende de uma complexa e ordenada sequência para tornar-se permeável aos íons cálcio. Inicialmente, é necessária a ligação de um co-agonista, como a glicina ou D-serina, dependendo das subunidades presentes. Em seguida,

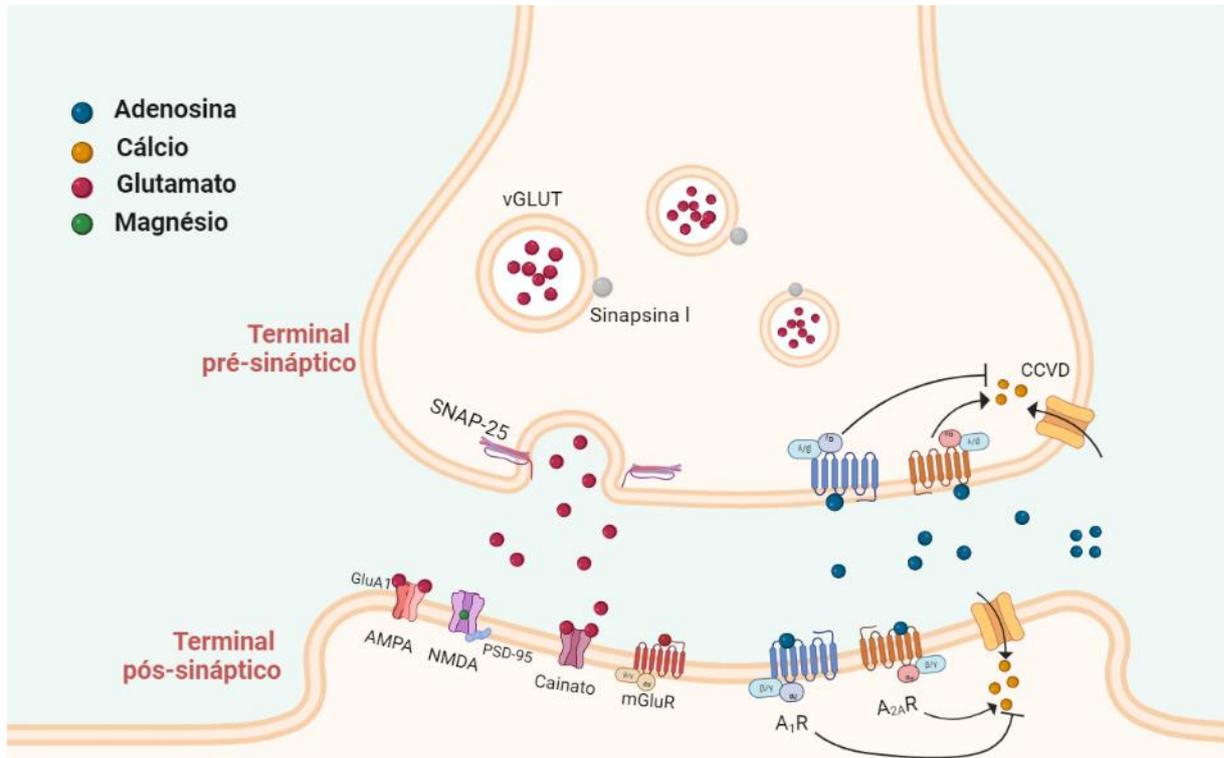
é necessário que ocorra a despolarização inicial da membrana, fazendo com que os íons  $Mg^{2+}$  que ocupam o centro dos canais sejam liberados (SHENG, 2001; PAOLETTI; NEYTON, 2007).

Estressores são capazes de modular a transmissão glutamatérgica em associação com a disfunção comportamental em roedores. Há um aumento na expressão dos receptores NMDA e na subunidade GluA1 do receptor AMPA no HIP de animais suscetíveis ao ECDS. Além disso, o bloqueio dos NMDA reverte a resposta suscetível (COSTA-NUNES *et al.*, 2013; HASEGAWA *et al.*, 2019; TSE *et al.*, 2019). Em contraste, outros estudos demonstram a redução da subunidade GluA1 no HIP de animais suscetíveis (GARCÍA-PARDO *et al.*, 2018). Já as alterações morfológicas diferem entre as regiões encefálicas avaliadas e o modelo de estresse utilizado. No HIP, enquanto o estresse agudo promove um aumento de espinhos dendríticos na região CA1, a região CA3 e o giro denteado apresentam diminuição em animais suscetíveis ao ECDS (SHORS; CHUA; FALDUTO, 2001). Já no NAc e na área tegmentar ventral, é vista uma redução dos espinhos dendríticos de animais expostos ao ECDS (QU *et al.*, 2017).

Portanto, o controle apropriado da disponibilidade de glutamato na fenda sináptica é crucial para a preservação das sinapses excitatórias e prevenção da excitotoxicidade, que, além de promover morte neuronal, está associada na etiologia e progressão de doenças psiquiátricas. Em roedores, o aumento do tônus glutamatérgico no HIP e NAc é associado ao desenvolvimento de comportamentos tipo-depressivos e tipo-ansiosos (JAVITT, 2004; TAKAHASHI; FOSTER; LIN, 2015; OLLOQUEQUI *et al.*, 2018).

Por conta disso, a concentração de glutamato extracelular é regulada por uma complexa rede de mecanismos. Como demonstrado na Figura 4, destaca-se a modulação a partir dos receptores purinérgicos A1 e A2A, que através da ativação por seu ligante endógeno, a adenosina, inibem ou estimulam a ação do glutamato de forma pré e pós-sináptica (CORRADETTI *et al.*, 1984; CIRUELA *et al.*, 2011; DIAS *et al.*, 2013). No caso dos receptores A1, quando ativados, inibem a entrada de íons cálcio, o que torna a membrana hiperpolarizada e por consequência inibe a liberação de glutamato, além de dificultar a excitabilidade da célula pós-sináptica. Em contraste, o aumento da adenosina circulante ativa o receptor A2A e facilita o influxo de íons cálcio, promovendo o aumento na liberação de glutamato e facilitando a despolarização do neurônio pós-sináptico (CALKER *et al.*, 2019).

**Figura 4. Modulação da transmissão glutamatérgica através dos receptores de adenosina**



**Figura 4.** Após a despolarização da membrana pré-sináptica, as vGLUTs fundem-se à membrana com o auxílio de proteínas de acoplamento, como a sinapsina I e SNAP-25. A fusão da membrana vesicular com a membrana neuronal promove a exocitose das moléculas de glutamato. O glutamato circulante na fenda sináptica inicialmente se acopla aos receptores cainato e AMPA, que são formados por subunidades distintas, como a GluA1. Após a despolarização inicial do neurônio pós-sináptico, os receptores NMDA, que permanecem acoplados à PSD-95, alteram sua conformação, liberando o magnésio que os bloqueia. Assim, o influxo de glutamato aumenta e, como resultado, a membrana atinge o limiar de disparo de forma rápida. Paralelamente, a colocação de receptores de adenosina modula a transmissão e a resposta glutamatérgica. No caso da ativação dos A1R, os CCVD são inibidos, o que mantém a membrana hiperpolarizada. No neurônio pré-sináptico, a inibição do influxo de cálcio reduz a mobilização das vGLUTs, e por consequência, a liberação de glutamato. Já no neurônio pós-sináptico, a hiperpolarização promovida pelos A1R dificulta a excitabilidade da membrana. De forma oposta, os receptores A2A ativam os CCVD quando ligados na adenosina circulante. Essa ativação induz a liberação glutamatérgica e promove a facilitação da despolarização da membrana. Abreviações: A1R – receptor de adenosina A1; A2AR – receptor de adenosina A2A; AMPA –  $\alpha$ -amino-3-hidroxi-metil-5,4-isoxazolpropiônico; CCVD – canais de cálcio voltagem dependentes; GluA1 – subunidade A1 do receptor AMPA; mGluR – receptor de glutamato metabotrópico; NMDA – N-metil-D-aspartato; PSD-95 – proteína pós-sináptica de densidade de 95 kDa; SNAP-25 – proteína associada a sinaptossomas de 25 kDa; vGLUT – vesícula de glutamato. Fonte: originado a partir de imagens do Biorender; elaborado pela autora.

Alterações no sistema inibitório GABAérgico também são observadas, como o aumento da subunidade  $\alpha 1$  dos receptores GABA<sub>A</sub> no vHIP de animais resilientes a modelos

de estresse pós-traumático. Somado a isso, é observada a redução dos níveis de GABA em animais suscetíveis ao ECDS (ARDI *et al.*, 2016; ARDI *et al.*, 2019; HAMILTON *et al.*, 2020). Ademais, camundongos machos suscetíveis ao ECDS e pacientes com TDM possuem redução na expressão gênica de proteínas associadas à transmissão GABAérgica no NAc, como as vesículas transportadoras de GABA (vGAT) e a gefirina, proteína pós-sináptica associada a sinapses inibitórias (HESHMATI *et al.*, 2020).

Em conjunto, esses estudos sugerem que a suscetibilidade e resiliência ao estresse podem ser moduladas a partir da transmissão de glutamato e GABA, podendo esses aminoácidos exercer papéis distintos dependendo da sub-região avaliada (LAROSA; WONG, 2022). Além disso, a fonte do estressor também precisa ser levada em consideração. Enquanto animais suscetíveis ao ECDS e ao estresse de contenção apresentam um aumento na transmissão de glutamato e GABA no HIP, é observado uma redução desses parâmetros nos modelos de estresse crônico imprevisível e desamparo aprendido (LIU *et al.*, 2018).

## 1.7 SISTEMA ADENOSINÉRGICO

A regulação apropriada da excitabilidade dos circuitos encefálicos é essencial para a manutenção da resposta resiliente ao estresse. Essas modulações são afetadas por alterações no potencial de membrana, destacando-se a ação do sistema purinérgico (POPOLI *et al.*, 1995; JEONG *et al.*, 2003; MATOS *et al.*, 2012; FERREIRA *et al.*, 2014).

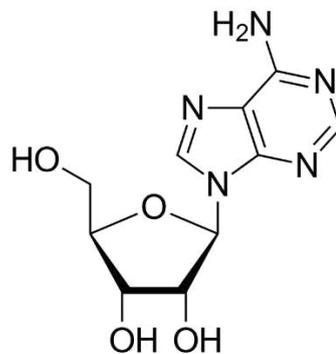
As purinas são uma classe de moléculas orgânicas aromáticas essenciais no metabolismo celular. Esse sistema engloba nucleotídeos e nucleosídeos derivados de guanina e adenina, bem como a maquinaria necessária para sua síntese e metabolismo. Além disso, as moléculas podem ser mono, di ou tri fosfatadas, e exercem diversas funções fisiológicas, como proliferação e migração celular (HUANG *et al.*, 2021).

A atividade mediada por moléculas derivadas de adenina ocorre através dos receptores purinérgicos do subtipo P1 ou P2 (BURNSTOCK; KENNEDY, 1985). Os receptores da classe P2 ligam-se às moléculas de ATP e ADP e subdividem-se em inotrópicos P2X e metabotrópicos P2Y. Já os receptores da família P1 possuem a adenosina como ligante endógeno e subdividem-se em 4 tipos: A1, A2A, A2B e A3 (BURNSTOCK, 2018).

Os estudos envolvendo compostos derivados de adenina iniciaram-se no final dos anos 1920, com experimentos relacionados ao sistema cardiovascular e seu uso como um vasodilatador indutor de bradicardia (DRURY; SZENT-GYÖRGYI, 1929). Apesar disso, a

purificação do composto e a descrição da estrutura química da adenosina (Figura 5) foi estabelecida somente no início década seguinte, por Levene e Tipson (1931). Constituída por uma base púrica (adenina) ligada a uma ribose, a adenosina atua de diversas formas como um nucleosídeo essencial para a manutenção celular (PHILLIS, 1991), participando de processos de respiração celular, de biossíntese de proteínas e do sistema imune (OHTA; SITKOVSKY, 2001). Atualmente, sabe-se que a adenosina atua em diversas funções fisiológicas no sistema cardiovascular (VECCHIO *et al.*, 2015), metabolismo energético (KROUPENOVA; RAVID, 2013), sistema imune, resposta inflamatória (HASKÓ *et al.*, 2008), entre outras.

**Figura 5. Estrutura química da adenosina**



**Figura 5.** A adenosina (ADO) é um nucleosídeo abundante presente em todas as células, constituída por uma adenina ligada a uma ribose. Além das funções metabólicas, no SNC a ADO atua como um neuromodulador, mediando respostas excitatórias e inibitórias através da ativação de seus receptores. Fórmula química:  $C_{10}H_{13}N_5O_4$ ; *PubChem* CID: 60961.

A síntese de adenosina pode ocorrer de forma intra e extracelular (Figura 6), e se modifica de acordo com a demanda metabólica do organismo. No meio intracelular, sua formação pode ser iniciada a partir da hidrólise de AMP através de 5' nucleotidases. Após sintetizada, pode ser fosforilada pela adenosina cinase (AK) e retornar para seu estado em AMP, ou convertida em inosina pela adenosina deaminase (ADA) (BRUNDEGE *et al.*, 1997). Outra forma de síntese intracelular é através da enzima SAH-hidrolase, que converte moléculas de S-adenosilhomocisteína (SAH) em homocisteína e adenosina (SCHRADER; SCHÜTZ; BARDENHEUER, 1981). Além disso, a molécula de adenosina consegue migrar pela membrana através de transportadores equilibrativos de nucleosídeos (ENTs), que permitem o fluxo dependendo de alterações na concentração da adenosina (ALANKO; PORKKAHEISKANEN; SOINILA, 2006). Por outro lado, os níveis extracelulares podem ser afetados tanto pela síntese e liberação intracelular, quando pela hidrólise de ATP por ecto 5'-

nucleotidases, reação a qual depende da disponibilidade de ATP. No entanto, apesar de modular a atividade neuronal, a adenosina não é considerada um neurotransmissor clássico, uma vez que não é liberada por exocitose de vesículas e pode afetar regiões não sinaptogênicas (ZIMMERMANN; ZEBISCH; STRÄTER, 2012)

Sendo assim, a partir da ativação de seus receptores de membrana, a adenosina atua como um neuromodulador. Inicialmente, os receptores adenosinérgicos eram classificados em duas categorias: A1 e A2 (CALKER; MÜLLER; HAMPRECHT, 1979). Posteriormente, estudos refinaram essa categorização em dois subgrupos, os receptores com alta afinidade pela molécula, sendo eles os inibitórios A1 e os excitatórios A2A, e um com menor afinidade pela adenosina, sendo caracterizado como o excitatório A2B. Atualmente, são descritos quatro subtipos de receptores, tendo sido descoberto os receptores A3, que atuam de forma inibitória. Enquanto os receptores A2B e A3 localizam-se majoritariamente no sistema periférico, os receptores A1 e A2A são amplamente presentes em neurônios, astrócitos e na microglia (FREDHOLM *et al.*, 2011).

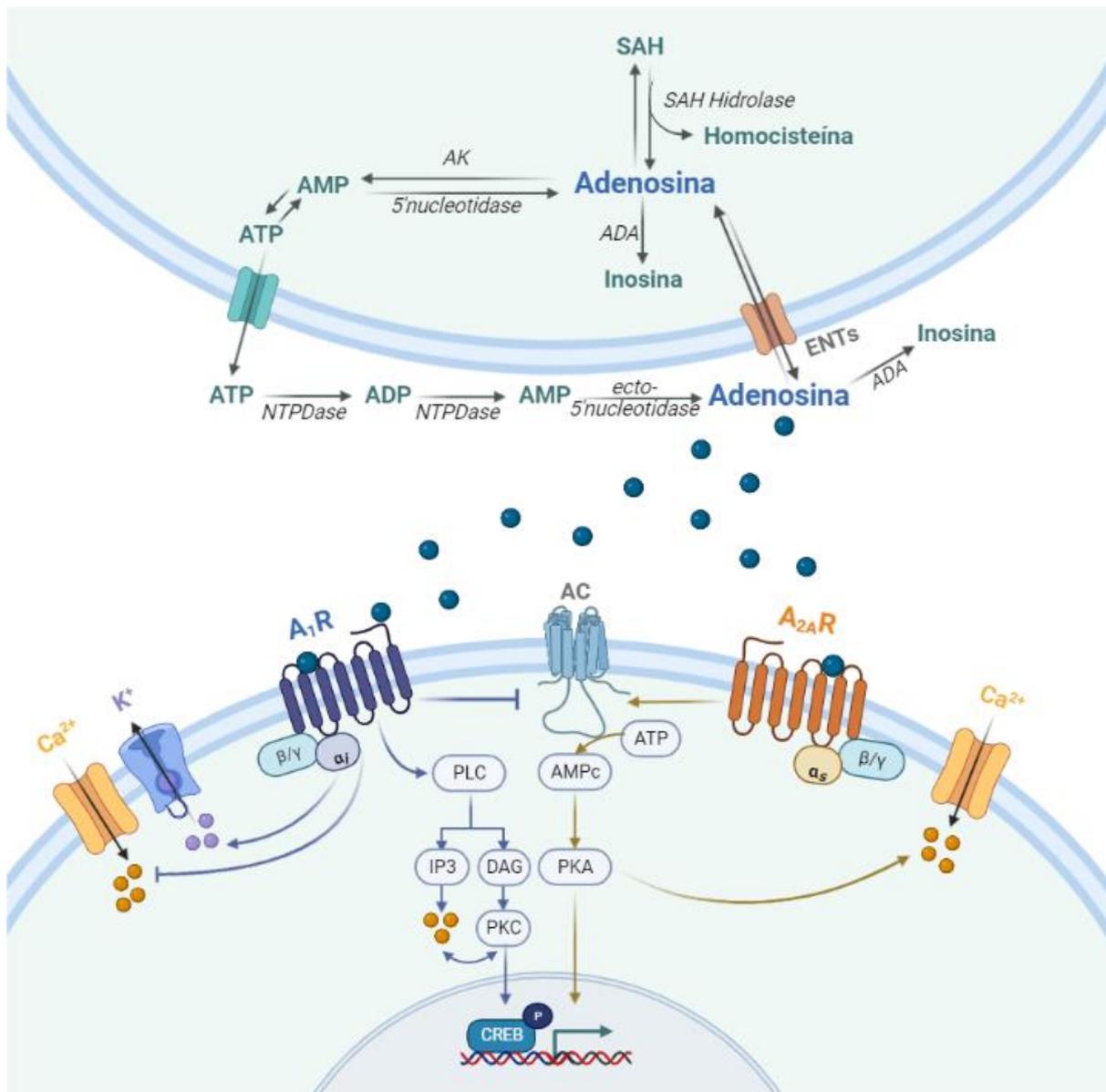
Portanto, no encéfalo, a adenosina age majoritariamente a partir da ativação dos receptores A1, inibitórios, e os A2A, excitatórios (FREDHOLM *et al.*, 2005). Esses receptores contêm sete domínios transmembrana  $\alpha$ -helicoidal e são acoplados à proteína G no meio intracelular. A sinalização ocorre através de alterações na atividade de adenilato ciclase (AC), resultando na subsequente alteração dos níveis de adenosina monofosfato cíclica (AMPc) e da cascata de segundos mensageiros (CUNHA *et al.*, 1994; LOPES *et al.*, 2002).

O subtipo A1, codificado pelo gene ADORA1, é o mais bem conservado entre as espécies e possui a maior afinidade pela adenosina. Localiza-se de forma ampla no SNC, e sua distribuição é similar a dos receptores NMDA, estando presente em estruturas como cerebelo, HIP, PFC, tálamo e tronco encefálico (FASTBOM *et al.*, 1987). Após a ativação, produzem uma resposta inibitória devido ao seu acoplamento à proteína  $G_{i/o}$ . Sua ativação é capaz de inibir a AC, diminuindo a concentração de AMPc e a atividade da proteína cinase dependente de AMPc (PKA). Além disso, pode ativar a via da fosfolipase C (PLC), que utiliza a proteína cinase C (PKC) para formar os segundos mensageiros inositol 1,4,5-trifosfato (IP3) e diacilglicerol (DAG). O IP3 inibe canais de cálcio<sup>+</sup> presentes na membrana e permite a abertura de canais de potássio, além de recrutar o aumento da concentração intracelular de íons cálcio. Como resultado, a célula torna-se hiperpolarizada, o que, de forma pré-sináptica, inibe a liberação de neurotransmissores. Já no neurônio pós-sináptico, reduz a excitabilidade da membrana. Além disso, a partir da ativação da via da PKC, pode modular a atividade

transcricional através da fosforilação do CREB (CONNOLLY; KINGSBURY, 2010; LI *et al.*, 2015). Nesse sentido, a ativação dos receptores A1 modula a transcrição de fatores metabólicos, como o citocromo C, de transcrição, como c-Fos, de crescimento, como o BDNF, e de sobrevivência celular, como a beclina-2 (WANG *et al.*, 2018).

Já os receptores A2A são codificados pelo gene ADORA2A. No encéfalo, são distribuídos majoritariamente nos neurônios pós-sinápticos do NAc e em regiões como o estriado, mas também são expressos em menor densidade no HIP e PFC (CUNHA *et al.*, 1994; LOPES *et al.*, 2002; REBOLA *et al.*, 2005). Devido ao seu acoplamento à proteína Gs, atuam a partir da estimulação da via da PKA, que promove a abertura de canais de cálcio voltagem dependentes (CCVD) e interfere em fatores de transcrição a partir de segundos mensageiros (CUNHA *et al.*, 1994; LOPES *et al.*, 2002). Além disso, podem inibir a atividade dos receptores A1 a partir de mecanismos intracelulares ou com a formação de heterodímeros (CIRUELA *et al.*, 2006; FREDHOLM *et al.*, 2007). Dessa forma, o equilíbrio entre a ativação dos receptores A1 e A2A neuronais e gliais modula a liberação de neurotransmissores, como o glutamato, principal responsável pela excitabilidade neuronal. (CIRUELA *et al.*, 2006).

**Figura 6. Metabolismo da adenosina e sinalização desencadeada pela ativação dos receptores A1 e A2A**



**Figura 6.** A produção de adenosina (ADO) ocorre no meio intracelular através da hidrólise do AMP promovida pela enzima 5'nucleotidase, reação que pode ser revertida pela enzima AK. Alternativamente, é possível converter a SAH em homocisteína e ADO com auxílio da enzima SAH hidrolase. No meio extracelular, a síntese de ADO ocorre a partir da conversão do ATP em ADP e AMP, mediada por NTPDases, e da conversão do AMP em adenosina, mediada pela ecto-5'nucleotidase. O ATP pode ser carregado para o meio extracelular com auxílio de transportadores. De forma similar, ADO formada pode trafegar para ambos os meios celulares, com auxílio de ENTs. A ADO pode ser convertida em inosina pela ADA, ou desencadear repostas mediadas a partir da ativação dos receptores adenosinérgicos. A ativação dos receptores A1 inibe a atividade da AC, reduzindo a concentração de AMPc e a atividade da PKA. Além disso, os A1R podem ativar a via da PLC, induzindo a produção de IP3 e DAG, que, em conjunto, são capazes de ativar a PKC e recrutar reservas intracelulares de cálcio. Também é possível que os A1R inibam CCVD e ativem canais de K<sup>+</sup>. Por outro lado, a ligação da ADO

nos A2AR pode ativar a atividade da AC, aumentando os níveis de AMPc e da atividade de PKA. Somado a isso, esses receptores podem ativar diretamente CCVD. A ativação de ambos os receptores é capaz de modular a transcrição gênica a partir da fosforilação do CREB. Abreviações: A1R – receptor de adenosina A1; A2AR – receptor de adenosina A2A; ADA – adenosina deaminase; ADO – adenosina; AK – adenosina cinase; AMP – adenosina monofosfato; AMPc – adenosina 5'- monofosfato cíclica; ATP – adenosina 5'- trifosfato; CCVD – canal de cálcio voltagem dependente; CREB – proteína de ligação responsiva ao AMPc; DAG – diacilglicerol; ENTs – transportador de nucleosídeos equilibrativo; IP3 – Inositol 1,4, 5-trifosfato; PKA – proteína cinase A; PKC – proteína cinase C; PLC – fosfolipase C; SAH – S-adenosil-L-homocisteína. Fonte: originado a partir de imagens do Biorender; elaborado pela autora.

Em condições basais, os níveis celulares da adenosina permeiam em torno de 50-200 nM e ativam principalmente os receptores A1 (LOPES; SEBASTIAO; RIBEIRO, 2011). No entanto, em situações de alta demanda metabólica, como condições estressoras, a concentração dos precursores adenosinérgicos aumenta (HAMILTON *et al.*, 2020), levando os níveis extracelulares de adenosina para a ordem de  $\mu\text{M}$ , o que promove a ativação dos receptores do subtipo A2A, e, por consequência, a excitabilidade os circuitos (SCACCIANOCE *et al.*, 1989; FREDHOLM *et al.*, 2005; PEDATA *et al.*, 2006).

## 1.8 SISTEMA ADENOSINÉRGICO E MODULAÇÃO DO COMPORTAMENTO EMOCIONAL

A adenosina desempenha um papel complexo e importante na modulação do comportamento emocional, devido a sua capacidade de afetar mecanismos de plasticidade sináptica e estrutural. Como neuromodulador, atua regulando a liberação de neurotransmissores como monoaminas, catecolaminas, GABA e glutamato. Isso faz com que o sistema adenosinérgico seja um potencial alvo para o tratamento de doenças neurodegenerativas e psiquiátricas caracterizadas por disfunções nesses sistemas de neurotransmissores, como o Alzheimer, Parkinson, esquizofrenia, transtornos de humor e de ansiedade (SEBASTIAO; RIBEIRO, 2009; GOMES *et al.*, 2011).

Estudos clínicos suportam o envolvimento do sistema adenosinérgico na modulação do humor. Pacientes com TDM apresentam níveis elevados de adenosina sérica (GUBERT *et al.*, 2016). Entretanto, as principais evidências provêm de estudos com a cafeína, que atua como um antagonista dos receptores A1 e A2A. O consumo moderado de café, com o limite de 6 xícaras por dia, promove a redução dos sintomas do TDM, além do aumento na eficácia de

medicamentos antidepressivos (LIU *et al.*, 2017; LÓPEZ-CRUZ; SALAMONE; CORREA, 2018). No entanto, doses superiores podem causar sintomas de ansiedade, irritabilidade e insônia (WANG *et al.*, 2015). Tratamentos crônicos com demais antagonistas, como a istradefilina, que atua inibindo a atividade dos receptores A2A, demonstram melhora nos sintomas depressivos de pacientes com Parkinson (NAGAYAMA *et al.*, 2019). Ademais, polimorfismos no gene ADORA2A são classificados como ansiogênicos e estão relacionados ao aumento da transmissão glutamatérgica nos transtornos de ansiedade e depressão (HAMILTON *et al.*, 2003; LAM; HONG; TSAI, 2005; ROGERS *et al.*, 2010; OLIVEIRA *et al.*, 2018; HOHOFF *et al.*, 2020).

Em roedores, o aumento da adenosina circulante também está relacionado ao desenvolvimento de comportamentos tipo-depressivos, demonstrados pelo aumento no tempo de imobilidade no teste do nado forçado, sendo este parâmetro revertido após a administração de antidepressivos tricíclicos (CALKER *et al.*, 2019). Kaster e colaboradores (2004) demonstraram que a administração de adenosina (5-10 mg/kg, i.p.) foi capaz de reduzir o tempo em imobilidade no teste do nado forçado e no TSC, sendo que tal efeito foi revertido após a administração de antagonistas dos receptores A1 e A2A. Em um estudo subsequente, foi demonstrado que a manipulação de moléculas do metabolismo adenosinérgico podem alterar os parâmetros comportamentais relacionados ao comportamento tipo-depressivo. Especificamente, o tratamento com inosina reduziu o tempo de imobilidade no teste do nado forçado (5 e 50 mg/kg, i.p.) e no TSC (1 e 10 mg/kg, i.p.), sendo que a inibição dos receptores A1 e A2A reverteu o efeito antidepressivo observado no teste de nado forçado. Curiosamente, a inibição da enzima adenosina deaminase (1 e 10 mg/kg, i.p.) também promoveu efeito antidepressivo no teste do nado forçado (KASTER *et al.*, 2013). Todavia, a compreensão dessas alterações comportamentais torna-se complexa, uma vez que há interações entre a adenosina e os sistemas serotoninérgico, opioide e glutamatérgico (KASTER; SANTOS; RODRIGUES, 2005; KASTER *et al.*, 2007; KASTER *et al.*, 2012).

Além disso, a densidade dos receptores adenosinérgicos é modulada a partir de condições estressores através do aumento de GCs, que induzem a expressão dos receptores A2A e diminuem a densidade dos receptores A1 hipocâmpais, em associação com o desenvolvimento de transtornos psiquiátricos (GERWINS; FREDHOLM, 1991, SVENNINGSSON; FREDHOLM, 1997; CREMA *et al.*, 2013). Ao contrário dos receptores A2A, a ativação dos receptores A1 é reconhecida como neuroprotetora, pois diminui a excitabilidade neuronal e apresenta efeitos ansiolíticos (SEBASTIAO; RIBEIRO, 2009; CALKER *et al.*, 2019). Além

disso, animais KO para os receptores A1 apresentam aumento da ansiedade espontânea e do perfil de agressividade (LEDENT *et al.*, 1997; JOHANSSON *et al.*, 2001; GIMÉNEZ-LLORT *et al.*, 2002).

Estudos farmacológicos com modelos animais também corroboram evidências da adenosina nas alterações emocionais promovidas por estressores. O tratamento crônico com cafeína reverte a esquiva social de animais suscetíveis ao ECDS (YIN *et al.*, 2015). Kaster e colaboradores (2015) demonstraram que o aumento dos receptores A2A hipocampais promovido pela exposição ao estresse crônico imprevisível está associado ao déficit cognitivo e ao comportamento do tipo-depressivo, efeitos revertidos após a inibição farmacológica (KASTER *et al.*, 2015). De forma complementar, animais KO para os receptores A2A demonstram ação protetora frente a estressores, exibindo um maior índice de sociabilidade, e uma redução nos comportamentos anedônicos e na sensibilidade a novidades sociais após o ECDS (EL YACOUBI *et al.*, 2001; YAMADA *et al.*, 2013; LÓPEZ-CRUZ *et al.*, 2017).

Portanto, condições psiquiátricas frequentemente apresentam a excitotoxicidade como um evento que acompanha a etiologia e progressão dos sintomas. Tal efeito é associado ao aumento no tônus glutamatérgico e diminuição do tônus GABAérgico dos circuitos encefálicos. Nesse sentido, os receptores de adenosina demonstram forte associação na modulação desses sistemas de neurotransmissores e, por consequência, no desenvolvimento e progressão dos transtornos psiquiátricos (SEBASTIAO; RIBEIRO, 2009; CALKER *et al.*, 2019).

## 1.8 JUSTIFICATIVA E HIPÓTESE

O estresse crônico é considerado o principal fator ambiental no desenvolvimento de transtornos psiquiátricos, que representam a causa primária de redução da qualidade de vida, da capacidade produtiva e de socialização (KRISHNAN; NESTLER, 2008). A exposição ao estresse é inevitável, e, nesse contexto, a utilização de modelos animais para compreender os mecanismos capazes de promover resiliência torna-se indispensável para o desenvolvimento de estratégias preventivas e mitigadoras (CATHOMAS *et al.*, 2019).

Diversos estudos buscam compreender os mecanismos neuroquímicos da resiliência, sendo que no modelo de ECDS, a suscetibilidade está associada ao aumento do tônus glutamatérgico no NAc e HIP (RUSSO *et al.*, 2012; RUSSO; NESTLER, 2013; SALGADO; KAPLITT, 2015). Bagot e colaboradores (2015) demonstraram que as projeções glutamatérgicas do circuito vHIP-NAc induzem o fenótipo suscetível, e sua inibição resulta

no fenótipo resiliente. Sendo assim, sugere-se que a excitabilidade do NAc influencie na resposta suscetível a partir das projeções glutamatérgicas do vHIP (BAGOT et al., 2015; CATHOMAS et al., 2019; MUIR et al., 2020). A neurotransmissão glutamatérgica pode ser modulada a partir de receptores de adenosina, os inibitórios A1, e os excitatórios A2A, colocalizados nas membranas neuronais do HIP e NAc. Dessa forma, sugere-se que o sistema adenosinérgico pode contribuir para a heterogeneidade das respostas comportamentais decorrentes de eventos estressores (CORRADETTI et al., 1984; CIRUELA et al., 2011; DIAS et al., 2013).

Considerando isso, esse trabalho avaliou o efeito do estresse sobre o sistema adenosinérgico e em proteínas sinápticas em camundongos machos resilientes e suscetíveis ao ECDS. Nossa hipótese é de que o ECDS promove o aumento na expressão e densidade dos receptores A2A no vHIP de animais suscetíveis, associado ao aumento de proteínas sinápticas excitatórias no NAc.

## 2 OBJETIVOS

### 2.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar o impacto do estresse crônico de derrota social nos receptores de adenosina A1 e A2A e em proteínas sinápticas do núcleo accumbens e das sub-regiões dorsal e ventral do hipocampo em camundongos machos com respostas resilientes e suscetíveis.

### 2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Caracterizar, em animais controle, suscetíveis e resilientes ao estresse crônico de derrota social:

- i) O comportamento social e emocional;
- ii) A expressão genica dos receptores de adenosina A1 e A2A no NAc e vHIP;
- iii) Diferenças regionais da densidade de receptores de adenosina A1 e A2A no NAc, vHIP e dHIP;
- iv) A densidade de GRs e de proteínas sinápticas associadas à transmissão glutamatérgica e GABAérgica no NAc, vHIP e dHIP.

### 3 MATERIAL E MÉTODOS

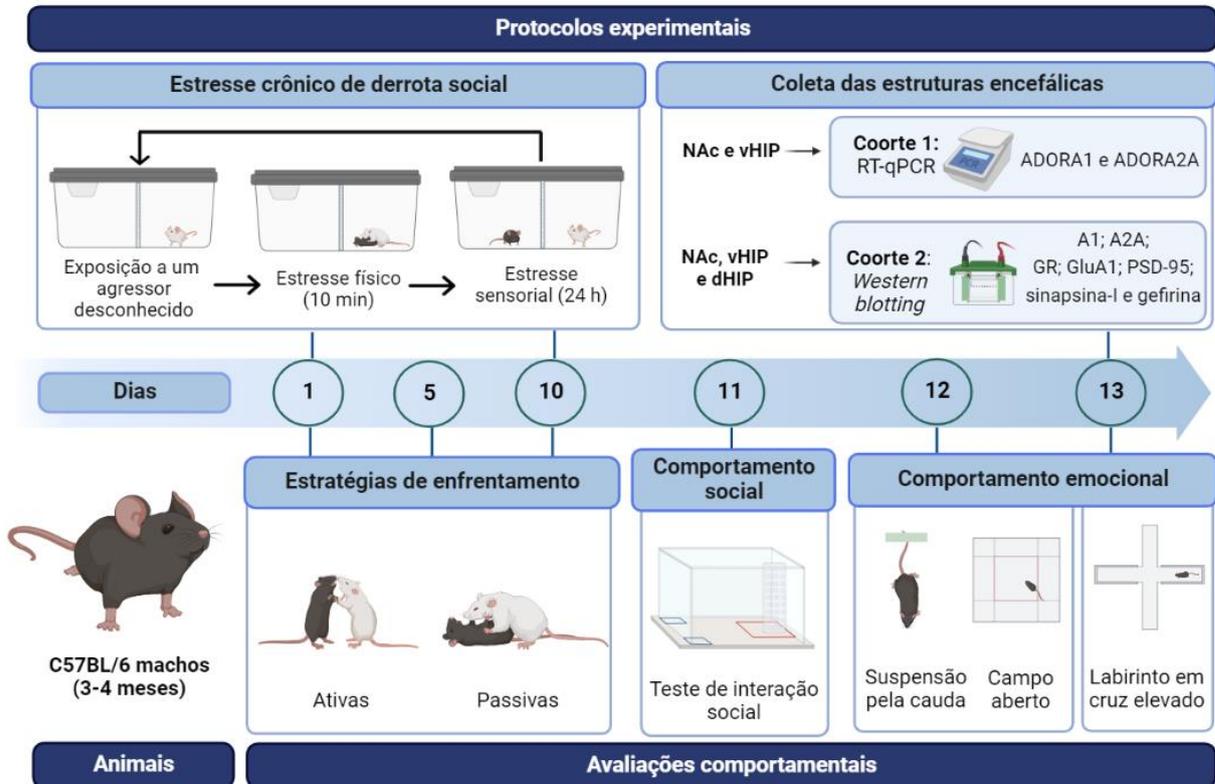
#### 3.1 ANIMAIS

Para camundongos agressores foram utilizados machos da linhagem *Swiss* (4 a 6 meses de idade) fornecidos pelo Biotério Central da Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC). Como animais derrotados foram utilizados camundongos machos C57BL/6 (3 a 4 meses de idade), provenientes de uma colônia mantida pelo Laboratório de Neurociência Translacional (Neuroquímica 1) da UFSC. Ambas as linhagens foram alojadas em grupos de 8 animais no Biotério Setorial do Departamento de Bioquímica da UFSC em caixas de moradia (41 x 34 x 16 cm) sob temperatura de  $21^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ , com ciclo de iluminação claro/escuro de 12/12 h (7 h às 19 h ciclo claro) e livre acesso à ração e água filtrada. Os experimentos foram conduzidos de forma a minimizar o sofrimento dos animais e estão de acordo com a aprovação do Comitê de Ética no Uso de Animais da UFSC (protocolo nº 5290231120). Todas as habilitações necessárias foram realizadas, como a disciplina de manejo de animais para ensaios bioquímicos e treinamentos internos do laboratório para uma boa prática com roedores.

#### 3.2 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL

Camundongos C57BL/6 machos com 3-4 meses de idade foram submetidos por 10 dias consecutivos ao ECDS (Figura 7). Durante o protocolo de estresse, os animais experimentais foram expostos à 10 min de confronto físico e 24h de contato sensorial a camundongos *Swiss* previamente selecionados para agressividade. O peso dos animais e as estratégias de enfrentamento foram avaliadas durante as sessões de confronto físico dos dias 1, 5 e 10 do ECDS. Vinte e quatro horas após o protocolo de estresse foi realizado o teste de interação social (TIS) para determinação de resiliência ou vulnerabilidade ao ECDS. Vinte e quatro horas após, os camundongos foram submetidos aos testes de suspensão pela cauda (TSC), campo aberto (TCA) e labirinto em cruz elevado (LCE) para avaliação do comportamento emocional. Após o último teste comportamental, os animais foram decapitados e as estruturas encefálicas foram dissecadas. O NAc e vHIP coletados da primeira coorte foram conservadas em TRIzol® (Sigma-Aldrich) para avaliação da expressão gênica. As estruturas encefálicas NAc, vHIP e dHIP da segunda coorte foram imediatamente submersas em nitrogênio líquido e armazenadas a  $-80^{\circ}\text{C}$  para as avaliações do imunoconteúdo proteico.

**Figura 7 – Delineamento experimental**



**Figura 7.** Camundongos C57BL/6 machos de 3-4 meses de idade foram submetidos por 10 dias ao ECDS. As sessões de confronto físico dos dias 1, 5 e 10 foram filmadas para posterior análise das estratégias de enfrentamento. Para a avaliação do comportamento social e emocional foram realizados os testes de interação social, suspensão pela cauda, campo aberto e labirinto em cruz elevado. Após os testes comportamentais os animais foram decapitados, as estruturas encefálicas removidas e acondicionadas para avaliações moleculares e bioquímicas. Abreviações: dHIP – hipocampo dorsal; NAc – núcleo accumbens; RT-qPCR – PCR quantitativa em tempo real; vHIP – hipocampo ventral. Fonte: originado a partir de imagens do Biorender; elaborado pela autora.

### 3.3 PROTOCOLO DE ESTRESSE

O ECDS foi promovido com sessões diárias, compostas pela exposição por 10 min de contato físico e 24 h de contato sensorial, por 10 dias consecutivos. As sessões de confronto físico ocorreram na caixa de residência dos animais agressores, a fim de estimular a territorialidade. O camundongo agressor foi substituído nas sessões em que a latência entre os ataques atingiu 2 minutos. Durante o contato sensorial foi inserida uma placa de acrílico perfurada entre os animais para permitir apenas o contato olfativo, auditivo e visual entre o animal derrotado e o agressor.

A efetividade do protocolo de ECDS depende da seleção apropriada dos agressores. Para isso, os camundongos *Swiss* machos foram alojados em caixas individuais (30 x 20 x 13 cm) por no mínimo 1 mês antes da triagem para a seleção de agressividade. A triagem consistiu na exposição dos camundongos *Swiss* a camundongos C57BL/6 machos desconhecidos durante 3 minutos por 3 dias consecutivos. Foram considerados agressivos os animais que apresentaram latência de ataque inferior a 60 s ou promoveram mais de 10 ataques em ao menos dois dias consecutivos, sendo os ataques definidos como uma interação direta agressiva promovida pelo camundongo *Swiss*.

Os animais controle (n = 20) foram mantidos em caixas de residência no Biotério Setorial de Bioquímica (UFSC), pareados entre si e separados por uma placa de acrílico perfurada, permitindo apenas o contato sensorial. Os controles foram rotacionados diariamente, de forma que não foram pareados com os mesmos animais por mais de um dia (GOLDEN *et al.*, 2011).

### 3.4 AVALIAÇÕES COMPORTAMENTAIS

Após a finalização do protocolo de estresse, os camundongos derrotados e controle foram alojados individualmente na sala de comportamento do Laboratório de Neurociência Translacional (BQA/UFSC) para o início dos testes comportamentais. Os testes para avaliação da sociabilidade e emocionalidade foram realizados 24 h após o término do ECDS sob iluminação indireta (30 *lux*). A análise das estratégias de enfrentamento, do teste de suspensão pela cauda e do labirinto em cruz elevado foram feitas manualmente. Já os testes de interação social e campo aberto foram avaliados utilizando o programa ANY-Maze® (Stoelting Co., E.U.A.). Os aparatos foram higienizados com álcool 10% após cada animal ter concluído a tarefa comportamental.

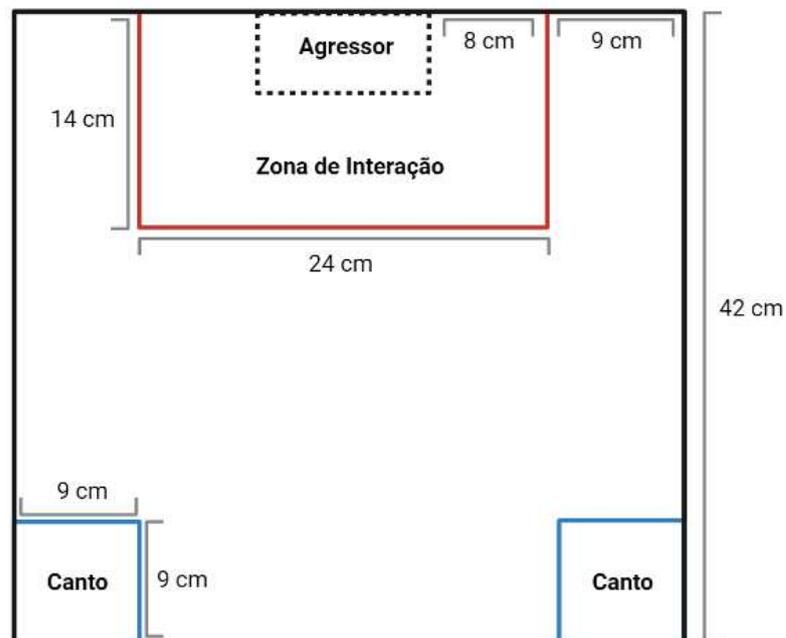
#### 3.4.1 Teste de interação social

O TIS é utilizado para avaliar o comportamento social após o protocolo de ECDS. O TIS se baseia no fato de que os camundongos são naturalmente animais sociais e exploradores. No entanto, os estímulos estressores sociais crônicos podem provocar alterações na sociabilidade. Nesse sentido, os animais são expostos a um dilema, entre explorar o ambiente novo ou aproximar-se de um animal agressor desconhecido.

O aparato utilizado, como demonstrado pela Figura 8, consiste em um campo aberto modificado (42 cm x 42 cm x 42 cm), contendo um cilindro acrílico perfurado em uma de suas paredes. Zonas são delimitadas para avaliar a preferência da permanência do animal nos períodos de teste. A zona próxima à fixação deste cilindro é denominada zona de interação social (ZIS; 24 cm x 14 cm), enquanto as zonas delimitadas na parede oposta são chamadas de zona de canto (9 cm x 9 cm).

O TIS consiste em duas fases. Na primeira, chamada de fase sem alvo, o camundongo experimental pode explorar o aparato livremente por 150 segundos. Após esse período, o animal é retornado à sua caixa de residência, e de forma concomitante, um animal agressor desconhecido é alocado dentro do cilindro acrílico, o qual permite o contato sensorial entre as duas linhagens. A segunda fase, chamada de fase com alvo, é iniciada ao colocar o animal experimental novamente no aparato e permitir que ele explore livremente por mais 150 segundos.

**Figura 8 - Representação do aparato do teste de interação social.**



**Figura 8.** Dimensões do aparato utilizado para o teste de interação social. O aparato consiste em campo aberto modificado com a delimitação da zona de interação e zonas de canto. Fonte: adaptado de Golden *et al.* (2011).

Na avaliação das duas fases do TIS, são observadas a distância percorrida pelo animal e o tempo permanecido em cada zona, o que permite compreender o comportamento do animal diante de um estímulo social. A partir do tempo permanecido na ZI, é calculado o índice de

interação social (IIS), que permite subdividir os animais derrotados. O índice é calculado pela razão entre o tempo total na ZI na fase com alvo e o tempo passado na ZI na fase sem alvo, como descrito na fórmula abaixo.

$$\text{Índice de interação social (IIS)} = \frac{\text{Tempo na ZIS na presença do alvo}}{\text{Tempo na ZIS na ausência do alvo}}$$

Seguindo a premissa de que animais com comportamento social reduzido são mais vulneráveis ao estresse, os animais com índice abaixo de 1, ou seja, que reduziram o tempo na ZI na fase com alvo, foram considerados suscetíveis, enquanto os animais com IIS acima de 1 foram considerados resilientes ao ECDS (GOLDEN *et al.*, 2011).

### **3.4.2 Estratégias de enfrentamento**

As estratégias de enfrentamento são mecanismos comportamentais utilizados para lidar com situações aversivas. No caso do ECDS, podem ser avaliadas observando a resposta do camundongo experimental a um ataque promovido pelo animal agressor. Portanto, durante as sessões de confronto físico dos dias 1, 5 e 10 do ECDS foram avaliadas as estratégias ativas e passivas em resposta aos ataques. Os ataques foram considerados como as interações diretas agressivas do animal agressor para o animal experimental. Já as estratégias ativas foram consideradas como os comportamentos de fuga, evitação ou defesa, e as estratégias passivas foram consideradas imobilidade e postura de submissão. O índice de comportamento ativo foi calculado a partir do total de comportamentos ativos subtraídos pelo total de comportamentos passivos, normalizados para o número total de agressões contabilizadas (LECLAIR *et al.*, 2021).

### **3.4.3 Teste de suspensão pela cauda**

O TSC é um modelo validado para avaliar comportamentos do tipo-depressivo em camundongos e consiste em expor o animal a uma situação inescapável por 6 minutos. A avaliação segue a premissa de que animais submetidos a curtos períodos de estresse inescapável tendem a desenvolver uma postura imóvel, comportamento que aumenta após condições estressoras. Neste caso, o animal é suspenso pela cauda de forma que não consiga escapar ou

se apoiar em alguma superfície. A ausência da tentativa de escape é caracterizada como imobilidade, sendo estabelecido que quanto menor a latência e maior o tempo em imobilidade, maior o indicativo de um comportamento tipo-depressivo (CAN *et al.*, 2011b).

#### **3.4.4 Teste do campo aberto**

Proposto por Hall (1936), o TCA é utilizado para avaliar a atividade locomotora e comportamento do tipo-ansioso em roedores. O aparato consiste em uma caixa de acrílico (42 x 42 x 42 cm) e considera que animais com comportamento tipo-ansioso despendem mais tempo nos cantos do aparato. Os animais foram expostos por 5 min ao campo aberto e foi permitida sua livre exploração. A distância percorrida durante o teste foi usada como parâmetro locomotor, enquanto o número de entradas e o tempo de permanência no centro (21 cm x 21 cm) do aparato foram avaliados como parâmetros de comportamento tipo-ansioso (SEIBENHENER; WOOTEN, 2015).

#### **3.4.5 Teste do labirinto em cruz elevado**

O LCE é amplamente utilizado para acessar comportamento do tipo ansioso. Utilizado inicialmente por Handley e Mithani (1984), e baseado em Montgomery (1955), o teste consiste em expor o animal a um labirinto composto por dois braços abertos (1 cm de altura) e dois braços fechados (30 cm de altura), unidos por uma zona neutra de 10 cm<sup>2</sup>. O teste se baseia na preferência de roedores por ambientes escuros e fechados, e no conflito entre a motivação a explorar ambientes novos e o medo inato de roedores a locais altos e abertos. Em 1985, Pellow e colaboradores validaram o protocolo como um teste para avaliar comportamento do tipo-ansioso, e estabeleceu-se que quanto menor a exploração dos braços abertos, maior o indicativo do comportamento tipo ansioso.

Neste estudo, os animais foram alocados no centro do aparato, sempre voltados para um dos braços abertos, onde puderam explorá-lo por 5 min. Foi mensurado o número de entradas e tempo de permanência do animal com as 4 patas em cada braço e a avaliação de risco, comportamento definido quando o animal exibe uma tendência a entrar no braço aberto e desloca sua cabeça e patas dianteiras para a região desprotegida do aparato, mas mantém seu corpo no braço fechado (WALF; FRYE, 2007).

### 3.5 EXPRESSÃO GÊNICA DOS RECEPTORES A1 E A2A

A fim de determinar a expressão de RNA mensageiro (mRNA) dos receptores A1 (gene ADORA1) e A2A (gene ADORA2A), foi realizado o ensaio de reação em cadeia da polimerase tempo real (RT-qPCR). Os camundongos foram decapitados 1h após o final dos testes comportamentais. O NAc e o vHIP foram dissecados e mantidos em 1 mL do reagente TRIzol® (Sigma- Aldrich). As amostras foram imediatamente homogeneizadas com o auxílio de pistilos estéreis e centrifugadas a 12.000 x g por 10 min a 4°C. O sobrenadante foi conservado a -20°C até a extração do RNA total.

#### 3.5.1 Extração do RNA total e síntese do DNA complementar

A extração do RNA iniciou com a adição de 200 µL de clorofórmio a fim de separar fase aquosa do RNA total, a qual foi transferida para um novo micro tubo. A precipitação foi feita com isopropanol (1:1 v) e as lavagens com etanol 75%. Em seguida, as amostras foram novamente precipitadas com isopropanol (1:1 v) e acetato de sódio (3M, pH 5,5). A quantificação e pureza das amostras foi determinada por espectrofotometria utilizando o NanoVue Plus™ (Biochrom®), sendo selecionadas apenas as amostras com razão acima de 1,8 para ambos os parâmetros. Em sequência, a integridade do material foi avaliada por eletroforese em gel de agarose 0,8%, corado em brometo de etídio e visualizada por fluorescência UV. Por fim, a síntese do DNA complementar (cDNA) foi realizada em reações de 20 µL, contendo 1 µg de RNA total e 4 µL da enzima qScript® cDNA SuperMix (QuantaBio®). As amostras foram incubadas no termociclador MiniAmp Thermal Cycler (Thermofisher®) por 5 min a 25°C, aquecidas por 30 min a 42°C, e em seguida, aquecidas por 5 min a 85°C. O cDNA foi armazenado à -20°C para a realização da PCR em tempo real.

#### 3.5.2 PCR quantitativa em tempo real

A expressão dos genes ADORA1 e ADORA2A foi analisada por RT-qPCR. O cDNA foi amplificado em duplicata utilizando o kit TaqMan™ Fast Advanced MasterMix, com

sondas TaqMan Gene Expression específicas para camundongos e marcação 3'quencher FAM para os genes ADORA1 (Mm0138023\_m1; NM\_001039510.2) e ADORA2A (Mm00802075\_m1; NM\_009630), e VIC para o GAPDH (Gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase; Mm99999915\_g1; NM\_008084), utilizado como controle endógeno. O ensaio foi realizado em uma placa de reação óptica de 96 poços, com o sistema StepOnePlus™ Real-Time PCR Systems (Applied Biosystems®). Cada reação conteve o volume final de 20 µL, sendo: 2 µL de cDNA (100ng/µl), 10 µL de TaqMan™ Fast Advanced MasterMix (2X), 6,0 µL de H<sub>2</sub>O DNase/RNase-free, 1 µL de TaqMan Gene Expression GAPDH e 1 µL de TaqMan Gene Expression do gene de alvo (ADORA1 ou ADORA2A). As condições de amplificação dos fragmentos de interesse iniciaram com uma incubação a 50°C por 2 min, seguido da ativação da polimerase a 95°C por 20 s, e de 40 ciclos de PCR com desnaturação a 95°C por 1 s e hibridização e extensão a 60°C por 20 s. Os produtos amplificados foram analisados através da fluorescência emitida em tempo real. O  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  Cycle foi calculado e os resultados submetidos à análise estatística.

### 3.6 IMUNODETECÇÃO DE PROTEÍNAS POR WESTERN BLOTTING

#### 3.6.1 Preparação das amostras

Para a detecção do imunoconteúdo das proteínas alvo foram preparadas amostras de membranas totais de NAc, dHIP e vHIP da primeira coorte. As estruturas foram homogeneizadas mecanicamente em 300 uL tampão RIPA (do inglês *Radio Immuno Precipitation Assay Buffer*, contendo Tris 50mM, NaCl 150mM, Triton X-100 1%, deoxicolato de sódio 0,5%, SDS 0,1%, EDTA 5mM, PMSF 1mM, NaF 5mM, Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub> 1mM e coquetel inibidor de proteases). O homogenato foi centrifugado (12000 x g por 20 min a 4°C) para o assentamento dos debris celulares e alíquotas de 50 uL foram retiradas para a quantificação das proteínas totais. Foi então acrescentado 250 uL de solução *Laemmli 2x* (Tris-HCl 0,125M, SDS 4%, 2-mercaptoetanol 10%, glicerol 20%, azul de bromofenol 0,004%) para a quebra das ligações não-covalentes, pontes dissulfeto, adição de carga aniônica das proteínas e aumento da densidade da amostra. Por fim, o homogenato foi aquecido por 10 min a 70°C para a desnaturação físico-química das proteínas e armazenado à -20°C para posterior eletroforese.

### 3.6.2 Dosagem de proteínas

A concentração das proteínas totais foi determinada pelo método colorimétrico de Lowry (1951). A coloração resultante da redução formada pela interação entre o reagente Folin-Ciocalteu's (molibdato, tungstato e ácido fosfórico) com as cadeias laterais de aminoácidos que formam proteínas, quando na presença do catalisador Cobre II ( $\text{Cu}^{2+}$ ), produz uma coloração azul de absorção máxima de 750 nm, a qual foi verificada por espectrofotometria com a Multileitora Infinite M200 TECAN® (LAMEB/UFSC). Para a determinação da curva padrão, foi utilizada a proteína albumina de soro bovino (BSA).

### 3.6.3 Eletroforese e imunodeteção

As amostras (60  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$  de proteína) e o padrão de peso molecular (Precision Plus Protein™ Kaleidoscope™/Bio-Rad®) foram migrados por eletroforese em gel de poliacrilamida 10% SDS-PAGE. Após a migração, as proteínas foram transferidas para membranas de nitrocelulose com um equipamento *Semy-dry* (1,2mA/cm<sup>2</sup> por 90 min). Para confirmar a eficiência da corrida e transferência, foi realizada a coloração com Ponceau 0,5%. Após 5 min as membranas foram lavadas com ácido acético 1% e água ultrapura para a retirada do corante.

Para a etapa de imunodeteção, as membranas foram incubadas por 1 h com albumina de soro bovino (BSA) 5% diluída em TBS (Tris 10mM, NaCl 150 mM, pH 7,5) a fim de bloquear ligações inespecíficas. Após três lavagens com TBS-T (Tween-20 1% em TBS), foi realizada a incubação *overnight* a 4°C com os anticorpos primários diluídos em BSA 2% em TBS-T, como especificado na Tabela 1. Para a detecção dos complexos imunes, as membranas foram lavadas com TBS-T e incubadas por 1 h a temperatura ambiente com os anticorpos secundários específicos conjugados com peroxidase. Após mais três lavagens com TBS-T e duas lavagens com TBS, as membranas foram reveladas com o kit super ECL (GE Healthcare®) no equipamento *Chemi-doc* (Bio-Rad®/LAMEB/UFSC). A imunorreatividade das bandas foi analisada pela quimiluminescência a partir da razão da densidade óptica (D.O.) das proteínas alvo pela D.O. da  $\beta$ -actina, utilizada como controle endógeno. Os resultados foram expressos como porcentagem em relação ao controle.

**Tabela 1. Especificações dos anticorpos**

<b>Anticorpo</b>	<b>Peso molecular</b>	<b>Fabricante/Código do produto</b>	<b>Titulação</b>
A1	37 kDa	Invitrogen #MA5-38140	1:1.000
A2A	45 kDa	Santa Cruz #7F6-G5-A2	1:500
$\beta$ -actina	45 kDa	Cell-Signaling #8H10D10	1:4.000
Gefirina	90 kDa	Invitrogen #PA5-29036	1:1.000
GluA1	100 kDa	Cell-Signaling #13185	1:1.000
GR	95 kDa	Santa Cruz #sc-1002	1:1.000
PSD-95	95 kDa	Cell-Signaling #7E3	1:1.000
Sinapsina-I	77 kDa	Cell-Signaling #D12G5	1:1.000
Goat anti-mouse	-	Sigma-Aldrich #AP308P	1:10.000
Goat anti-rabbit	-	Invitrogen #31460	1:10.000
Rabbit anti-goat	-	Invitrogen #31466	1:10.000

### 3.7 ANÁLISE ESTATÍSTICA

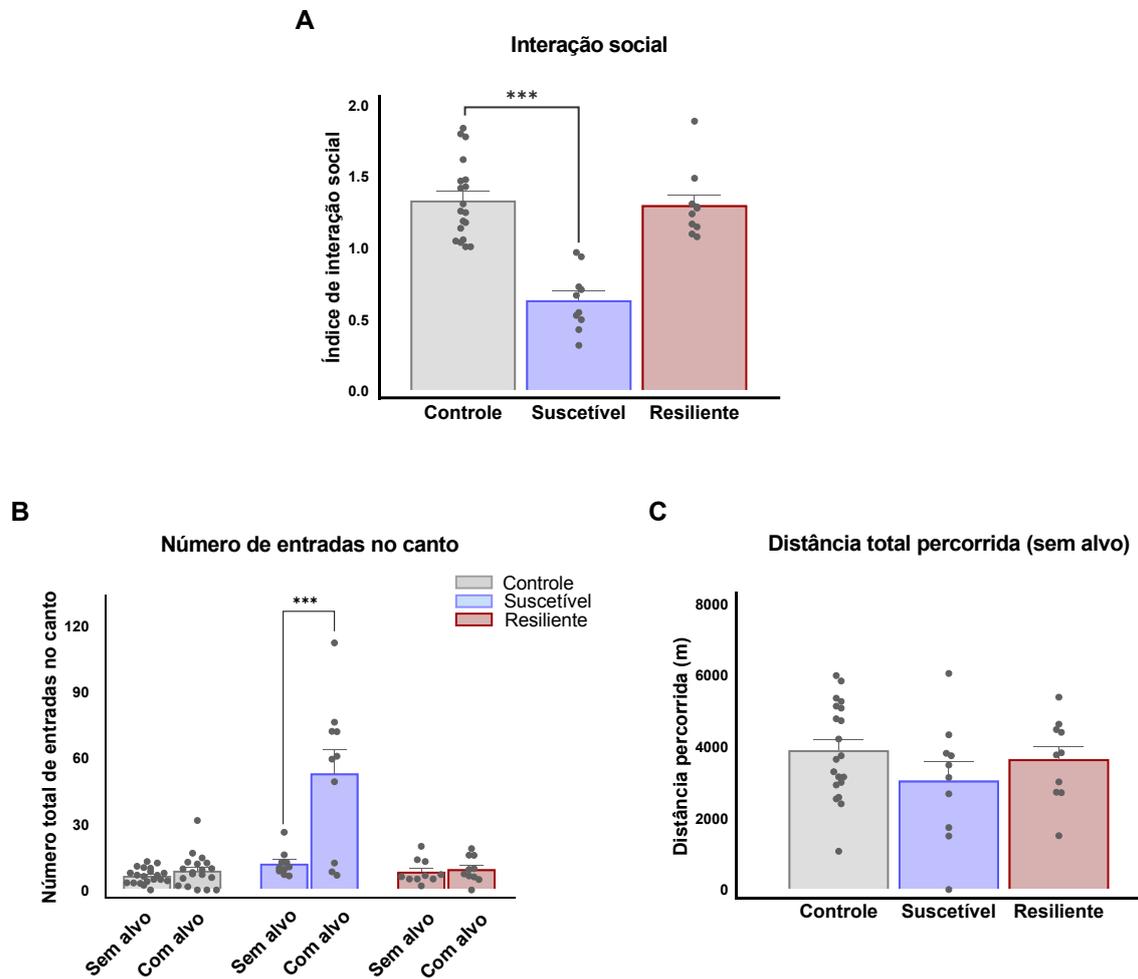
Os valores *outliers* foram identificados utilizando o teste de Grubbs, com o auxílio da ferramenta GraphPad QuickCalcs<sup>®</sup>. Para as análises estatísticas, foi utilizado o *software* GraphPad Prism 8<sup>®</sup>, e a distribuição dos dados foi avaliada pelo teste Shapiro-Wilk. Para os dados com distribuição normal, foi utilizado o teste análise de variância (ANOVA) de medidas repetidas (estratégias de enfretoamento e total de ataques) ou a ANOVA de uma via seguida pelo *post-hoc* de Tukey (para os parâmetros de ganho de peso, comportamento social e emocional, expressão gênica e imunoconteúdo proteico). Para os dados não paramétricos, foi utilizado o teste de Kruskal-Wallis, seguido pelo *post-hoc* de Dunn quando aplicável. Os resultados foram expressos como média  $\pm$  erro padrão da média (EPM) e valores de  $p < 0,05$  foram considerados significativos.

## 4 RESULTADOS

### 4.1 EFEITO DO ECDS NO COMPORTAMENTO SOCIAL E ESTRATÉGIAS DE ENFRENTAMENTO

Para subdividir o grupo de animais estressados com base na alteração da sociabilidade, foi utilizado o IIS, calculado através da razão entre o tempo de permanência na ZIS na presença do alvo, pelo tempo na ZIS na ausência do alvo no TIS. Foi possível observar 10 animais que mantiveram um comportamento social similar ao do controle, com o IIS acima de 1, sendo designados a compor o grupo resiliente. Por outro lado, 10 animais estressados tiveram IIS abaixo de 1, compondo o grupo suscetível. Assim, como demonstrado pela Figura 9.A, os animais considerados suscetíveis apresentaram uma redução na sociabilidade [ $H(3) = 21,75$ ;  $p < 0,0001$ ] e os animais considerados resilientes apresentaram IIS semelhante aos animais do grupo controle. De forma complementar aos resultados observados no IIS, o tempo total de permanência nos cantos (Figura 9.B) na presença do alvo durante o TIS aumentou exclusivamente nos animais suscetíveis ao ECDS [ $H(6) = 20,57$ ;  $p = 0,001$ ]. A atividade locomotora durante o TIS, avaliada pela distância percorrida na ausência do alvo social (Figura 9.C), não apresentou alterações em nenhum dos grupos estressados [ $F(2,37) = 1,245$ ;  $p = 0,299$ ].

**Figura 9. Efeito do ECDS no comportamento social**

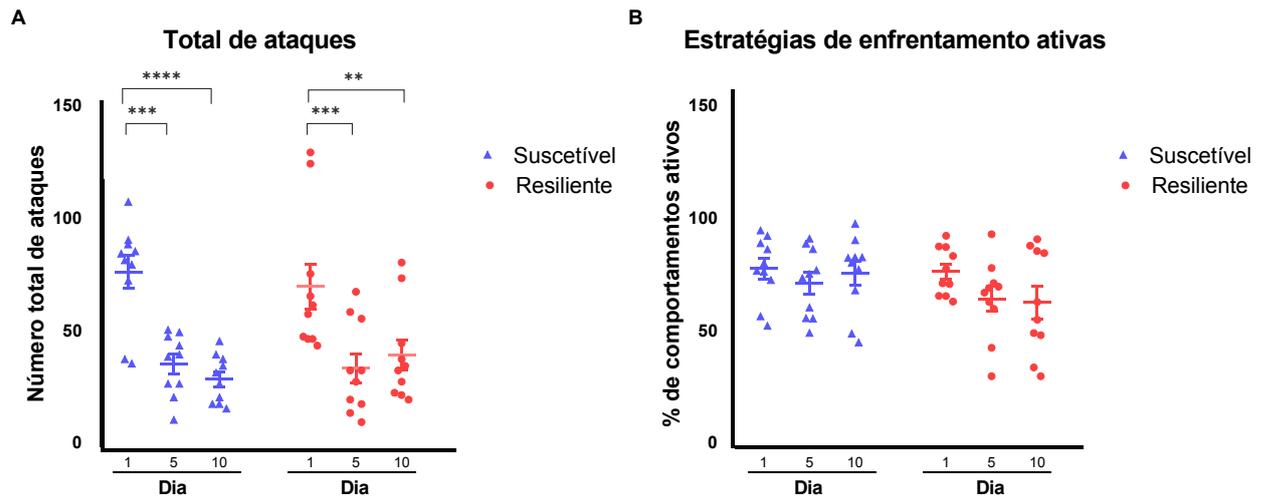


**Figura 9.** Efeito do ECDS no índice de interação social (A), no número de entradas na zona e canto (B) e na distância total percorrida na ausência o animal agressor (C). Os valores estão expressos como média  $\pm$  EPM. Resultados avaliados pela ANOVA de uma via (distância total percorrida) e pelo teste de Kruskal-Wallis, seguido *pelo post-hoc* de Dunn (IIS e número de entradas nos cantos). \*\*  $p = 0,003$  \*\*\*  $p < 0,0005$ . Controle  $n = 20$ ; Suscetível  $n = 10$ ; Resiliente  $n = 10$ .

Com relação ao número de ataques executados pelos agressores (Figura 10.A), ambos os grupos apresentaram redução a partir do dia 5 do ECDS [Fator de tempo;  $F(2, 36) = 25,97$ ;  $p < 0,0001$ ]. No entanto, não houve diferença no número de ataques observados entre os animais resilientes e suscetíveis [Fator coluna;  $F(2, 36) = 0,696$ ;  $p = 0,505$ ]. Para avaliar as estratégias de enfrentamento foram analisados os comportamentos passivos e ativos durante os 10 min de confronto físico dos dias 1, 5 e 10 do ECDS. A Figura 10.B ilustra o índice de enfrentamento ativo, caracterizado pela exibição de comportamentos de fuga, evitação ou defesa, normalizado

pelo número total de ataques. Não houve alteração nas estratégias de enfrentamento entre os grupos experimentais [Fator coluna;  $F(18,36) = 1,151$ ;  $p = 0,142$ ], nem ao longo do protocolo [Fator de tempo;  $F(2,36) = 2,095$ ;  $p = 0,137$ ].

**Figura 10. Número de ataques realizados pelos animais agressores e o efeito do ECDS nas estratégias de enfrentamento**

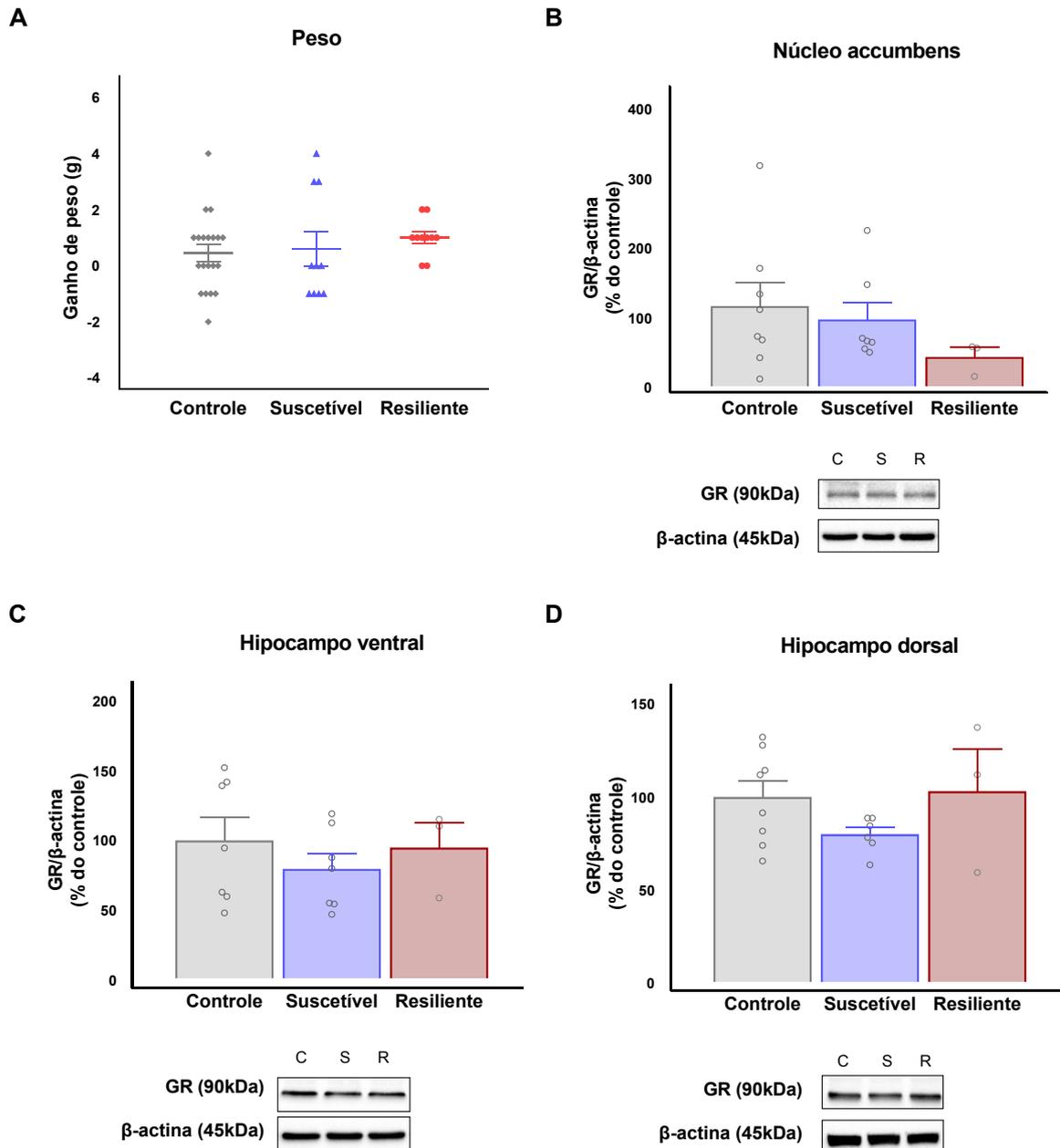


**Figura 10.** Número total de ataques dos animais agressores durante as sessões de confronto físico dos dias 1, 5 e 10 do ECDS (A). Efeito do ECDS nas estratégias de enfrentamento ativas, avaliadas pelos comportamentos de fuga, evitação ou defesa, calculado pela ANOVA de medidas repetidas. Os valores estão expressos como média  $\pm$  EPM. (B). \*\*  $p < 0,01$  \*\*\*  $p < 0,001$ ; \*\*\*\*  $p < 0,0001$ , Controle  $n = 20$ ; Suscetível  $n = 10$ ; Resiliente  $n = 10$ .

#### 4.2 EFEITO DO ESTRESSE SOBRE O GANHO DE PESO E DENSIDADE DE RECEPTORES DE GLICOCORTICOIDES (GRS)

Parâmetros fisiológicos associados ao estresse foram avaliados nos animais controle, resilientes e suscetíveis. O ganho de peso dos animais foi avaliado a partir do peso observado no dia da eutanásia, subtraído pelo peso observado no dia 1 de ECDS. Como ilustra a Figura 11.A, os animais controle, resilientes e suscetíveis não apresentaram diferenças no ganho de peso [ $F(2, 37) = 0,510$ ;  $p = 0,028$ ]. Além disso, a densidade de GRs (95 kDa) foi quantificada em animais controle, resilientes e suscetíveis ao ECDS, como um indicativo de impacto no eixo HHA. Não foram observadas alterações nos níveis de GRs após o ECDS no NAc [ $H(3) = 2,694$ ;  $p = 0,272$ ], no vHIP [ $F(2, 14) = 0,568$ ;  $p = 0,579$ ], e no dHIP [ $F(2, 14) = 1,1489$ ;  $p = 0,175$ ], como demonstrado pelas Figuras 11.B, 11.C e 11.D, respectivamente.

**Figura 11.** Avaliação de parâmetros associados ao estresse nos animais controle e submetidos ao ECDS



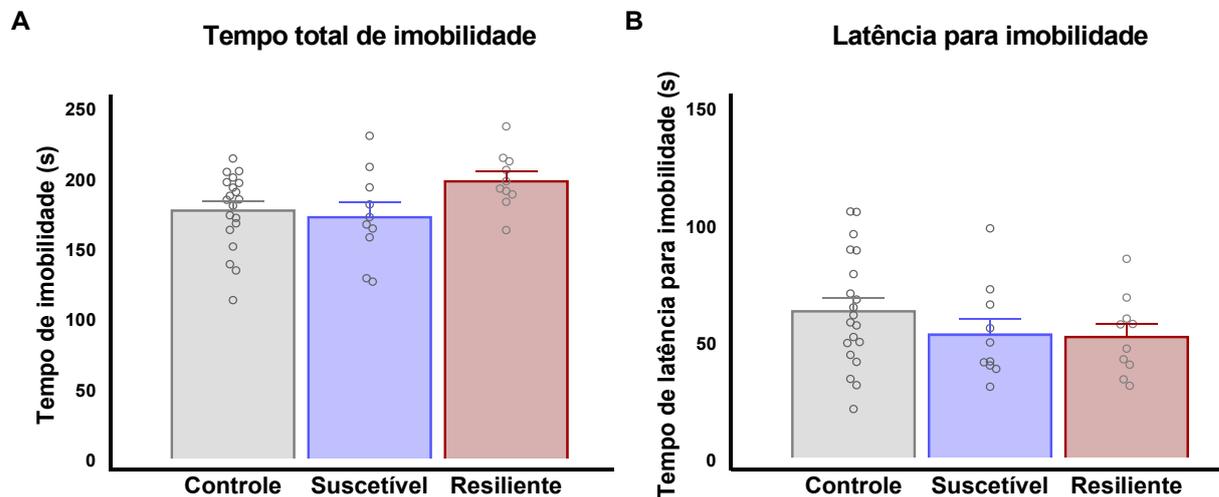
**Figura 11.** Efeito do ECDS sobre o ganho de peso (A); Controle n = 20; Suscetível n = 10; Resiliente n = 10. Efeito do ECDS no imunocnteuído de GR do NAc (B), vHIP (C) e dHIP (D). A quantificação foi realizada com a normalização da D.O. da banda de interesse pela banda de β-actina correspondente. Os resultados dos níveis de GR foram calculados pela ANOVA de uma via (vHIP, dHIP) e pelo teste de Kruskal-Wallis (NAc) e estão expressos como porcentagem do controle ± EPM (n = 3 a 8). Abreviações: C – controle; S – Suscetível; R – Resiliente.

### 4.3 EFEITO DO ECDS NO COMPORTAMENTO EMOCIONAL

#### 4.3.1 Avaliação do comportamento tipo-depressivo

O TSC foi utilizado para avaliar alterações nos parâmetros relacionados ao comportamento tipo depressivo. Como ilustrado pelas Figuras 12.A e 12.B, não houve alteração no tempo total [F(2, 37) = 2,752; p = 0,076] e na latência para a imobilidade [F(2, 37) = 1,165; p = 0,323].

**Figura 12.** Efeito do ECDS no comportamento do tipo-depressivo no TSC



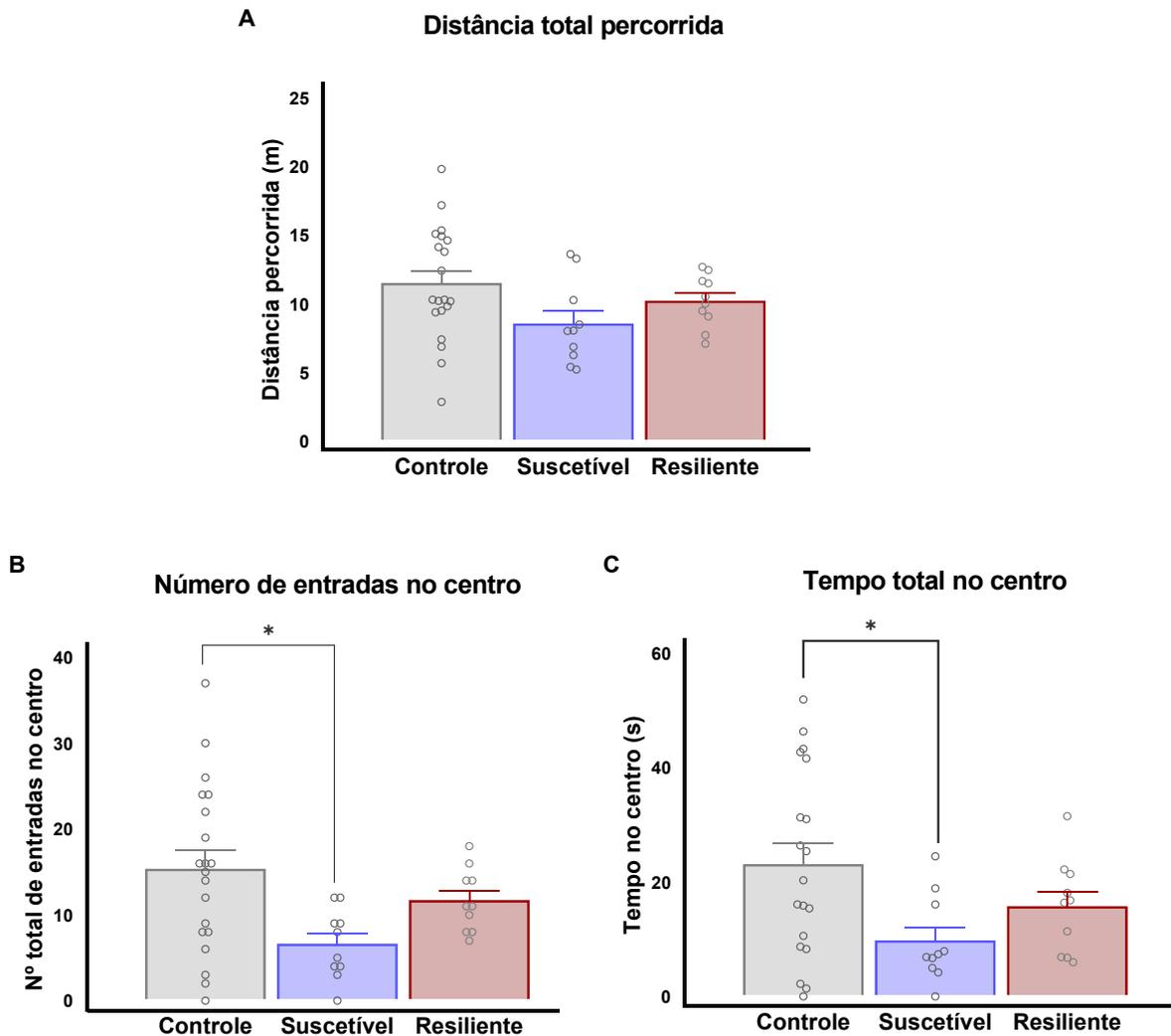
**Figura 12.** Avaliação dos parâmetros emocionais de tempo de imobilidade (A) e tempo de latência para a imobilidade (B) no TSC. Os resultados foram avaliados pela ANOVA de uma via e estão expressos como média ± EPM. Controle n = 20; Suscetível n = 10; Resiliente n = 10.

#### 4.3.2 Avaliação da atividade locomotora e comportamento tipo-ansioso

Com intuito de compreender os efeitos do ECDS em parâmetros locomotores em comportamentos emocionais associados à ansiedade foi realizado o TCA (Figura 13) e o LCE (Figura 14). A Figura 13.A demonstra que não houve alteração na atividade locomotora dos animais resilientes ou suscetíveis ao ECDS, avaliado pela distância percorrida durante o TCA [F(2,37) = 2,447; p = 0,100]. Quanto aos parâmetros utilizados para avaliar a emocionalidade relacionada ao comportamento do tipo-ansioso no TCA, apenas os animais suscetíveis

apresentaram uma redução no número de entradas (Figura 13.B) [ $F(2, 37) = 4,560$ ;  $p = 0,017$ ] e o tempo de permanência [ $F(2,36) = 3,690$ ;  $p = 0,034$ ] na zona central do TCA (Figura 13.C).

**Figura 13. Efeito do ECDS na atividade locomotora e em parâmetros associados à ansiedade no TCA**

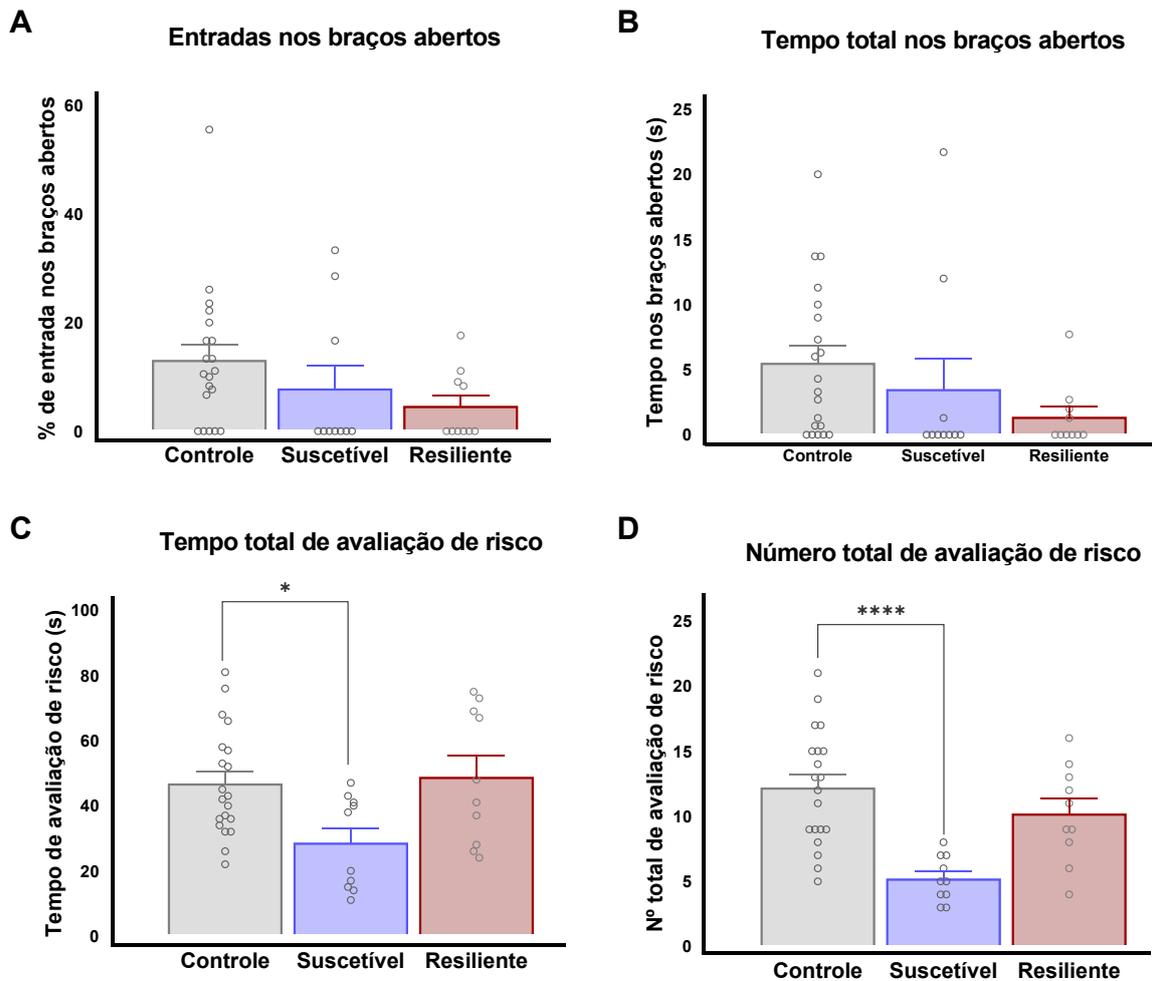


**Figura 13.** Avaliação do parâmetro locomotor distância percorrida (A) e dos parâmetros emocionais de número de entradas no centro (B) e tempo total de permanência no centro do TCA (C). Os valores estão expressos como média  $\pm$  EPM. \*  $p < 0,05$  calculado pela ANOVA de uma via, seguido pelo *post-hoc* de Tukey. Controle  $n = 20$ ; Suscetível  $n = 10$ ; Resiliente  $n = 10$ .

As Figuras 14.A e 14.B ilustram que o ECDS não alterou a exploração dos braços abertos, parâmetro avaliado pelo número de entradas [ $H(3) = 4,544$ ;  $p = 0,103$ ] e tempo de permanência [ $H(3) = 5,826$ ;  $p = 0,054$ ] na região desprotegida do aparato. Contudo, o número

[ $F(2, 37) = 11,51$ ;  $p = 0,0001$ ] e o tempo total de exibição do comportamento de avaliação de risco [ $H(3) = 6,198$ ;  $p = 0,045$ ] diminuiu nos animais suscetíveis ao ECDS, como demonstrado nas Figuras 14.C e 14.D, respectivamente.

**Figura 14.** Efeito do ECDS em parâmetros associados à ansiedade no LCE



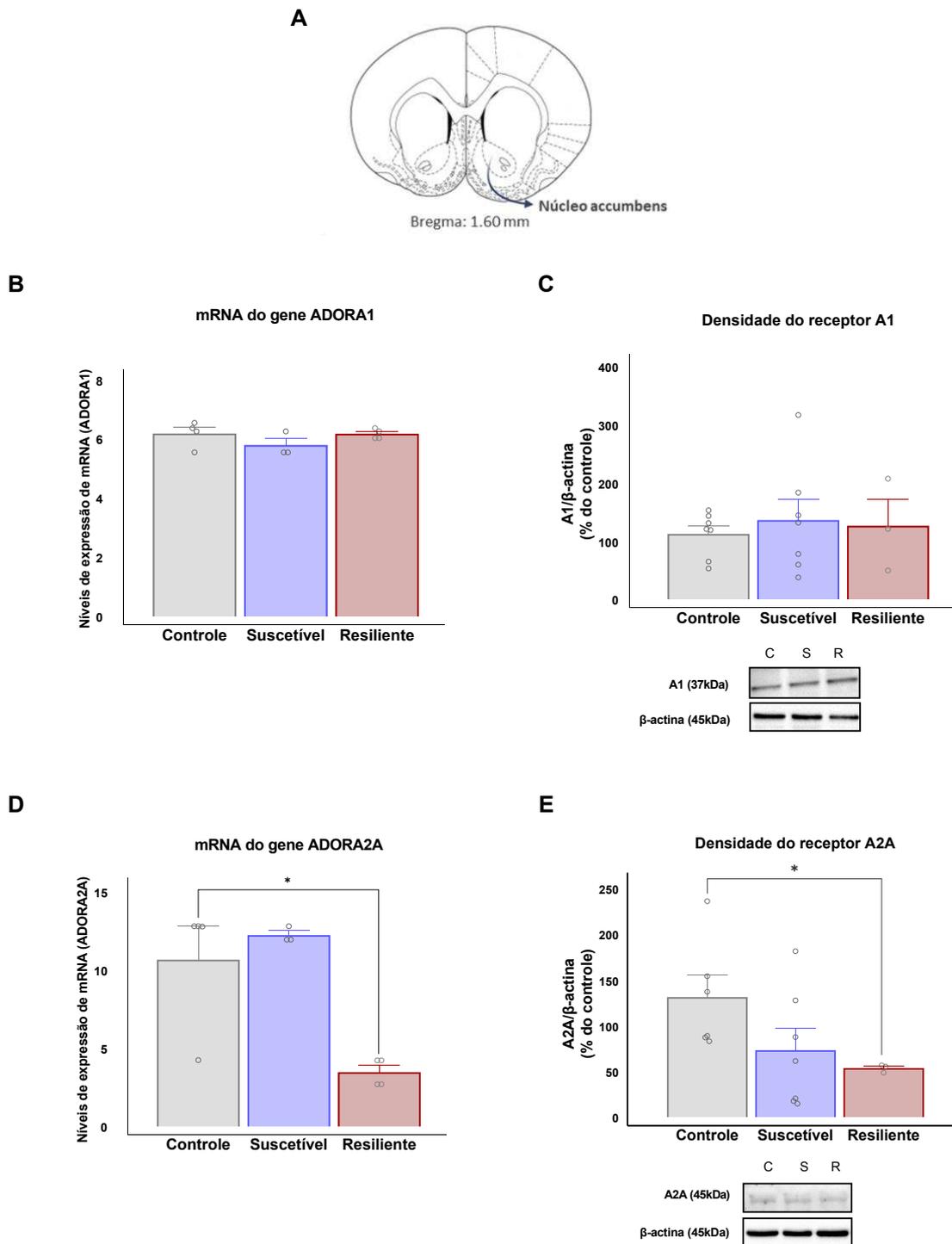
**Figura 14.** Efeito do ECDS nos parâmetros emocionais de número de entradas (A) e tempo de permanência nos braços abertos (B) no teste do LCE. Em relação à avaliação de risco, foram avaliados o tempo de permanência total (C) e a frequência de exibição do comportamento (D). Os resultados foram calculados pela ANOVA de uma via, seguido pelo *post-hoc* de Tukey (número total de avaliação de risco) e teste de Kruskal-Wallis, seguido pelo *post-hoc* de Dunn (exploração dos braços abertos e tempo de avaliação de risco). Os resultados estão expressos como média ± EPM. \*  $p = 0,045$ ; \*\*\*\*  $p = 0,0001$ . Controle  $n = 20$ ; Suscetível  $n = 10$ ; Resiliente  $n = 10$ .

#### 4.4 EFEITO DO ECDS NA EXPRESSÃO E DENSIDADE DOS RECEPTORES DE ADENOSINA A1 E A2A

##### 4.4.1 Núcleo accumbens

Como demonstrado pela Figura 15.A, a expressão de mRNA do gene ADORA1 não apresentou diferenças no NAc de animais suscetíveis e resilientes ao ECDS [ $F(2, 8) = 1,33$ ;  $p = 0,316$ ]. Além disso, a densidade de receptores de adenosina A1 permaneceu similar entre os grupos experimentais [ $F(2, 14) = 0,185$ ;  $p = 0,832$ ], como ilustrado pela Figura 15.B. Quando avaliado o gene ADORA2A no NAc (Figura 15.C), apenas os animais resilientes apresentaram uma redução na expressão de mRNA [ $H(3, 11) = 7,28$ ;  $p = 0,01$ ]. De forma similar, os níveis do receptor A2A (Figura 15.D) [ $F(2, 12) = 9,299$ ;  $p = 0,003$ ] foram reduzidos no NAc de animais resilientes. Assim, podemos destacar que os animais resilientes ao ECDS apresentaram níveis reduzidos do receptor A2A de adenosina no NAc.

**Figura 15.** Efeito do ECDS na expressão de mRNA e níveis proteicos dos receptores A1 e A2A de adenosina no NAc



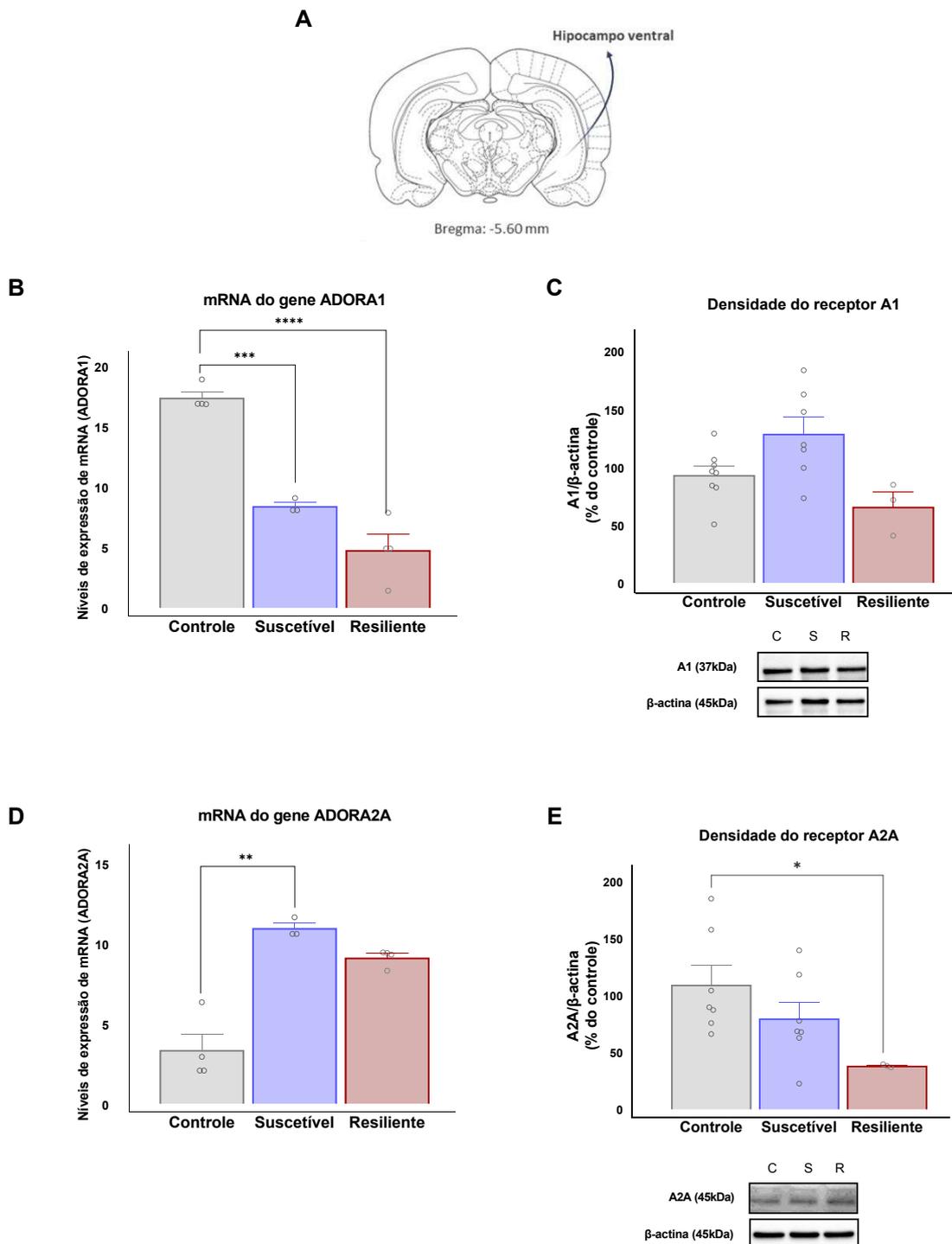
**Figura 15.** Representação do eixo coronal do encéfalo de roedores, com destaque para o NAc (A). Avaliação da expressão de mRNA (B) e dos níveis proteicos (C) dos receptores de adenosina A1. Expressão de mRNA (D) e nos níveis proteicos do receptor de adenosina A2A (E) no NAc de animais controle, suscetíveis, resilientes ao ECDS. Os dados foram analisados pela ANOVA de uma via, seguido

pelo *post-hoc* de Tukey (gene ADORA1, níveis proteicos dos receptores A1 e A2A) e pelo Teste de Kruskal-Wallis, seguido pelo *post-hoc* de Dunn (gene ADORA2A). Os resultados da expressão de mRNA foram normalizados pelos níveis de GAPDH correspondentes e calculados a partir do  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  Cycle. A quantificação proteica foi normalizada pela banda de  $\beta$ -actina correspondente. Os dados estão expressos como média  $\pm$  EPM. Abreviações: C – controle; S – Suscetível; R – Resiliente. (n = 3-4 para avaliação de mRNA; n = 3 a 8 para avaliação proteica). \*p < 0,05.

#### 4.4.2 Hipocampo ventral

A sub-região ventral do HIP apresentou aumento na expressão de mRNA do gene ADORA1 (Figura 16.A) tanto no grupo suscetível, quanto no resiliente ao ECDS [F (2, 8) = 59,40; p < 0,0001]. Por outro lado, não foram observadas alterações no imunoconteúdo proteico dos receptores A1 [F(2, 15) = 5,383; p = 0,324], como ilustrado pela Figura 16.B. O mRNA do gene ADORA2A (Figura 16.C) apresentou um aumento no vHIP de animais suscetíveis [H (3, 11) = 9,15; p = 0,0005]. Contudo, os níveis proteicos dos receptores adenosinérgicos A2A (Figura 16.D) foram reduzidos nos animais resilientes ao ECDS [F(2, 14) = 3,672; p = 0,048].

**Figura 16.** Expressão de mRNA dos receptores A1 e A2A e níveis proteicos no vHIP após o ECDS



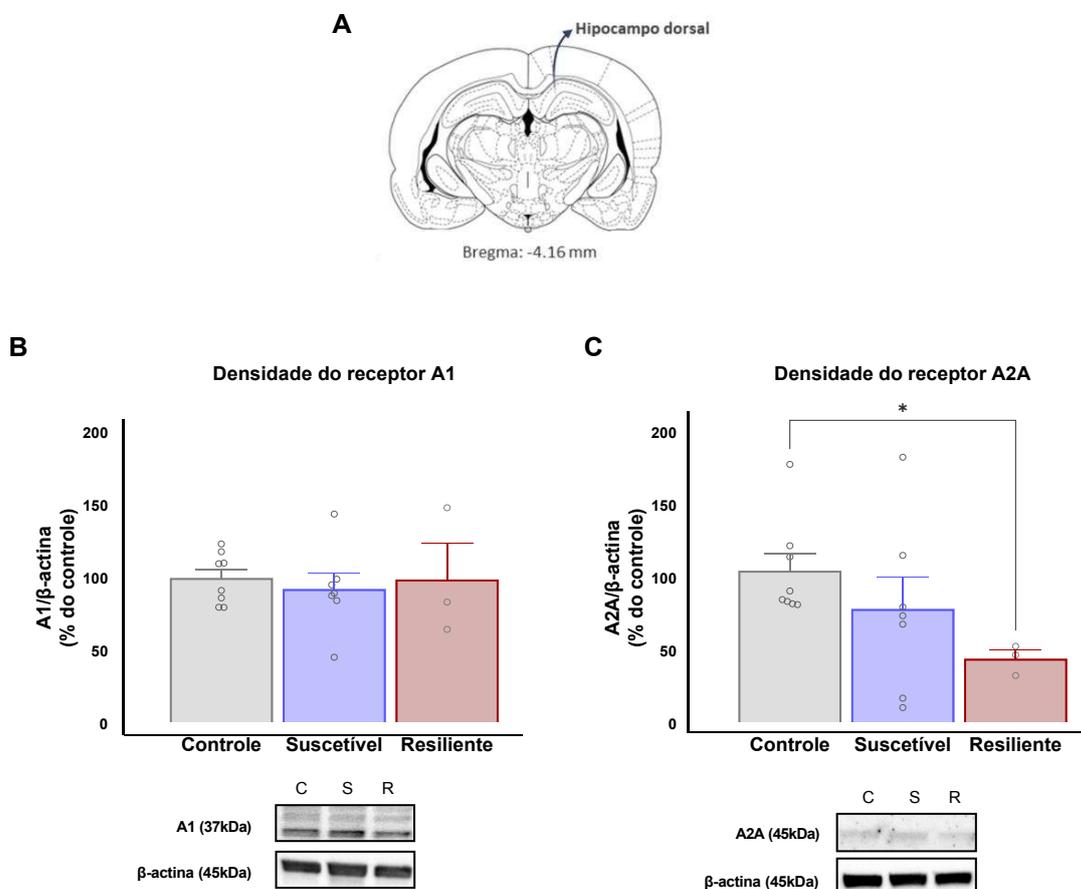
**Figura 16.** Representação do eixo coronal do encéfalo de roedores, com destaque para o vHIP (A). Avaliação da expressão de mRNA (B) e dos níveis proteicos (C) dos receptores de adenosina A1. Expressão de mRNA (D) e nos níveis proteicos do receptor A2A (E) no NAc de animais controle, suscetíveis, resilientes ao ECDS. Os dados foram analisados pela ANOVA de uma via, seguido pelo *post-hoc* de Tukey (gene ADORA1, níveis proteicos dos receptores A1 e A2A) e pelo Teste de Kruskal-

Wallis, seguido pelo *post-hoc* de Dunn (gene ADORA2A). Os resultados da expressão de mRNA foram normalizados pelos níveis de GAPDH correspondentes e calculados a partir do  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  Cycle. A quantificação proteica foi normalizada pela banda de  $\beta$ -actina correspondente. Os dados estão expressos como média  $\pm$  EPM. \*  $p = 0,04$ ; \*\*  $p = 0,008$ ; \*\*\*  $p = 0,0003$ ; \*\*\*\*  $p < 0,0001$ . Abreviações: C – controle; S – Suscetível; R – Resiliente. (n = 3-4 para avaliação de mRNA; n = 3 a 8 para avaliação proteica).

#### 4.4.3 Hipocampo dorsal

Como ilustra a Figura 17.B, não foram encontradas diferenças no imunoconteúdo dos receptores A1 no dHIP de animais controle, suscetíveis e resilientes [ $F(2, 15) = 0,157$ ;  $p = 0,855$ ]. Contudo, nos animais resilientes ao ECDS, o imunoconteúdo dos receptores A2A do dHIP (Figura 17.C) foi significativamente reduzido quando comparado aos animais controle [ $H(3) = 6,602$ ;  $p = 0,027$ ].

**Figura 17. Avaliação da densidade dos receptores A2A no dHIP de animais submetidos ao ECDS**



**Figura 17.** Representação do eixo coronal do encéfalo de roedores, com destaque para o dHIP (A). Avaliação do imunoconteúdo dos receptores A1 (B) e A2A (C) no dHIP. A quantificação foi realizada com a normalização da D.O. da banda de interesse pela banda de  $\beta$ -actina correspondente. Os resultados foram calculados pela ANOVA de uma via (receptor A1) e teste de Kruskal-Wallis seguido pelo *post-hoc* de Dunn (receptor A2A). Os valores estão expressos como porcentagem do controle  $\pm$  EPM. \*  $p = 0,027$  ( $n = 3$  a  $8$ ). Abreviações: C – controle; S – Suscetível; R – Resiliente.

#### 4.5 EFEITO DO ECDS NO IMUNOCONTEÚDO DE PROTEÍNAS SINÁPTICAS

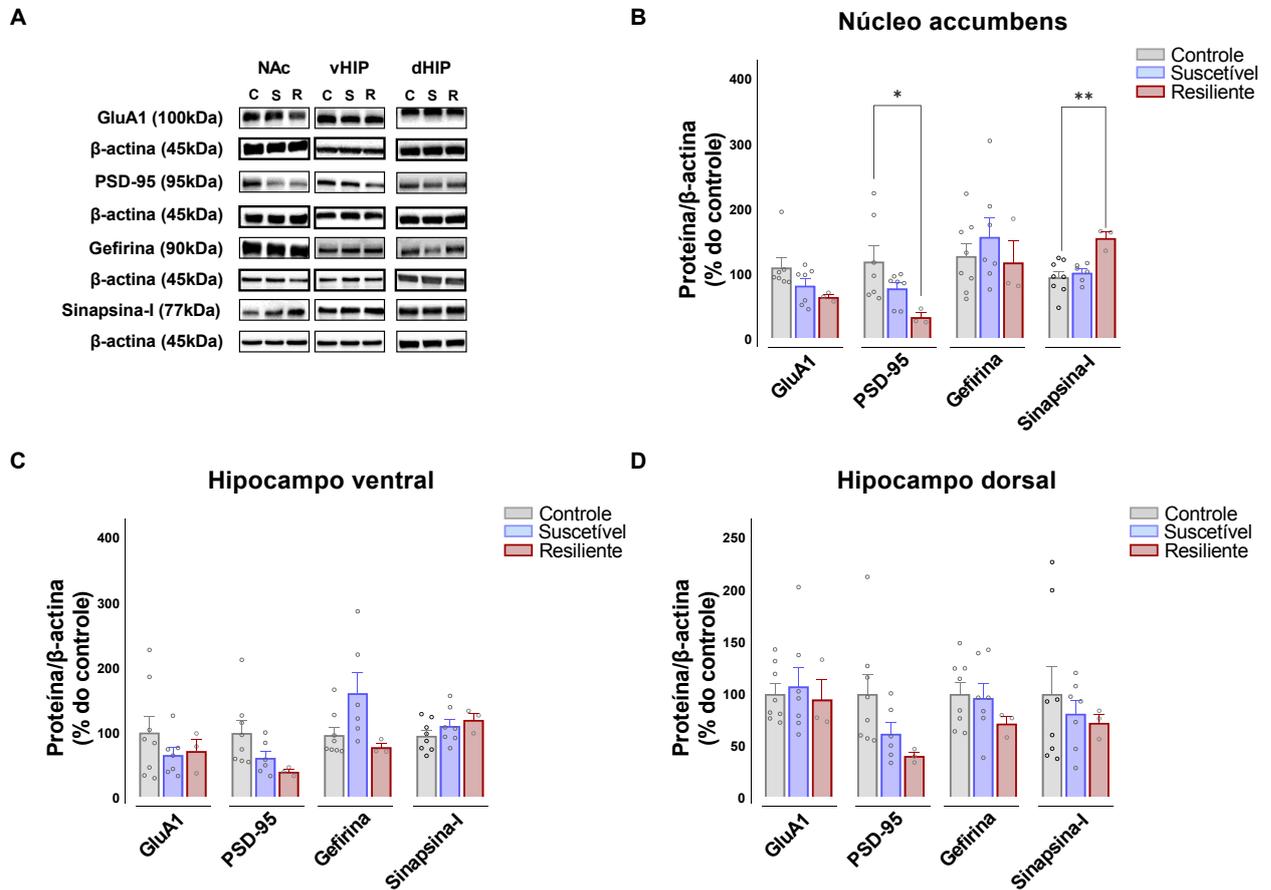
Visto que os receptores de adenosina modulam a transmissão glutamatérgica e GABAérgica, a subunidade GluA1 do receptor AMPA (100 kDa) e as proteínas sinápticas PSD-95 (95 kDa), gefirina (90 kDa) e sinapsina-I (77 kDa) foram avaliadas nas regiões de interesse.

Com relação às proteínas associadas a transmissão glutamatérgica do NAc (Figura 18.B), a subunidade GluA1 não apresentou alterações significativas entre os grupos [ $F(2, 14) = 2,629$ ;  $p = 0,107$ ]. No entanto, a densidade de PSD-95 reduziu nos animais resilientes [ $H(3) = 6,741$ ;  $p = 0,024$ ]. A gefirina, proteína pós-sináptica associada a sinapses inibitórias, não apresentou alterações [ $F(2, 15) = 0,532$ ;  $p = 0,597$ ]. Em contraste, a imunodeteção de sinapsina-I aumentou no NAc de animais resilientes ao ECDS [ $F(2, 14) = 9,215$ ;  $p = 0,002$ ].

As proteínas sinápticas avaliadas não apresentaram alterações no vHIP após o ECDS, como ilustrado pela Figura 18.C. O imunoconteúdo de GluA1 [ $H(3) = 1,957$ ;  $p = 0,395$ ] e de PSD-95 [ $F(2, 15) = 0,829$ ;  $p = 0,455$ ] permaneceram similares aos do controle. O mesmo padrão foi observado no vHIP nas proteínas gefirina [ $H(3) = 6,417$ ;  $p = 0,293$ ] e sinapsina-I [ $F(2, 15) = 1,304$ ;  $p = 0,300$ ].

A Figura 18.D ilustra os níveis das proteínas sinápticas no dHIP. Não houve alteração nas proteínas associadas à transmissão glutamatérgica, avaliado por GluA1 [ $F(2, 14) = 2,914$ ;  $p = 0,087$ ] e pela PSD-95 [ $F(2, 15) = 0,134$ ;  $p = 0,875$ ]. A proteína gefirina, associada à transmissão de GABA, também não demonstrou efeito significativo no dHIP [ $F(2,15) = 0,890$ ;  $p = 0,431$ ]. Além disso, os níveis de sinapsina-I [ $H(3) = ; p = 0,911$ ] permaneceram similares no dHIP após o ECDS.

**Figura 18.** Avaliação dos níveis de GluA1, PSD-95, gefirina e sinapsina-I em animais submetidos ao ECDS



**Figura 18.** Efeito do ECDS nos níveis das proteínas sinápticas GluA1, PSD-95, gefirina e sinapsina-I no NAc (B), vHIP (C) e dHIP (D). A quantificação foi normalizada pela banda de  $\beta$ -actina correspondente. Para o NAc, os resultados foram calculados pela ANOVA de uma via, seguido pelo *post-hoc* de Tukey (GluA1, PSD-95 e sinapsina-I) e teste de Kruskal-Wallis (gefirina). Para o vHIP, os resultados foram calculados pela ANOVA de uma via (PSD-95 e sinapsina-I) e pelo teste de Kruskal-Wallis (GluA1 e gefirina). Para o dHIP, os resultados foram calculados pela ANOVA de uma via (GluA1, PSD-95 e gefirina) e pelo teste de Kruskal-Wallis (sinapsina-I). Os valores estão expressos como porcentagem do controle  $\pm$  EPM. \*  $p < 0,05$ ; \*\*  $p < 0,01$  ( $n = 3$  a  $8$ ). Abreviações: C – controle; dHIP – hipocampo dorsal; NAc – núcleo accumbens; S – Suscetível; R – Resiliente; vHIP – hipocampo ventral.

## 5 DISCUSSÃO

O presente estudo investigou mecanismos neuroquímicos envolvidos na heterogeneidade das respostas comportamentais ao ECDS em camundongos C57BL/6 machos. Mais especificamente, foram avaliados os receptores de adenosina mais expressos no SNC, e proteínas sinápticas associadas à neurotransmissão excitatória e inibitória no NAc, dHIP e vHIP associadas aos fenótipos resiliente e suscetível. Com base nos resultados obtidos, verificou-se uma modulação diferenciada nos níveis gênico e proteico. Nos animais suscetíveis, houve uma redução na expressão do mRNA do gene ADORA1 no vHIP, enquanto o gene ADORA2A apresentou um aumento na mesma região. Em contrapartida, nos animais resilientes, foram observadas alterações bioquímicas nas três estruturas avaliadas. No grupo resiliente, houve uma diminuição na expressão do gene ADORA2A e na densidade proteica do receptor A2A, da subunidade GluA1 e do PSD-95 no NAc, enquanto a densidade de sinapsina-I aumentou. Tanto na sub-região ventral quanto dorsal do HIP, houve uma redução na densidade do receptor A2A. Ademais, no vHIP, a expressão do mRNA do gene ADORA1 também foi reduzida.

A busca por estratégias terapêuticas que visam reverter ou mitigar comorbidades psiquiátricas tem crescido nas últimas décadas devido ao aumento dos diagnósticos e a baixa eficácia dos medicamentos disponíveis (CONNOR; ZHANG, 2006). Modelos animais de estresse são utilizados para estudar os desfechos deletérios desses transtornos, no entanto, a maioria desconsidera a variação das respostas comportamentais. Nesse sentido, o ECDS, que consiste na exposição física e sensorial do animal experimental à uma linhagem agressora, é um modelo amplamente aceito para estudar o fenótipo suscetível e resiliente ao estresse social (RUSSO *et al.*, 2012).

A redução nos índices de comportamento social após a exposição a estressores crônicos, especialmente os que envolvem estímulos sociais aversivos, é associada ao fenótipo suscetível ao ECDS e é acompanhada por disfunções comportamentais do tipo-ansioso e depressivo (HALLER; BAKOS, 2002). O IIS é mensurado durante a execução do TIS, a partir da razão entre o tempo permanecido na ZI na presença do animal agressor, pelo tempo permanecido na ZI na ausência do animal agressor. Animais com IIS maiores do que 1 reportam um maior tempo na ZI na presença do agressor, sugerindo a manutenção da sociabilidade do animal. Por outro lado, IIS menores do que 1 reportam um maior tempo despendido na ZI na ausência do animal agressor, sugerindo um comportamento de esquiva social (GOLDEN *et al.*, 2011). As alterações observadas nas respostas sociais são prolongadas, podendo durar de

semanas há meses (KRISHNAN *et al.*, 2007), no entanto, há variação na proporção de animais suscetíveis e resilientes. Em nosso trabalho, dos 20 camundongos estressados, 10 apresentaram diminuição na sociabilidade, representando 50% dos animais com IIS inferior a 1. No protocolo utilizado como referência, estabelecido por Golden e colaboradores (2011), a porcentagem de animais suscetíveis atinge entre 60% e 70%. Outros estudos relatam uma porcentagem maior ou menor na indução da suscetibilidade (CAO *et al.*, 2010; OMATA *et al.*, 2018), entretanto, a maioria reporta índices entre 40% e 60% (KRISHNAN *et al.*, 2007; GURURAJAN *et al.*, 2019). Dessa forma, a sociabilidade dos animais utilizados neste trabalho está de acordo com os índices amplamente observados na literatura.

As diferenças observadas na modulação da sociabilidade podem ser promovidas por variações no protocolo experimental, incluindo a duração, o número de sessões e a severidade dos ataques durante o estresse físico. Um dos fatores essenciais na efetividade do ECDS é a seleção apropriada dos animais agressores. Em nosso estudo, a linhagem de camundongos CD-1, comumente utilizada como a agressora, foi substituída pela linhagem de camundongos *Swiss*, conforme a adaptação proposta por Pagliusi e Sartori (2019). Além desta substituição já ter sido validada por estudos recentes (PAGLIUSI *et al.*, 2020; WILLMORE *et al.*, 2022), o número de ataques observados em nosso trabalho foi superior ao de estudos que utilizam a linhagem CD-1 (OIZUMI *et al.*, 2019; NAKATAKE *et al.*, 2020). Apesar disso, nossos resultados apontam que ambos os grupos experimentais apresentaram diminuição no número de ataques recebidos a partir do dia 5 do ECDS. Essa redução é frequentemente observada, independe da linhagem utilizada, e pode decorrer da exaustão dos animais agressores ao longo do protocolo, tornando necessária sua substituição durante as sessões de confronto físico (GOLDEN *et al.*, 2011; OIZUMI *et al.*, 2019). Além disso, nossos resultados indicam que não houve diferença no número de ataques recebidos entre os grupos, sugerindo que a indução da suscetibilidade não foi decorrente de uma variação no número de ataques.

Após a exposição a eventos estressores, os animais exibem respostas comportamentais a fim de se adaptar e sobreviver a condições aversivas. As estratégias de defesa associadas a estressores sociais são distintas entre passivas, como imobilidade, posturas de submissão e uma baixa ativação do eixo HHA, e ativas, incluindo confrontos, tentativas de escape da situação e uma alta ativação do eixo HHA (KOOLHAAS, 2008; VASCONCELOS *et al.*, 2021). No ECDS, a manutenção da resposta resiliente é frequentemente associada a estratégias ativas (WOOD; BHATNAGAR, 2015), que podem ser alteradas para passivas ao longo dos dias,

dependendo do tempo de exposição e intensidade dos ataques (DIAZ; LIN, 2020). Neste trabalho, tanto animais resilientes quanto suscetíveis apresentaram estratégias de enfrentamento majoritariamente ativas, sem alterações ao longo do protocolo. Já foi demonstrado que a idade dos animais pode influenciar as estratégias de enfrentamento (OIZUMI *et al.*, 2019). Reguilón e colaboradores (2022) demonstraram que camundongos adolescentes (dia pós-natal 21) apresentaram alteração de estratégias passivas para ativas ao longo do ECDS. Por outro lado, trabalhos como o de Willmore e colaboradores (2022), que utilizam animais experimentais entre 2 e 5 meses de idade, similar à de nossos animais, observaram estratégias de enfrentamento majoritariamente ativas, sem alteração ao decorrer do ECDS.

Parâmetros metabólicos e de ingesta alimentar são comumente alterados após a exposição a estressores crônicos. No entanto, nossos resultados apontam que o ECDS não foi efetivo em alterar o peso dos animais suscetíveis e resilientes. Camundongos submetidos ao estresse crônico imprevisível apresentam alterações no peso ao final do protocolo, sendo reportado tanto o aumento, quanto a redução (GOUIRAND; MATUSZEWICH, 2005; COX *et al.*, 2011; MONTEIRO *et al.*, 2015). O efeito é similar em estudos com ECDS, sendo demonstrado um menor ganho de peso (KRISHNAN *et al.*, 2007), associado ao aumento do metabolismo energético, que reduz os níveis de leptina circulante, e por consequência, diminui a ingesta alimentar (CHUANG *et al.*, 2010; GURURAJAN *et al.*, 2019). Por outro lado, outros trabalhos demonstram que o ECDS induz o aumento nos níveis de orexina e grelina, promovendo o aumento na ingestão de alimentos (LUTTER *et al.*, 2008; SAVIGNAC *et al.*, 2011; PATTERSON *et al.*, 2013; NAKATAKE *et al.*, 2020).

Com o objetivo de avaliar o efeito do ECDS em proteínas associadas à ativação do eixo HHA, foi mensurada a densidade de GRs. O hipocampo é uma região encefálica com uma alta densidade de receptores de GR, responsáveis pelo controle dos mecanismos de retroinibição do eixo HHA (DE KLOET; JOËLS; HOLSBOER, 2005; ULRICH-LAI; HERMAN, 2009). No NAc, os GRs estão associados ao estabelecimento de comportamentos e dominância e sociabilidade (PAPILLOUD *et al.*, 2020). Nossos resultados indicam que não houve alterações nos níveis de GRs no NAc, dHIP e vHIP.

Estudos presentes na literatura apresentam diversidade na modulação de GRs após estressores crônicos. Meyer e colaboradores (2001) demonstraram que o ECDS reduziu a expressão de mRNA de GRs no giro denteado, sem alterar os níveis nas regiões CA1 e CA3 hipocampais. Apesar disso, já foi demonstrado que estressores agudos também são capazes de reduzir os níveis de GRs no HIP (ZHE; FANG; YUXIU, 2008). Por outro lado, estudos com

estresse sub-crônico não alteraram a expressão de mRNA de GRs no NAc de camundongos com comportamentos tipo-depressivos (BAUGHER *et al.*, 2022). É importante ressaltar que os GR possuem múltiplos sítios de fosforilação, que contribuem para alterações transcricionais e modificam a interação entre proteínas (WANG; FREDERICK; GARABEDIAN, 2002; ISMAILI; GARABEDIAN, 2004), sendo que os resultados obtidos podem variar dependendo do sítio avaliado (CHEN *et al.*, 2008; AVENANT *et al.*, 2010). Apesar de, neste trabalho, não terem sido observadas alterações nos níveis proteicos de GR, o prejuízo comportamental em animais suscetíveis e as demais alterações bioquímicas observadas sugerem que o ECDS foi efetivo em produzir desfechos subjacentes ao protocolo. Para trabalhos futuros, sugerimos que seja realizada a avaliação de outros alvos moleculares para avaliar a ativação do eixo HHA decorrente do protocolo de estresse, como a dosagem de corticosterona plasmática e a imunorreatividade de GR fosforilado. Além disso, o peso da glândula adrenal pode ser um parâmetro complementar para mensurar a efetividade do estresse.

Além do comportamento social, o ECDS é capaz de induzir disfunções em parâmetros relacionados a emocionalidade. Com relação a comportamentos de resignação e tentativas de escape, Rygula e colaboradores (2005) demonstraram que o ECDS foi capaz de aumentar o tempo de imobilidade no teste do nado forçado, e de reduzir o consumo no teste de preferência de sacarose em animais suscetíveis e resilientes. Por outro lado, Krishnan e colaboradores (2007) não observaram alteração no tempo em imobilidade do TSC de animais derrotados. De forma similar, em nosso trabalho, o ECDS não foi capaz de alterar parâmetros de tentativa de escape no TSC, observado pelo tempo total de permanência e latência para imobilidade, sugerindo que o estresse não foi capaz de induzir comportamento tipo-depressivo em animais suscetíveis e resilientes. Apesar de o TSC ser amplamente utilizado para avaliação do comportamento tipo-depressivo, a utilização de apenas um teste torna-se limitante dado a complexidade comportamental exibida por roedores (TOYODA, 2017). Há uma variedade de testes que podem ser utilizados para avaliar desespero comportamental, como o teste do nado forçado, e testes que avaliam comportamentos anedônicos, incluindo o teste de preferência de sacarose e de novidade alimentar (CASTAGNÉ *et al.*, 2010; CAN *et al.*, 2011a; LIU *et al.*, 2018). Sendo assim, a utilização de diferentes abordagens relacionadas ao comportamento tipo-depressivo pode avaliar de forma mais robusta o impacto do ECDS na emocionalidade, podendo ser utilizados como testes complementares em estudos futuros.

Alguns trabalhos demonstram redução da distância percorrida no TCA em animais suscetíveis e resilientes ao ECDS (HUANG *et al.*, 2013; HUANG *et al.*, 2016; OIZUMI *et al.*, 2019). Contudo, nossos resultados apontam que não houve alteração na atividade locomotora, avaliada pela distância percorrida no TCA e na fase sem alvo do TIS. Nesse sentido, sugere-se que as disfunções comportamentais observadas na sociabilidade e emocionalidade dos animais suscetíveis não estão associadas a prejuízos locomotores promovidos pelo protocolo de estresse, corroborando estudos nos quais também não foi observada alteração (IIO *et al.*, 2011).

Estressores crônicos também são intimamente relacionados à transtornos de ansiedade. Estudos prévios apontam que o ECDS é capaz de induzir comportamentos do tipo-ansioso tanto em animais resilientes, quanto suscetíveis. Dessa forma, é relatado na literatura que independente do grupo, animais submetidos ao protocolo apresentam disfunções em parâmetros relacionados a ansiedade, ilustrados pelo aumento no tempo passado nos braços fechados no LCE, e menor tempo total despendido no centro no TCA (KRISHNAN *et al.*, 2007; HUANG *et al.*, 2013; HUANG *et al.*, 2016; JIANHUA *et al.*, 2017; HING *et al.*, 2018).

Neste trabalho, o ECDS induziu o aumento em parâmetros comportamentais do tipo-ansioso somente em animais suscetíveis. No TCA, os resultados sugerem que os animais suscetíveis reduziram o tempo despendido e o número de entradas no centro do aparato. Já no LCE, os parâmetros comumente utilizados para avaliação dos níveis de ansiedade não foram alterados, ilustrados pelo número de entradas e o tempo de permanência nos braços abertos. Esses resultados são apresentados de forma semelhante em estudos como o de Alves-dos-Santos, Resende e Chiavegatto (2020). Monleón, Duque e Vinander-Carols (2016) demonstraram que foi necessária a exposição a 20 sessões de confronto físico para os camundongos reduzirem a exploração dos braços abertos no LCE, sendo 10 dias de ECDS insuficientes para induzir alterações neste teste. Além disso, por ser considerado um teste complexo e apresentar tolerância na primeira exposição ao aparato, a avaliação de outros parâmetros etológicos torna-se importante para a compreensão dos resultados (SCHNEIDER *et al.*, 2011). Nesse sentido, observamos a redução na frequência e no tempo de exibição da avaliação de risco nos animais suscetíveis, o que sugere, de forma mais sutil, o aparecimento de comportamentos relacionados a ansiedade.

A avaliação comportamental de nossos animais indica que o ECDS foi eficaz em induzir respostas heterogêneas. As alterações sociais e emocionais promovidas pelo estresse foram observadas somente em animais suscetíveis, sugerindo a classificação adequada dos animais nos subgrupos. A avaliação do número de ataques demonstrou consistência em ambos

os grupos ao longo do protocolo, indicando que, mesmo com a agressividade similar, os animais produziram respostas diferentes.

Com relação aos possíveis substratos biológicos envolvidos nos mecanismos de resiliência e suscetibilidade ao ECDS, nosso foco foi o sistema adenosinérgico, especificamente nos receptores mais expressos nos SNC e capazes de modular a neurotransmissão. Os receptores de adenosina A1 e A2A são receptores metabotrópicos expressos nas membranas neuronais de regiões envolvidas na modulação do humor, incluindo o dHIP, vHIP e NAc. Esses receptores podem atuar individualmente ou a partir da formação de heterodímeros, que interagem para modular a transmissão mediada pelo GABA, glutamato, dopamina e serotonina. Estressores crônicos ou intensos podem promover disfunções na concentração de moléculas liberadas na fenda sináptica e assim, contribuindo na fisiopatologia de distúrbios psiquiátricos (GOMES *et al.*, 2011; HOHOFF *et al.*, 2020).

Assim, a ativação dos receptores de adenosina modula cascatas de segundos mensageiros, que estimulam ou inibem a passagem de íons cálcio pela membrana plasmática, modulando a excitabilidade celular (DIAS *et al.*, 2013). Enquanto os receptores A1 hiperpolarizam a membrana pré e pós-sináptica e são associados a mecanismos de neuroproteção, os receptores A2A promovem a excitabilidade dos circuitos neuronais (CALKER *et al.*, 2019). A síntese e funcionalidade desses receptores ocorre desde o desenvolvimento embrionário, em processos de proliferação, migração e diferenciação celular. No período do desenvolvimento pós-natal e após a maturação do encéfalo adulto, sua síntese e funcionalidade é alterada dependendo da demanda metabólica celular. Nesse sentido, eventos estressores aumentam a concentração da adenosina extracelular e modificam a expressão e ativação dos receptores de adenosina, auxiliando na adaptação do organismo à estímulos externos (RODRIGUES; MARQUES; CUNHA, 2018). Como resultado, ocorre a regulação da neurotransmissão nos circuitos encefálicos, incluindo regiões envolvidas no controle emocional, como o PFC, HIP e em sub-regiões do estriado (FUXE *et al.*, 2010).

Considerando isso, este trabalho teve como objetivo caracterizar o envolvimento dos receptores de adenosina na heterogeneidade de respostas comportamentais ao estresse. Foram avaliados os níveis de expressão de mRNA no NAc e vHIP, e de proteína dos receptores A1 e A2A no NAc, dHIP e vHIP de animais controle, suscetíveis e resilientes ao ECDS. Nossa hipótese inicial era de que o ECDS induz o aumento na densidade e expressão dos receptores A2A no vHIP de animais suscetíveis, estando associado ao aumento nos níveis de proteínas

glutamatérgicas do NAc. Os resultados indicam que o ECDS promoveu alterações na expressão de mRNA e na densidade proteica dos receptores A1 e A2A nas regiões avaliadas. Mais especificamente, a expressão gênica e proteica do receptor A1 permaneceu similar no NAc de animais controle, suscetíveis e resilientes. Já a expressão de mRNA e a densidade do receptor A2A reduziu no NAc de animais resilientes, sugerindo que a redução dos receptores excitatórios de adenosina dessa região pode estar associada à manutenção do comportamento social e emocional após o estresse crônico. No NAc, os receptores A2A estão expressos pós-sinápticamente nos neurônios espinhosos médios, exercendo a inibição dos receptores de dopamina do sub-tipo D2 (FARRAR *et al.*, 2010; O'NEILL; LETENDRE; BACHTELL, 2011).

O envolvimento dos receptores de adenosina A1 e A2A nas respostas ao ECDS apresentou distinções nas sub-regiões ventral e dorsal do HIP. No vHIP, a expressão do gene ADORA1 reduziu tanto em animais suscetíveis, quanto resilientes. No entanto, a avaliação proteica do receptor A1 permaneceu inalterada. O receptor A2A do vHIP, por outro lado, apresentou níveis de expressão gênica e proteica distintos. Enquanto a expressão do gene ADORA2A aumentou nos animais suscetíveis ao ECDS, a densidade proteica do receptor A2A foi reduzida no vHIP de animais resilientes. Já no dHIP, foi mensurado a densidade proteica dos receptores A1 e A2A. O receptor A1 não demonstrou alterações após o ECDS. Contudo, o receptor A2A apresentou redução no grupo resiliente. Apesar das diferenças observadas, nossos resultados reforçam os achados da literatura que demonstram que o aumento dos receptores A2A no hipocampo está associado a condições neurodegenerativas, envelhecimento e situações de estresse crônico (MACHADO *et al.*, 2014; YIN *et al.*, 2015; CALKER *et al.*, 2019).

Variantes dos genes ADORA1 e ADORA2A, codificantes para os receptores A1 e A2A, respectivamente, são associados a diversas doenças do SNC, como a doença de Huntington, autismo, TDM e transtornos de ansiedade. Dentre os polimorfismos associados a essas patologias, destaca-se a variante rs5751876 do gene ADORA2A, que vem sendo associada ao desenvolvimento de transtornos de ansiedade (CHILDS *et al.*, 2008; DHAENENS *et al.*, 2009; FREITAG *et al.*, 2009; DOMSCHKE *et al.*, 2011; OLIVEIRA *et al.*, 2018). A nível de proteína, o estresse crônico é capaz de alterar os níveis dos receptores A2A. Kaster e colaboradores (2015) demonstraram o aumento na densidade proteica dos receptores A2A no HIP de animais submetidos ao estresse crônico imprevisível, alteração associada a déficits cognitivos e emocionais. Além disso, o aumento do tônus glutamatérgico nas projeções da

região ventral do HIP para o NAc é associado ao fenótipo suscetível ao ECDS (BAGOT *et al.*, 2015).

De acordo com o “Dogma central da biologia molecular”, proposto por Francis Crick em 1957, a informação genética contida no DNA é transcrita para mRNA. Em seguida, o mRNA é conduzido ao citoplasma, e, após ser processado pelo ribossomo, é traduzido em cadeias de aminoácidos que se unem para formar as proteínas (MAIER; GÜELL; SERRANO, 2009; COBB, 2017). A etapa inicial, de transcrição, é controlada por fatores de transcrição, fatores epigenéticos, de processamento, transporte e degradação do mRNA. A sua tradução em proteínas também envolve múltiplos processos, incluindo a iniciação, alongação e processamento proteico. Além disso, a degradação proteica é altamente regulada, dependendo de processos de ubiquitinação e autofagia (BUCCITELLI; SELBACH, 2020). Devido à complexidade dos componentes nos processos de transcrição, tradução e manutenção proteica, a correlação entre a abundância e proporção nos níveis de mRNA para proteína são comumente relatados de maneira conflitante (MEHRA; LEE; HATZIMANIKATIS, 2003). Para tecidos de mamíferos, cerca de 40% da expressão de mRNA se correlaciona com os níveis proteicos. Portanto, integrar dados de análises proteicas e a nível genômico pode refinar o entendimento dos princípios da expressão gênica e enfatiza a importância de mecanismos regulatórios pós-traducionais (TIAN *et al.*, 2004). Nesta perspectiva, nossos resultados apontam que o ECDS induziu a modulação do sistema adenosinérgico de forma distinta entre os níveis gênicos e proteicos.

Os receptores de adenosina modulam a excitabilidade neuronal principalmente a partir da regulação da transmissão de glutamato e GABA, e a hiperativação dos circuitos encefálicos envolvidos no controle do humor vem sendo associada a fisiopatologia dos transtornos psiquiátricos (SARAWAGI; SONI; PATEL, 2021; LAROSA; WONG, 2022). O aumento na excitabilidade neuronal também é observado após a exposição a estressores crônicos, que configuram como um importante fator ambiental no desenvolvimento das comorbidades psiquiátricas (HASEGAWA *et al.*, 2019; TSE *et al.*, 2019). A liberação excessiva de glutamato na fenda sináptica promove processos de excitotoxicidade, que induz a morte neuronal, além de uma plasticidade aberrante e disfuncional (TAKAHASHI; FOSTER; LIN, 2015; OLLOQUEQUI *et al.*, 2018). Dentre os receptores envolvidos na liberação excessiva de glutamato, os iGluR vem sendo associados como os principais responsáveis na resposta pós-sináptica de excitotoxicidade e na etiologia das comorbidades psiquiátricas. Enquanto os

receptores AMPA modulam a maior parte da transmissão excitatória no encéfalo, a ativação dos receptores NMDA permite um rápido influxo de íons cálcio para o meio intracelular (GE; WANG, 2021).

Com o objetivo de avaliar a relação entre os fenótipos comportamentais distintos induzidos pelo ECDS em proteínas sinápticas associadas ao sistema glutamatérgico, foi mensurada a densidade de proteínas associadas a transmissão envolvendo os iGluRs. Mais especificamente, foi avaliada a subunidade GluA1 do receptor AMPA, a qual não apresentou alterações no dHIP, vHIP e NAc em nenhum dos grupos experimentais. Estudos têm demonstrado contradição na densidade de GluA1 no HIP de animais suscetíveis ao ECDS, reportando tanto o aumento (HASEGAWA *et al.*, 2019), quanto a redução (GARCÍA-PARDO *et al.*, 2018; YASHIRO; SEKI, 2022) e, de forma similar aos nossos resultados, a manutenção nos níveis da subunidade GluA1 hipocampais (WANG *et al.*, 2020). Ao nosso conhecimento, este foi o primeiro trabalho a avaliar a subunidade GluA1 após o ECDS no NAc e nas sub-regiões dHIP e vHIP.

A excitabilidade neuronal é influenciada por diversas moléculas presentes nos terminais sinápticos, que, em conjunto com os receptores de membrana, compõem a maquinaria necessária para a neurotransmissão. Assim, a funcionalidade das sinapses depende de proteínas associadas a exocitose das vesículas, da zona ativa e do potencial da membrana pós-sináptica. Nesse sentido, proteínas pós-sinápticas de acoplamento promovem o ancoramento de receptores e estabilizam as sinapses (FRITSCHY; HARVEY; SCHWARZ, 2008). Dentre as proteínas pós-sinápticas associadas ao sistema excitatório, destaca-se a PSD-95. Já nas sinapses inibitórias, a principal proteína que exerce o papel de ancoramento de receptores é a gefirina.

A PSD-95 é uma das proteínas sinápticas mais abundantes no encéfalo, e essencial para a ancoragem dos receptores iGluR no terminal pós-sináptico, mais especificamente dos receptores AMPA, e principalmente dos NMDA. Nos transtornos psiquiátricos, é demonstrado o aumento da densidade de PSD-95 em regiões como a amígdala, HIP e PFC de pacientes com TDM e em camundongos com comportamentos tipo-depressivo (STACHOWICZ, 2022). Neste trabalho, os resultados indicam que o ECDS reduziu os níveis de PSD-95 no NAc de animais resilientes, sem alterar os níveis do dHIP e vHIP. A densidade de PSD-95 é alterada de forma diferente após estressores crônicos, dependendo da região avaliada. Trabalhos que avaliaram o PFC demonstram a redução na densidade de PSD-95 em animais suscetíveis ao (LEE *et al.*, 2021). Em estudos que avaliaram o HIP, camundongos expostos ao ECDS não apresentaram alterações (MARTIN *et al.*, 2017; WANG *et al.*, 2020).

Apesar de o processo de excitotoxicidade ocorrer majoritariamente pelo aumento do tônus glutamatérgico, a inativação do sistema GABAérgico também contribui para o aumento da excitabilidade neuronal (OBRENOVITCH *et al.*, 2000). Alterações em proteínas associadas a transmissão de GABA são observadas em animais suscetíveis e resilientes ao ECDS. Dentre elas, a proteína gefirina, altamente expressa no encéfalo de mamíferos (FRITSCHY; HARVEY; SCHWARZ, 2008; TYAGARAJAN; FRITSCHY, 2014). A gefirina é responsável por interagir com o citoesqueleto e formar uma malha proteica que acopla e organiza a distribuição dos receptores de glicina e, principalmente da subunidade GABA<sub>A</sub> ao longo da membrana pós-sináptica. Portanto, neste trabalho foi mensurado os níveis da proteína gefirina, associada a sinapses inibitórias. Nossos resultados indicam que não houve alteração nos níveis de gefirina no NAc e nas sub-regiões dorsal e ventral do HIP. Em regiões como a área tegmentar ventral, camundongos suscetíveis ao ECDS apresentam redução na expressão de proteínas associadas à transmissão GABAérgica, como em vGAT e na gefirina. Neste mesmo estudo, houve redução dessas proteínas no NAc de pacientes homens e mulheres diagnosticados com TDM (HESHMATI *et al.*, 2020). No entanto, ao nosso conhecimento, poucos estudos avaliam a gefirina em contextos de transtornos de ansiedade e depressão decorrentes do ECDS.

Proteínas associadas a exocitose e ao ciclo da vesícula sináptica também influenciam na funcionalidade das sinapses e são alteradas após eventos estressores. As vesículas contendo moléculas de neurotransmissores transitam entre as fases de liberação, reciclagem e reserva, sendo as sinapsinas responsáveis por mediar essas transições. A classe das sinapsinas é constituída pelos subtipos I e II, proteínas que permanecem acopladas à membrana vesicular de transmissores (BOGEN *et al.*, 2006; BRAGINA *et al.*, 2007; SHUPLIAKOV; HAUCKE; PECHSTEIN, 2011). Enquanto a sinapsina-I está associada majoritariamente ao acoplamento da vesícula na zona ativa e a liberação de neurotransmissores na fenda sináptica, a sinapsina-II está principalmente associada a reserva de neurotransmissores (BYKHOVSKAIA, 2011). Camundongos KO para sinapsina-I reduzem a liberação de GABA e glutamato em regiões do estriado e no PFC (BOGEN *et al.*, 2009). No entanto, as principais disfunções relacionadas ao subtipo I dessa proteína são observadas no sistema inibitório. Animais com deleção genética da proteína apresentam padrões assíncronos na liberação de GABA, o que reduz a funcionalidade das sinapses inibitórias (FORTE *et al.*, 2019).

Das estruturas avaliadas neste trabalho, a sinapsina-I apresentou um aumento no NAc de animais resilientes, sem demonstrar alterações no dHIP e vHIP. Por estar associada

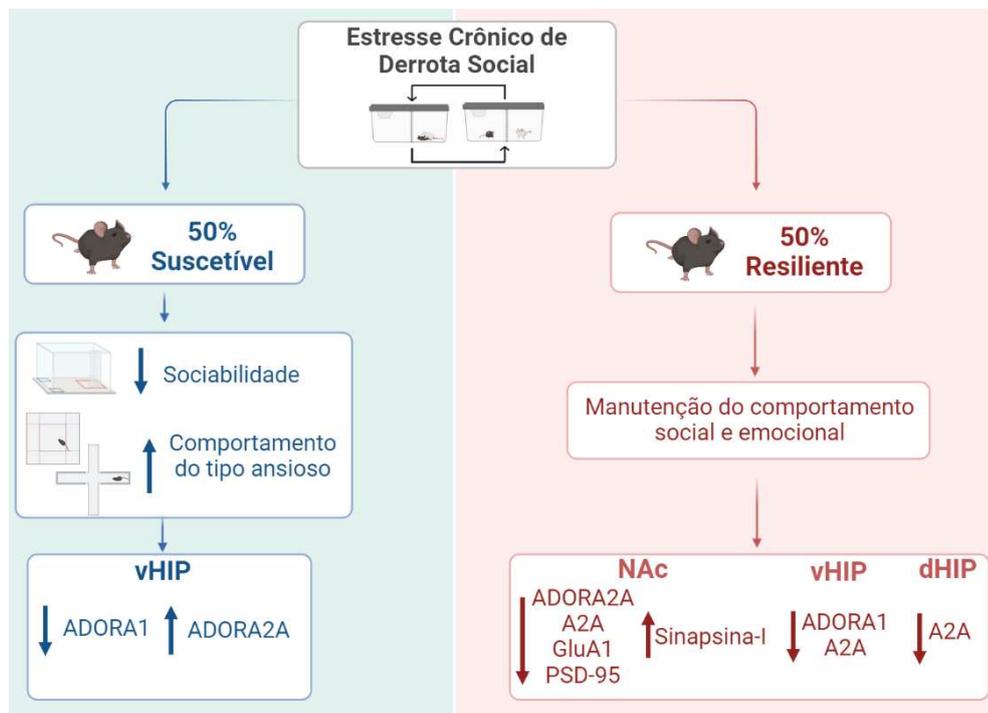
majoritariamente à liberação de GABA, esses resultados, em conjunto com a redução da expressão de mRNA e nos níveis do receptor A2A, e na densidade de PSD-95 observadas no NAc, sugerem que há mecanismos inibitórios dessa região envolvidos na modulação da resposta resiliente ao ECDS. Estudos prévios demonstram que os níveis de sinapsina-I não são alterados no HIP de animais expostos ao ECDS (MARTIN *et al.*, 2017). Contudo, trabalhos que utilizam outros modelos animais de estresse, como o estresse crônico imprevisível, relatam o aumento nos níveis de sinapsina-I no PFC e HIP, efeito que é revertido após o tratamento com antidepressivos (DAGYTE *et al.*, 2011).

O objetivo deste trabalho foi caracterizar o efeito do ECDS em receptores do sistema adenosinérgico e em proteínas sinápticas de animais com respostas suscetíveis e resilientes. Os resultados obtidos expandem as evidências que demonstram a relação entre alterações no sistema adenosinérgico e a modulação do comportamento social e emocional em camundongos. Mais especificamente, no NAc, ocorreu o aumento na expressão de mRNA do gene ADORA1 em animais suscetíveis e resilientes. Por outro lado, a expressão e níveis do receptor A2A reduziu no NAc do grupo resiliente. Além disso, houve redução em proteínas associadas a transmissão excitatória, e o aumento de proteínas associadas majoritariamente a sinapses inibitórias do NAc, reforçando o envolvimento da inibição da estrutura no desenvolvimento da resposta adaptativa ao ECDS. No vHIP, por outro lado, houve o aumento nos níveis do gene ADORA1 no grupo suscetível. Com relação a densidade dos receptores excitatórios A2A, houve redução na região ventral e quanto na região dorsal do HIP. Dessa forma, nossos resultados fornecem evidências da modulação dos receptores de adenosina A1 e A2A a nível de expressão gênica e proteica em mecanismos de resiliência e suscetibilidade ao ECDS.

## 6 CONCLUSÃO

Como demonstrado na Figura 19, o ECDS promoveu respostas comportamentais heterogêneas nos camundongos machos, com 50% dos animais apresentando um fenótipo suscetível ao protocolo, caracterizado pela redução nos parâmetros sociais e disfunção no comportamento tipo-ansioso, sem alterar comportamentos tipo-depressivos. Os animais resilientes, por outro lado, não apresentaram alterações comportamentais em relação ao grupo controle, sendo essa manutenção acompanhada de alterações no sistema adenosinérgico e em proteínas sinápticas no NAc, dHIP e vHIP. Mais especificamente, houve a redução na expressão de mRNA do gene ADORA2A no NAc de animais suscetíveis, e o aumento no vHIP de ambos os grupos estressados. Além disso, a avaliação do gene ADORA1 demonstrou aumentar no vHIP de animais suscetíveis. Contudo, a avaliação da densidade proteica demonstrou uma redução receptores A2A nas três regiões encefálicas avaliadas. Além disso, no NAc, houve a diminuição no imunoconteúdo de PSD-95, proteína de ancoramento de receptores iGluR, e o aumento na densidade de sinapsina-I, proteína vesicular associada majoritariamente a excitose de GABA.

**Figura 19. Efeito do ECDS nas avaliações comportamentais, bioquímicas e moleculares**



**Figura 19.** Metade dos animais foram classificados como suscetíveis, apresentando prejuízos na sociabilidade e emocionalidade, acompanhados de uma redução na expressão do gene ADORA1 e o aumento do gene ADORA2A no vHIP. Já nos animais resilientes, houve a manutenção das respostas comportamentais, acompanhadas por alterações nas três estruturas encefálicas avaliadas. No NAc, houve uma diminuição na expressão do gene ADORA2A e na densidade do receptor A2A, de GluA1 e de PSD-95, além do aumento na sinapsina-I. Também foi identificada uma redução na densidade do receptor A2A nas sub-regiões ventral e dorsal do HIP, juntamente com uma redução na expressão do mRNA do gene ADORA1 no vHIP. Abreviações: dHIP – hipocampo dorsal; NAc – núcleo accumbens; vHIP – hipocampo ventral. Fonte: originado a partir de imagens do Biorender; elaborado pela autora.

Em conjunto, os resultados sugerem que há redução na excitabilidade do NAc em animais resilientes ao ECDS. As proteínas GluA1, gefirina e GR, por outro lado, não apresentaram alterações subjacentes ao protocolo. Essas evidências contribuem com os trabalhos disponíveis na literatura sobre o envolvimento do sistema adenosinérgico e de proteínas sinápticas em diferentes desfechos comportamentais de resposta ao estresse. Ao nosso conhecimento, este é o primeiro estudo que sugere a redução dos receptores A2A como um mecanismo envolvido no desenvolvimento da resposta resiliente a condições estressoras.

## 7 PERSPECTIVAS

- i) Realizar novos protocolos de ECDS a fim de ampliar o tamanho amostral para as avaliações bioquímicas e moleculares;
- ii) Mensurar a corticosterona plasmática dos animais resilientes, suscetíveis e controle ao ECDS;
- iii) Avaliar a plasticidade estrutural através da morfologia neuronal no dHIP, vHIP e NAc de animais controle, suscetíveis e resilientes;
- iv) Analisar a ativação do NAc, dHIP e vHIP em animais controle, suscetíveis e resilientes ao ECDS;
- v) Investigar se o bloqueio farmacológico dos receptores A2A hipocampais promove a manutenção da resposta resiliente ao ECDS.

## 8 REFERÊNCIAS

AGID, O.; KOHN, Y.; LERER, B. Environmental stress and psychiatric illness. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 54, n. 3, p. 135–141, 2000.

ALANKO, L.; PORKKA-HEISKANEN, T.; SOINILA, S. Localization of equilibrative nucleoside transporters in the rat brain. **Journal of Chemical Neuroanatomy**, v. 31, n. 3, p. 162–168, 2006.

ALVES-DOS-SANTOS, L.; RESENDE, L. de S.; CHIAVEGATTO, S. Susceptibility and resilience to chronic social defeat stress in adolescent male mice: No correlation between social avoidance and sucrose preference. **Neurobiology of Stress**, v. 12, p. 100221, 2020.

AMERICAN PSYCHIATRIC ASSOCIATION. **Manual diagnóstico e estatístico de transtornos mentais**. Porto Alegre: Artmed. v. 5p. 155–290, 2014.

ANACKER, C.; SCHOLZ, J.; O'DONNELL, K. J.; ALLEMANG-GRAND, R.; DIORIO, J.; BAGOT, R. C.; NESTLER, E. J.; HEN, R.; LERCH, J. P.; MEANEY, M. J. Neuroanatomic Differences Associated with Stress Susceptibility and Resilience. **Biological Psychiatry**, v. 79, n. 10, p. 840–849, 2016.

ANTONUCCI, F.; CORRADINI, I.; MORINI, R.; FOSSATI, G.; MENNA, E.; POZZI, D.; PACIONI, S.; VERDERIO, C.; BACCI, A.; MATTEOLI, M. Reduced SNAP-25 alters short-term plasticity at developing glutamatergic synapses. **EMBO reports**, v. 14, n. 7, p. 645–651, 2013.

ARDI, Z.; ALBRECHT, A.; RICHTER-LEVIN, A.; SAHA, R.; RICHTER-LEVIN, G. Behavioral profiling as a translational approach in an animal model of posttraumatic stress disorder. **Neurobiology of Disease**, v. 88, p. 139–147, 2016.

ARDI, Z.; RICHTER-LEVIN, A.; XU, L.; CAO, X.; VOLKMER, H.; STORK, O.; RICHTER-LEVIN, G. The role of the GABAA receptor Alpha 1 subunit in the ventral hippocampus in stress resilience. **Scientific Reports**, v. 9, n. 1, 2019.

AVENANT, C.; RONACHER, K.; STUBSRUD, E.; LOUW, A.; HAPGOOD, J. P. Role of ligand-dependent GR phosphorylation and half-life in determination of ligand-specific transcriptional activity☆. **Molecular and Cellular Endocrinology**, v. 327, n. 1-2, p. 72–88, 2010.

BAGOT, R. C.; PARISE, E. M.; PEÑA, C. J.; ZHANG, H.-X.; MAZE, I.; CHAUDHURY, D.; PERSAUD, B.; CACHEPE, R.; BOLAÑOS-GUZMÁN, C. A.; CHEER, J. F.; DEISSEROTH, K.; HAN, M.-H.; NESTLER, E. J. Ventral hippocampal afferents to the nucleus accumbens regulate susceptibility to depression. **Nature Communications**, v. 6, n. 1, p. 7062, 2015.

BANNERMAN, D. M.; GRUBB, M.; DEACON, R. M. J.; YEE, B. K.; FELDON, J.; RAWLINS, J. N. P. Ventral hippocampal lesions affect anxiety but not spatial learning. **Behavioural Brain Research**, v. 139, n. 1-2, p. 197–213, 2003.

BAST, T.; ZHANG, W.-N.; FELDON, J. The ventral hippocampus and fear conditioning in rats. **Experimental Brain Research**, v. 139, n. 1, p. 39–52, 2001.

BAUGHER, B. J.; BUCKHAULTS, K.; CASE, J.; SULLIVAN, A.; HUQ, S. N.; SACHS, B. D. Sub-chronic stress induces similar behavioral effects in male and female mice despite sex-specific molecular adaptations in the nucleus accumbens. **Behavioural Brain Research**, v. 425, p. 113811, 2022.

BERGSTRÖM, A.; JAYATISSA, M. N.; MØRK, A.; WIBORG, O. Stress sensitivity and resilience in the chronic mild stress rat model of depression; an in-situ hybridization study. **Brain Research**, v. 1196, p. 41–52, 2008.

BIGGE, C. F. Ionotropic glutamate receptors. **Current Opinion in Chemical Biology**, v. 3, n. 4, p. 441–447, 1999.

BOGEN, I. L.; BOULLAND, J.-L.; MARIUSSEN, E.; WRIGHT, M. S.; FONNUM, F.; KAO, H.-T.; WALAAS, S. I. Absence of synapsin I and II is accompanied by decreases in vesicular transport of specific neurotransmitters. **Journal of Neurochemistry**, v. 96, n. 5, p. 1458–1466, 2006.

BOGEN, I. L.; HAUG, K. H.; ROBERG, B.; FONNUM, F.; WALAAS, S. I. The importance of synapsin I and II for neurotransmitter levels and vesicular storage in cholinergic, glutamatergic, and GABAergic nerve terminals. **Neurochemistry International**, v. 55, n. 1, p. 13–21, 2009.

BOGEN, I. L.; JENSEN, V.; HVALBY, Ø.; WALAAS, S. I. Glutamatergic neurotransmission in the synapsin I and II double knock-out mouse. **Seminars in Cell & Developmental Biology**, v. 22, n. 4, p. 400–407, 2011.

BRAGINA, L.; CANDIRACCI, C.; BARBARESI, P.; GIOVEDÌ, S.; BENFENATI, F.; CONTI, F. Heterogeneity of glutamatergic and GABAergic release machinery in cerebral cortex. **Neuroscience**, v. 146, n. 4, p. 1829–1840, 2007.

BRUNDEGE, J. M.; DIAO, L.; PROCTOR, W. R.; DUNWIDDIE, T. V. The Role of Cyclic AMP as a Precursor of Extracellular Adenosine in the Rat Hippocampus. **Neuropharmacology**, v. 36, n. 9, p. 1201–1210, 1997.

BUCCITELLI, C.; SELBACH, M. mRNAs, proteins and the emerging principles of gene expression control. **Nature Reviews Genetics**, v. 21, n. 10, p. 630–644, 2020.

BURCUSA, S. L.; IACONO, W. G. Risk for recurrence in depression. **Clinical Psychology Review**, v. 27, n. 8, p. 959–985, 2007.

BURNSTOCK, G. Purine and purinergic receptors. **Brain and Neuroscience Advances**, v. 2, p. 239821281881749, 2018.

BURNSTOCK, G.; KENNEDY, C. Is there a basis for distinguishing two types of P2-purinoceptor? **General Pharmacology: The Vascular System**, v. 16, n. 5, p. 433–440, 1985.

BYKHOVSKAIA, M. Synapsin regulation of vesicle organization and functional pools. **Seminars in Cell & Developmental Biology**, v. 22, n. 4, p. 387–392, 2011.

CALKER, D. Van; MÜLLER, M.; HAMPRECHT, B. ADENOSINE REGULATES VIA TWO DIFFERENT TYPES OF RECEPTORS, THE ACCUMULATION OF CYCLIC AMP IN CULTURED BRAIN CELLS. **Journal of Neurochemistry**, v. 33, n. 5, p. 999–1005, 1979.

CALKER, D.; BIBER, K.; DOMSCHKE, K.; SERCHOV, T. The role of adenosine receptors in mood and anxiety disorders. **Journal of Neurochemistry**, v. 151, n. 1, p. 11–27, 2019.

CAN, A.; DAO, D. T.; ARAD, M.; TERRILLION, C. E.; PIANTADOSI, S. C.; GOULD, T. D. The Mouse Forced Swim Test. **Journal of Visualized Experiments**, v. 59, n. 58, 2011a.

CAN, A.; DAO, D. T.; TERRILLION, C. E.; PIANTADOSI, S. C.; BHAT, S.; GOULD, T. D. The Tail Suspension Test. **Journal of Visualized Experiments**, n. 58, 2011b.

CANNON, W. B. THE WISDOM OF THE BODY. **The American Journal of the Medical Sciences**, v. 184, n. 6, p. 864, 1932.

CAO, J.-L.; COVINGTON, H. E.; FRIEDMAN, A. K.; WILKINSON, M. B.; WALSH, J. J.; COOPER, D. C.; NESTLER, E. J.; HAN, M.-H. Mesolimbic Dopamine Neurons in the Brain Reward Circuit Mediate Susceptibility to Social Defeat and Antidepressant Action. **Journal of Neuroscience**, v. 30, n. 49, p. 16453–16458, 2010.

CASTAGNÉ, V.; MOSER, P.; ROUX, S.; PORSOLT, R. D. Rodent Models of Depression: Forced Swim and Tail Suspension Behavioral Despair Tests in Rats and Mice. **Current Protocols in Pharmacology**, v. 49, n. 1, 2010.

CATHOMAS, F.; MURROUGH, J. W.; NESTLER, E. J.; HAN, M.-H.; RUSSO, S. J. Neurobiology of Resilience: Interface Between Mind and Body. **Biological Psychiatry**, 2019.

CHARNEY, D. S.; MANJI, H. K. Life Stress, Genes, and Depression: Multiple Pathways Lead to Increased Risk and New Opportunities for Intervention. **Science Signaling**, v. 2004, n. 225, p. re5–re5, 2004.

CHEN, W.; DANG, T.; BLIND, R. D.; WANG, Z.; CAVASOTTO, C. N.; HITTELMAN, A. B.; ROGATSKY, I.; LOGAN, S. K.; GARABEDIAN, M. J. Glucocorticoid Receptor Phosphorylation Differentially Affects Target Gene Expression. **Molecular Endocrinology**, v. 22, n. 8, p. 1754–1766, 2008.

CHILDS, E.; HOHOFF, C.; DECKERT, J.; XU, K.; BADNER, J.; DE WIT, H. Association between ADORA2A and DRD2 Polymorphisms and Caffeine-Induced Anxiety. **Neuropsychopharmacology**, v. 33, n. 12, p. 2791–2800, 2008.

CHOI, K. W.; KIM, Y.-K.; JEON, H. J. Comorbid Anxiety and Depression: Clinical and Conceptual Consideration and Transdiagnostic Treatment. **Advances in Experimental Medicine and Biology**, v. 1191, p. 219–235, 2020.

- CHUANG, J.-C.; KRISHNAN, V.; YU, H. G.; MASON, B.; CUI, H.; WILKINSON, M. B.; ZIGMAN, J. M.; ELMQUIST, J. K.; NESTLER, E. J.; LUTTER, M. A  $\beta$ 3-Adrenergic-Leptin-Melanocortin Circuit Regulates Behavioral and Metabolic Changes Induced by Chronic Stress. **Biological Psychiatry**, v. 67, n. 11, p. 1075–1082, 2010.
- CIRUELA, F.; FERRÉ, S.; CASADÓ, V.; CORTÉS, A.; CUNHA, R. A.; LLUIS, C.; FRANCO, R. Heterodimeric adenosine receptors: a device to regulate neurotransmitter release. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v. 63, n. 21, p. 2427–2431, 2006.
- CIRUELA, F.; GÓMEZ-SOLER, M.; GUIDOLIN, D.; BORROTO-ESCUELA, D. O.; AGNATI, L. F.; FUXE, K.; FERNÁNDEZ-DUEÑAS, V. Adenosine receptor containing oligomers: Their role in the control of dopamine and glutamate neurotransmission in the brain. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes**, v. 1808, n. 5, p. 1245–1255, 2011.
- COBB, M. 60 years ago, Francis Crick changed the logic of biology. **PLOS Biology**, v. 15, n. 9, 2017.
- CONNOLLY, S.; KINGSBURY, T. J. Caffeine modulates CREB-dependent gene expression in developing cortical neurons. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 397, n. 2, p. 152–156, 2010.
- CONNOR, K. M.; ZHANG, W. Resilience: Determinants, Measurement, and Treatment Responsiveness. **CNS Spectrums**, v. 11, n. S12, p. 5–12, 2006.
- CORRADETTI, R.; LO CONTE, G.; MORONI, F.; BEATRICE PASSANI, M.; PEPEU, G. Adenosine decreases aspartate and glutamate release from rat hippocampal slices. **European Journal of Pharmacology**, v. 104, n. 1-2, p. 19–26, 1984.
- COSTA-NUNES, J.; ZUBAREVA, O.; ARAÚJO-CORREIA, M.; VALENÇA, A.; SCHROETER, C. A.; PAWLUSKI, J. L.; VIGNISSE, J.; STEINBUSCH, H.; HERMES, D.; PHILLIPINES, M.; STEINBUSCH, H. M. W.; STREKALOVA, T. Altered emotionality, hippocampus-dependent performance, and expression of NMDA receptor subunit mRNAs in chronically stressed mice. **Stress**, v. 17, n. 1, p. 108–116, 2013.
- COX, B. M.; ALSAWAH, F.; MCNEILL, P. C.; GALLOWAY, M. P.; PERRINE, S. A. Neurochemical, hormonal, and behavioral effects of chronic unpredictable stress in the rat. **Behavioural Brain Research**, v. 220, n. 1, p. 106–111, 2011.
- CRASKE, M. G.; RAUCH, S. L.; URSANO, R.; PRENOVEAU, J.; PINE, D. S.; ZINBARG, R. E. What is an anxiety disorder? **Depression and Anxiety**, v. 26, n. 12, p. 1066–1085, 2009.
- CRASKE, M. G.; STEIN, M. B. Anxiety. **The Lancet**, v. 388, n. 10063, p. 3048–3059, 2016.
- CRASKE, M. G.; STEIN, M. B.; ELEY, T. C.; MILAD, M. R.; HOLMES, A.; RAPEE, R. M.; WITTCHEN, H.-U. Anxiety disorders. **Nature Reviews Disease Primers**, v. 3, n. 1, 2017.

CREMA, L. M.; PETTENUZZO, L. F.; SCHLABITZ, M.; DIEHL, L.; HOPPE, J.; MESTRINER, R.; LAUREANO, D.; SALBEGO, C.; DALMAZ, C.; VENDITE, D. The effect of unpredictable chronic mild stress on depressive-like behavior and on hippocampal A1 and striatal A2A adenosine receptors. **Physiology & Behavior**, v. 109, p. 1–7, 2013.

CUNHA, R. A.; JOHANSSON, B.; VAN DER PLOEG, I.; SEBASTIÃO, A. M.; ALEXANDRE RIBEIRO, J.; FREDHOLM, B. B. Evidence for functionally important adenosine A2a receptors in the rat hippocampus. **Brain Research**, v. 649, n. 1-2, p. 208–216, 1994.

DAGYTE, G.; LUITEN, P. G.; DE JAGER, T.; GABRIEL, C.; MOCAËR, E.; DEN BOER, J. A.; VAN DER ZEE, E. A. Chronic stress, and antidepressant agomelatine induce region-specific changes in synapsin I expression in the rat brain. **Journal of Neuroscience Research**, v. 89, n. 10, p. 1646–1657, 2011.

DE KLOET, E. R.; JOËLS, M.; HOLSBOER, F. Stress and the brain: from adaptation to disease. **Nature Reviews Neuroscience**, v. 6, n. 6, p. 463–475, 2005.

DELGADO, M. R.; JOU, R. L.; PHELPS, E. A. Neural Systems Underlying Aversive Conditioning in Humans with Primary and Secondary Reinforcers. **Frontiers in Neuroscience**, v. 5, 2011.

DHAENENS, C.-M.; BURNOUF, S.; SIMONIN, C.; VAN BRUSSEL, E.; DUHAMEL, A.; DEFEBVRE, L.; DURU, C.; VUILLAUME, I.; CAZENEUVE, C.; CHARLES, P.; MAISON, P.; DEBRUXELLES, S.; VERNY, C.; GERVAIS, H.; AZULAY, J.-P.; TRANCHANT, C.; BACHOUD-LEVI, A.-C.; DÜRR, A.; BUÉE, L.; KRYSKOWIAK, P. A genetic variation in the ADORA2A gene modifies age at onset in Huntington's disease. **Neurobiology of Disease**, v. 35, n. 3, p. 474–476, 2009.

DIAS, R. B.; ROMBO, D. M.; RIBEIRO, J. A.; HENLEY, J. M.; SEBASTIÃO, A. M. Adenosine: setting the stage for plasticity. **Trends in Neurosciences**, v. 36, n. 4, p. 248–257, 2013.

DIAZ, V.; LIN, D. Neural circuits for coping with social defeat. **Current Opinion in Neurobiology**, v. 60, p. 99–107, 2020.

DOMSCHKE, K.; GAJEWSKA, A.; WINTER, B.; HERRMANN, M. J.; WARRINGS, B.; MÜHLBERGER, A.; WOSNITZA, K.; GLOTZBACH, E.; CONZELMANN, A.; DLUGOS, A.; FOBKER, M.; JACOB, C.; AROLT, V.; REIF, A.; PAULI, P.; ZWANZGER, P.; DECKERT, J. ADORA2A Gene Variation, Caffeine, and Emotional Processing: A Multi-level Interaction on Startle Reflex. **Neuropsychopharmacology**, v. 37, n. 3, p. 759–769, 2011.

DRURY, A. N.; SZENT-GYÖRGYI, A. The physiological activity of adenine compounds with especial reference to their action upon the mammalian heart1. **The Journal of Physiology**, v. 68, n. 3, p. 213–237, 1929.

DUDEK, K. A.; DION-ALBERT, L.; KAUFMANN, F. N.; TUCK, E.; LEBEL, M.; MENARD, C. Neurobiology of resilience in depression: immune and vascular insights from human and animal studies. **European Journal of Neuroscience**, 2019.

- EL YACOUBI, M.; LEDENT, C.; PARMENTIER, M.; BERTORELLI, R.; ONGINI, E.; COSTENTIN, J.; VAUGEOIS, J.-M. Adenosine A2A receptor antagonists are potential antidepressants: evidence based on pharmacology and A2A receptor knockout mice. **British Journal of Pharmacology**, v. 134, n. 1, p. 68–77, 2001.
- ERECINSKA, M. Metabolism and role of glutamate in mammalian brain. **Progress in Neurobiology**, v. 35, n. 4, p. 245–296, 1990.
- EVEN, N.; DEVAUD, J.-M.; BARRON, A. General Stress Responses in the Honeybee. **Insects**, v. 3, n. 4, p. 1271–1298, 2012.
- FANSELOW, M. S.; DONG, H.-W. Are the Dorsal and Ventral Hippocampus Functionally Distinct Structures? **Neuron**, v. 65, n. 1, p. 7–19, 2010.
- FARRAR, A. M.; SEGOVIA, K. N.; RANDALL, P. A.; NUNES, E. J.; COLLINS, L. E.; STOPPER, C. M.; PORT, R. G.; HOCKEMEYER, J.; MÜLLER, C. E.; CORREA, M.; SALAMONE, J. D. Nucleus accumbens and effort-related functions: behavioral and neural markers of the interactions between adenosine A2A and dopamine D2 receptors. **Neuroscience**, v. 166, n. 4, p. 1056–1067, 2010.
- FASTBOM, J.; PAZOS, A.; PROBST, A.; PALACIOS, J. M. Adenosine A1 receptors in the human brain: A quantitative autoradiographic study. **Neuroscience**, v. 22, n. 3, p. 827–839, 1987.
- FERRAGUTI, F.; SHIGEMOTO, R. Metabotropic glutamate receptors. **Cell and tissue research**, v. 326, n. 2, 2006.
- FERREIRA, D. D. P.; STUTZ, B.; DE MELLO, F. G.; REIS, R. A. M.; KUBRUSLY, R. C. Caffeine potentiates the release of GABA mediated by NMDA receptor activation: Involvement of A1 adenosine receptors. **Neuroscience**, v. 281, p. 208–215, 2014.
- FLORESCO, S. B. The Nucleus Accumbens: An Interface Between Cognition, Emotion, and Action. **Annual Review of Psychology**, v. 66, n. 1, p. 25–52, 2015.
- FORTE, N.; BINDA, F.; CONTESTABILE, A.; BENFENATI, F.; BALDELLI, P. Synapsin I Synchronizes GABA Release in Distinct Interneuron Subpopulations. **Cerebral Cortex**, v. 30, n. 3, p. 1393–1406, 2019.
- FOX, M. E.; FIGUEIREDO, A.; MENKEN, M. S.; LOBO, M. K. Dendritic spine density is increased on nucleus accumbens D2 neurons after chronic social defeat. **Scientific Reports**, v. 10, n. 1, 2020.
- FREDHOLM, B. B.; CHEN, J.-F.; CUNHA, R. A.; SVENNINGSSON, P.; VAUGEOIS, J.-M. Adenosine and brain function. **International Review of Neurobiology**, v. 63, p. 191–270, 2005.
- FREDHOLM, B. B.; CHERN, Y.; FRANCO, R.; SITKOVSKY, M. Aspects of the general biology of adenosine A2A signaling. **Progress in Neurobiology**, v. 83, n. 5, p. 263–276, 2007.

- FREDHOLM, B. B.; IJZERMAN, A. P.; JACOBSON, K. A.; LINDEN, J.; MÜLLER, C. E. International Union of Basic and Clinical Pharmacology. LXXXI. Nomenclature and Classification of Adenosine Receptors—An Update. **Pharmacological Reviews**, v. 63, n. 1, p. 1–34, 2011.
- FREITAG, C. M.; AGELOPOULOS, K.; HUY, E.; ROTHERMUNDT, M.; KRAKOWITZKY, P.; MEYER, J.; DECKERT, J.; VON GONTARD, A.; HOHOFF, C. Adenosine A<sub>2A</sub> receptor gene (ADORA2A) variants may increase autistic symptoms and anxiety in autism spectrum disorder. **European Child & Adolescent Psychiatry**, v. 19, n. 1, p. 67–74, 2009.
- FRITSCHY, J.-M.; HARVEY, R. J.; SCHWARZ, G. Gephyrin: where do we stand, where do we go? **Trends in Neurosciences**, v. 31, n. 5, p. 257–264, 2008.
- FUXE, K.; MARCELLINO, D.; BORROTO-ESCUELA, D. O.; GUESCINI, M.; FERNÁNDEZ-DUEÑAS, V.; TANGANELLI, S.; RIVERA, A.; CIRUELA, F.; AGNATI, L. F. Adenosine-Dopamine Interactions in the Pathophysiology and Treatment of CNS Disorders. **CNS Neuroscience & Therapeutics**, v. 16, n. 3, p. e18–e42, 2010.
- GARCÍA-PARDO, M. P.; MIÑARRO, J.; LLANSOLA, M.; FELIPO, V.; AGUILAR, M. A. Role of NMDA and AMPA glutamatergic receptors in the effects of social defeat on the rewarding properties of MDMA in mice. **European Journal of Neuroscience**, v. 50, n. 3, p. 2623–2634, 2018.
- GE, Y.; WANG, Y. T. GluA1-homomeric AMPA receptor in synaptic plasticity and neurological diseases. **Neuropharmacology**, v. 197, p. 108708, 2021.
- GERWINS, P.; FREDHOLM, B. B. Glucocorticoid receptor activation leads to up-regulation of adenosine A<sub>1</sub> receptors and down-regulation of adenosine A<sub>2</sub> responses in DDT1 MF-2 smooth muscle cells. **Molecular Pharmacology**, v. 40, n. 2, p. 149–155, 1991.
- GIMÉNEZ-LLORT, L.; FERNÁNDEZ-TERUEL, A.; ESCORIHUELA, R. M.; FREDHOLM, B. B.; TOBEÑA, A.; PEKNY, M.; JOHANSSON, B. Mice lacking the adenosine A<sub>1</sub> receptor are anxious and aggressive but are normal learners with reduced muscle strength and survival rate. **European Journal of Neuroscience**, v. 16, n. 3, p. 547–550, 2002.
- GOFF, B.; GEE, D. G.; TELZER, E. H.; HUMPHREYS, K. L.; GABARD-DURNAM, L.; FLANNERY, J.; TOTTENHAM, N. Reduced nucleus accumbens reactivity and adolescent depression following early-life stress. **Neuroscience**, v. 249, p. 129–138, 2013.
- GOLDEN, S. A.; COVINGTON, H. E.; BERTON, O.; RUSSO, S. J. A standardized protocol for repeated social defeat stress in mice. **Nature Protocols**, v. 6, n. 8, p. 1183–1191, 2011.
- GOMES, C. V.; KASTER, M. P.; TOMÉ, A. R.; AGOSTINHO, P. M.; CUNHA, R. A. Adenosine receptors and brain diseases: Neuroprotection and neurodegeneration. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes**, v. 1808, n. 5, p. 1380–1399, 2011.
- GOUIRAND, A. M.; MATUSZEWICH, L. The effects of chronic unpredictable stress on male rats in the water maze. **Physiology & Behavior**, v. 86, n. 1-2, p. 21–31, 2005.

- GUBERT, C.; JACINTHO MORITZ, C. E.; VASCONCELOS-MORENO, M. P.; QUADROS DOS SANTOS, B. T. M.; SARTORI, J.; FIJTMAN, A.; KAUER-SANT'ANNA, M.; KAPCZINSKI, F.; BATTASTINI, A. M. O.; MAGALHÃES, P. V. da S. Peripheral adenosine levels in euthymic patients with bipolar disorder. **Psychiatry Research**, v. 246, p. 421–426, 2016.
- GURURAJAN, A.; VAN DE WOUW, M.; BOEHME, M.; BECKER, T.; O'CONNOR, R.; BASTIAANSEN, T. F. S.; MOLONEY, G. M.; LYTE, J. M.; VENTURA SILVA, A. P.; MERCKX, B.; DINAN, T. G.; CRYAN, J. F. Resilience to chronic stress is associated with specific neurobiological, neuroendocrine, and immune responses. **Brain, Behavior, and Immunity**, v. 80, p. 583–594, 2019.
- HALL, C. S. Emotional behavior in the rat. III. The relationship between emotionality and ambulatory activity. **Journal of Comparative Psychology**, v. 22, n. 3, p. 345–352, 1936.
- HALLER, J.; BAKOS, N. Stress-induced social avoidance. **Physiology & Behavior**, v. 77, n. 2-3, p. 327–332, 2002.
- HAMILTON, P. J.; CHEN, E. Y.; TOLSTIKOV, V.; PEÑA, C. J.; PICONE, J. A.; SHAH, P.; PANAGOPOULOS, K.; STRAT, A. N.; WALKER, D. M.; LORSCH, Z. S.; ROBINSON, H. L.; MERVOSH, N. L.; KIRALY, D. D.; SARANGARAJAN, R.; NARAIN, N. R.; KIEBISH, M. A.; NESTLER, E. J. Chronic stress and antidepressant treatment alter purine metabolism and beta oxidation within mouse brain and serum. **Scientific Reports**, v. 10, n. 1, 2020.
- HAMILTON, S. P.; SLAGER, S. L.; DE LEON, A. B.; HEIMAN, G. A.; KLEIN, D. F.; HODGE, S. E.; WEISSMAN, M. M.; FYER, A. J.; KNOWLES, J. A. Evidence for Genetic Linkage Between a Polymorphism in the Adenosine 2A Receptor and Panic Disorder. **Neuropsychopharmacology**, v. 29, n. 3, p. 558–565, 2003.
- HAMON, M.; BLIER, P. Monoamine neurocircuitry in depression and strategies for new treatments. **Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry**, v. 45, p. 54–63, 2013.
- HAN, M.-H.; RUSSO, S. J.; NESTLER, E. J. Molecular, Cellular, and Circuit Basis of Depression Susceptibility and Resilience. **Neurobiology of Depression**, p. 123–136, 2019.
- HAN, Q.-Q.; YANG, L.; HUANG, H.-J.; WANG, Y.-L.; YU, R.; WANG, J.; PILOT, A.; WU, G.-C.; LIU, Q.; YU, J. Differential GR Expression and Translocation in the Hippocampus Mediates Susceptibility vs. Resilience to Chronic Social Defeat Stress. **Frontiers in Neuroscience**, v. 11, 2017.
- HAN, X.; SHAO, W.; LIU, Z.; FAN, S.; YU, J.; CHEN, J.; QIAO, R.; ZHOU, J.; XIE, P. iTRAQ-based quantitative analysis of hippocampal postsynaptic density-associated proteins in a rat chronic mild stress model of depression. **Neuroscience**, v. 298, p. 220–292, 2015.
- HANDLEY, S. L.; MITHANI, S. Effects of alpha-adrenoceptor agonists and antagonists in a maze-exploration model of fear-motivated behaviour. **Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology**, v. 327, n. 1, p. 1–5, 1984.

HASEGAWA, S.; YOSHIMI, A.; MOURI, A.; UCHIDA, Y.; HIDA, H.; MISHINA, M.; YAMADA, K.; OZAKI, N.; NABESHIMA, T.; NODA, Y. Acute administration of ketamine attenuates the impairment of social behaviors induced by social defeat stress exposure as juveniles via activation of  $\alpha$ -amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionic acid (AMPA) receptors. **Neuropharmacology**, v. 148, p. 107–116, 2019.

HASKÓ, G.; LINDEN, J.; CRONSTEIN, B.; PACHER, P. Adenosine receptors: therapeutic aspects for inflammatory and immune diseases. **Nature reviews. Drug discovery**, v. 7, n. 9, p. 759–770, 2008.

HENDERSON, C.; EVANS-LACKO, S.; THORNICROFT, G. Mental Illness Stigma, Help Seeking, and Public Health Programs. **American Journal of Public Health**, v. 103, n. 5, p. 777–780, 2013.

HESHMATI, M.; CHRISTOFFEL, D. J.; LECLAIR, K.; CATHOMAS, F.; GOLDEN, S. A.; ALEYASIN, H.; TURECKI, G.; FRIEDMAN, A. K.; HAN, M.-H.; MENARD, C.; RUSSO, S. J. Depression and Social Defeat Stress Are Associated with Inhibitory Synaptic Changes in the Nucleus Accumbens. **The Journal of Neuroscience**, v. 40, n. 32, p. 6228–6233, 2020.

HING, B.; BRAUN, P.; CORDNER, Z. A.; EWALD, E. R.; MOODY, L.; MCKANE, M.; WILLOUR, V. L.; TAMASHIRO, K. L.; POTASH, J. B. Chronic social stress induces DNA methylation changes at an evolutionary conserved intergenic region in chromosome X. **Epigenetics**, v. 13, n. 6, p. 627–641, 2018.

HODES, G. E.; PFAU, M. L.; LEBOEUF, M.; GOLDEN, S. A.; CHRISTOFFEL, D. J.; BREGMAN, D.; REBUSI, N.; HESHMATI, M.; ALEYASIN, H.; WARREN, B. L.; LABONTÉ, B.; HORN, S.; LAPIDUS, K. A.; STELZHAMMER, V.; WONG, E. H. F.; BAHN, S.; KRISHNAN, V.; BOLAÑOS-GUZMAN, C. A.; MURROUGH, J. W.; MERAD, M. Individual differences in the peripheral immune system promote resilience versus susceptibility to social stress. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 111, n. 45, p. 16136–16141, 2014.

HOHOFF, C.; KROLL, T.; ZHAO, B.; KERKENBERG, N.; LANG, I.; SCHWARTE, K.; ELMENHORST, D.; ELMENHORST, E.-M.; AESCHBACH, D.; ZHANG, W.; BAUNE, B. T.; NEUMAIER, B.; BAUER, A.; DECKERT, J. ADORA2A variation and adenosine A1 receptor availability in the human brain with a focus on anxiety-related brain regions: modulation by ADORA1 variation. **Translational Psychiatry**, v. 10, n. 1, 2020.

HUANG, G.-B.; ZHAO, T.; GAO, X.-L.; ZHANG, H.-X.; XU, Y.-M.; LI, H.; LV, L.-X. Effect of chronic social defeat stress on behaviors and dopamine receptor in adult mice. **Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry**, v. 66, p. 73–79, 2016.

HUANG, G.-B.; ZHAO, T.; MUNA, S. S.; BAGALKOT, T. R.; JIN, H.-M.; CHAE, H.-J.; CHUNG, Y.-C. Effects of chronic social defeat stress on behaviour, endoplasmic reticulum proteins and choline acetyltransferase in adolescent mice. **International Journal of Neuropsychopharmacology**, v. 16, n. 7, p. 1635–1647, 2013.

HUANG, Z.; XIE, N.; ILLES, P.; DI VIRGILIO, F.; ULRICH, H.; SEMYANOV, A.; VERKHRATSKY, A.; SPERLAGH, B.; YU, S.-G.; HUANG, C.; TANG, Y. From purines to

purinergic signalling: molecular functions and human diseases. **Signal Transduction and Targeted Therapy**, v. 6, n. 1, 2021.

IIO, W.; MATSUKAWA, N.; TSUKAHARA, T.; KOHARI, D.; TOYODA, A. Effects of chronic social defeat stress on MAP kinase cascade. **Neuroscience Letters**, v. 504, n. 3, p. 281–284, 2011.

ISMAILI, N.; GARABEDIAN, M. J. Modulation of Glucocorticoid Receptor Function via Phosphorylation. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 1024, n. 1, p. 86–101, 2004.

JAVITT, D. C. Glutamate as a therapeutic target in psychiatric disorders. **Molecular Psychiatry**, v. 9, n. 11, p. 984–997, 2004.

JEONG, H.-J.; JANG, I.-S.; NABEKURA, J.; AKAIKE, N. Adenosine A1 receptor-Mediated Presynaptic Inhibition of GABAergic Transmission in Immature Rat Hippocampal CA1 Neurons. **Journal of Neurophysiology**, v. 89, n. 3, p. 1214–1222, 2003.

JIANHUA, F.; WEI, W.; XIAOMEI, L.; SHAO-HUI, W. Chronic social defeat stress leads to changes of behaviour and memory-associated proteins of young mice. **Behavioural Brain Research**, v. 316, p. 136–144, 2017.

JOHANSSON, B.; HALLDNER, L.; DUNWIDDIE, T. V.; MASINO, S. A.; POELCHEN, W.; GIMENEZ-LLORT, L.; ESCORIHUELA, R. M.; FERNANDEZ-TERUEL, A.; WIESENFELD-HALLIN, Z.; XU, X.-J.; HARDEMARK, A.; BETSHOLTZ, C.; HERLENIUS, E.; FREDHOLM, B. B. Hyperalgesia, anxiety, and decreased hypoxic neuroprotection in mice lacking the adenosine A1 receptor. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 98, n. 16, p. 9407–9412, 2001.

KASTER, M. P.; BUDNI, J.; GAZAL, M.; CUNHA, M. P.; SANTOS, A. R. S.; RODRIGUES, A. L. S. The antidepressant-like effect of inosine in the FST is associated with both adenosine A1 and A2A receptors. **Purinergic Signalling**, v. 9, n. 3, p. 481–486, 2013.

KASTER, M. P.; BUDNI, J.; SANTOS, A. R. S.; RODRIGUES, A. L. S. Pharmacological evidence for the involvement of the opioid system in the antidepressant-like effect of adenosine in the mouse forced swimming test. **European Journal of Pharmacology**, v. 576, n. 1-3, p. 91–98, 2007.

KASTER, M. P.; MACHADO, D. G.; SANTOS, A. R. S.; RODRIGUES, A. L. S. Involvement of NMDA receptors in the antidepressant-like action of adenosine. **Pharmacological Reports**, v. 64, n. 3, p. 706–713, 2012.

KASTER, M. P.; MACHADO, N. J.; SILVA, H. B.; NUNES, A.; ARDAIS, A. P.; SANTANA, M.; BAQI, Y.; MÜLLER, C. E.; RODRIGUES, A. L. S.; PORCIÚNCULA, L. O.; CHEN, J. F.; TOMÉ, Â. R.; AGOSTINHO, P.; CANAS, P. M.; CUNHA, R. A. Caffeine acts through neuronal adenosine A2A receptors to prevent mood and memory dysfunction triggered by chronic stress. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 112, n. 25, p. 7833–7838, 2015.

- KASTER, M. P.; ROSA, A. O.; ROSSO, M. M.; GOULART, E. C.; SANTOS, A. R. S.; RODRIGUES, A. L. S. Adenosine administration produces an antidepressant-like effect in mice: evidence for the involvement of A1 and A2A receptors. **Neuroscience Letters**, v. 355, n. 1-2, p. 21–24, 2004.
- KASTER, M. P.; SANTOS, A. R. S.; RODRIGUES, A. L. S. Involvement of 5-HT1A receptors in the antidepressant-like effect of adenosine in the mouse forced swimming test. **Brain Research Bulletin**, v. 67, n. 1-2, p. 53–61, 2005.
- KAUFMAN, J.; CHARNEY, D. Comorbidity of mood and anxiety disorders. **Depression and Anxiety**, v. 12, n. S1, p. 69–76, 2000.
- KENWORTHY, C. A.; SENGUPTA, A.; LUZ, S. M.; VER HOEVE, E. S.; MEDA, K.; BHATNAGAR, S.; ABEL, T. Social defeat induces changes in histone acetylation and expression of histone modifying enzymes in the ventral hippocampus, prefrontal cortex, and dorsal raphe nucleus. **Neuroscience**, v. 264, p. 88–98, 2014.
- KESSELS, H. W.; MALINOW, R. Synaptic AMPA Receptor Plasticity and Behavior. **Neuron**, v. 61, n. 3, p. 340–350, 2009.
- KESSLER, R. C. The Costs of Depression. **Psychiatric Clinics of North America**, v. 35, n. 1, p. 1–14, 2012.
- KESSLER, R. C.; MERIKANGAS, K. R.; WANG, P. S. Prevalence, Comorbidity, and Service Utilization for Mood Disorders in the United States at the Beginning of the Twenty-first Century. **Annual Review of Clinical Psychology**, v. 3, n. 1, p. 137–158, 2007.
- KEW, J. N. C.; KEMP, J. A. Ionotropic and metabotropic glutamate receptor structure and pharmacology. **Psychopharmacology**, v. 179, n. 1, p. 4–29, 2005.
- KIM, E. J.; PELLMAN, B.; KIM, J. J. Stress effects on the hippocampus: a critical review. **Learning & Memory**, v. 22, n. 9, p. 411–416, 2015.
- KINO, T. Stress, glucocorticoid hormones, and hippocampal neural progenitor cells: implications to mood disorders. **Frontiers in Physiology**, v. 6, 2015.
- KNIERIM, J. J. The hippocampus. **Current Biology**, v. 25, n. 23, p. R1116–R1121, 2015.
- KOOLHAAS, J. M. Coping style and immunity in animals: Making sense of individual variation. **Brain, Behavior, and Immunity**, v. 22, n. 5, p. 662–667, 2008.
- KOOLHAAS, J. M.; BARTOLOMUCCI, A.; BUWALDA, B.; DE BOER, S. F.; FLÜGGE, G.; KORTE, S. M.; MEERLO, P.; MURISON, R.; OLIVIER, B.; PALANZA, P.; RICHTER-LEVIN, G.; SGOIFO, A.; STEIMER, T.; STIEDL, O.; VAN DIJK, G.; WÖHR, M.; FUCHS, E. Stress revisited: A critical evaluation of the stress concept. **Neuroscience & Biobehavioral Reviews**, v. 35, n. 5, p. 1291–1301, 2011.
- KOUPENOVA, M.; RAVID, K. Adenosine, Adenosine Receptors and Their Role in Glucose Homeostasis and Lipid Metabolism. **Journal of Cellular Physiology**, v. 228, n. 8, p. 1703–1712, 2013.

KRISHNAN, V.; HAN, M.-H.; GRAHAM, D. L.; BERTON, O.; RENTHAL, W.; RUSSO, S. J.; LAPLANT, Q.; GRAHAM, A.; LUTTER, M.; LAGACE, D. C.; GHOSE, S.; REISTER, R.; TANNOUS, P.; GREEN, T. A.; NEVE, R. L.; CHAKRAVARTY, S.; KUMAR, A.; EISCH, A. J.; SELF, D. W.; LEE, F. S. Molecular adaptations underlying susceptibility and resistance to social defeat in brain reward regions. **Cell**, v. 131, n. 2, p. 391–404, 2007.

KRISHNAN, V.; NESTLER, E. J. The molecular neurobiology of depression. **Nature**, v. 455, n. 7215, p. 894–902, 2008.

KRZYŚCIAK, W. Activity of selected aromatic amino acids in biological systems. **Acta Biochimica Polonica**, v. 58, n. 4, 2011.

LAM, P.; HONG, C.-J.; TSAI, S.-J. Association study of A2a adenosine receptor genetic polymorphism in panic disorder. **Neuroscience Letters**, v. 378, n. 2, p. 98–101, 2005.

LAROSA, A.; WONG, T. P. The hippocampus in stress susceptibility and resilience: Reviewing molecular and functional markers. **Progress in Neuro-Psychopharmacology & Biological Psychiatry**, v. 119, p. 110601, 2022.

LAZARUS, R. S. From Psychological Stress to the Emotions: A History of Changing Outlooks. **Annual Review of Psychology**, v. 44, n. 1, p. 1–22, 1993.

LECLAIR, K. B.; CHAN, K. L.; KASTER, M. P.; PARISE, L. F.; BURNETT, C. J.; RUSSO, S. J. Individual history of winning and hierarchy landscape influence stress susceptibility in mice. **ProQuest**, 2021.

LEDENT, C.; VAUGEOIS, J.-M.; SCHIFFMANN, S. N.; PEDRAZZINI, T.; YACOUBI, M. E.; VANDERHAEGHEN, J.-J.; COSTENTIN, J.; HEATH, J. K.; VASSART, G.; PARMENTIER, M. Aggressiveness, hypoalgesia and high blood pressure in mice lacking the adenosine A 2a receptor. **Nature**, v. 388, n. 6643, p. 674–678, 1997.

LEE, C.-W.; FANG, Y.-P.; CHU, M.-C.; CHUNG, Y.-J.; CHI, H.; TANG, C.-W.; SO, E. C.; LIN, H.-C.; LIN, H.-C. Differential mechanisms of synaptic plasticity for susceptibility and resilience to chronic social defeat stress in male mice. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 562, p. 112–118, 2021.

LEE, H.-K.; TAKAMIYA, K.; HE, K.; SONG, L.; HUGANIR, R. L. Specific Roles of AMPA Receptor Subunit GluR1 (GluA1) Phosphorylation Sites in Regulating Synaptic Plasticity in the CA1 Region of Hippocampus. **Journal of Neurophysiology**, v. 103, n. 1, p. 479–489, 2010.

LEVENE, P. A.; TIPSON, R. S. The Ring Structure of Adenosine. **Science**, v. 74, n. 1925, p. 521–521, 1931.

LEVINE, S. Developmental determinants of sensitivity and resistance to stress. **Psychoneuroendocrinology**, v. 30, n. 10, p. 939–946, 2005.

LEVINE, S.; URSIN, H. **What is stress?** New York: Stress: Neurobiology and Neuroendocrinology, p. 3–21, 1991.

LEVITA, L.; HOSKIN, R.; CHAMPI, S. Avoidance of harm and anxiety: A role for the nucleus accumbens. **NeuroImage**, v. 62, n. 1, p. 189–198, 2012.

LEVONE, B. R.; CRYAN, J. F.; O'LEARY, O. F. Role of adult hippocampal neurogenesis in stress resilience. **Neurobiology of Stress**, v. 1, p. 147–155, 2015.

LI, P.; RIAL, D.; CANAS, P. M.; YOO, J.-H.; LI, W.; ZHOU, X.; WANG, Y.; VAN WESTEN, G. J. P.; PAYEN, M.-P.; AUGUSTO, E.; GONÇALVES, N.; TOMÉ, A. R.; LI, Z.; WU, Z.; HOU, X.; ZHOU, Y.; PIJZERMAN, A.; BOYDEN, E. S.; CUNHA, R. A.; QU, J. Optogenetic activation of intracellular adenosine A2A receptor signaling in the hippocampus is sufficient to trigger CREB phosphorylation and impair memory. **Molecular Psychiatry**, v. 20, n. 11, p. 1339–1349, 2015.

LIU, M.-Y.; YIN, C.-Y.; ZHU, L.-J.; ZHU, X.-H.; XU, C.; LUO, C.-X.; CHEN, H.; ZHU, D.-Y.; ZHOU, Q.-G. Sucrose preference test for measurement of stress-induced anhedonia in mice. **Nature Protocols**, v. 13, n. 7, p. 1686–1698, 2018.

LIU, Q.-S.; DENG, R.; FAN, Y.; LI, K.; MENG, F.; LI, X.; LIU, R. Low dose of caffeine enhances the efficacy of antidepressants in major depressive disorder and the underlying neural substrates. **Molecular Nutrition & Food Research**, v. 61, n. 8, p. 1600910, 2017.

LOBO, M. K.; KARSTEN, S. L.; GRAY, M.; GESCHWIND, D. H.; YANG, X. W. FACS-array profiling of striatal projection neuron subtypes in juvenile and adult mouse brains. **Nature Neuroscience**, v. 9, n. 3, p. 443–452, 2006.

LOPES, L. V.; CUNHA, R. A.; KULL, B.; FREDHOLM, B. B.; RIBEIRO, J. A. Adenosine A2A receptor facilitation of hippocampal synaptic transmission is dependent on tonic A1 receptor inhibition. **Neuroscience**, v. 112, n. 2, p. 319–329, 2002.

LOPES, L. V.; SEBASTIAO, A. M.; RIBEIRO, J. A. Adenosine and Related Drugs in Brain Diseases: Present and Future in Clinical Trials. **Current Topics in Medicinal Chemistry**, v. 11, n. 8, p. 1087–1101, 2011.

LÓPEZ-CRUZ, L.; CARBÓ-GAS, M.; PARDO, M.; BAYARRI, P.; VALVERDE, O.; LEDENT, C.; SALAMONE, J. D.; CORREA, M. Adenosine A 2A receptor deletion affects social behaviors and anxiety in mice: Involvement of anterior cingulate cortex and amygdala. **Behavioural Brain Research**, v. 321, p. 8–17, 2017.

LÓPEZ-CRUZ, L.; SALAMONE, J. D.; CORREA, M. Caffeine and Selective Adenosine Receptor Antagonists as New Therapeutic Tools for the Motivational Symptoms of Depression. **Frontiers in Pharmacology**, v. 9, 2018.

LOWRY, O. H.; ROSEBROUGH, N. J.; FARR, A. L.; RANDALL, R. J. Protein measurement with the Folin phenol reagent. **Journal of Biological Chemistry**, v. 193, n. 1, p. 265–275, 1951.

LUTTER, M.; SAKATA, I.; OSBORNE-LAWRENCE, S.; ROVINSKY, S. A.; ANDERSON, J. G.; JUNG, S.; BIRNBAUM, S.; YANAGISAWA, M.; ELMQUIST, J. K.; NESTLER, E. J.; ZIGMAN, J. M. The orexigenic hormone ghrelin defends against depressive symptoms of chronic stress. **Nature Neuroscience**, v. 11, n. 7, p. 752–753, 2008.

- MACHADO, A.; HERRERA, A. J.; DE PABLOS, R. M.; ESPINOSA-OLIVA, A. M.; SARMIENTO, M.; AYALA, A.; VENERO, J. L.; SANTIAGO, M.; VILLARÁN, R. F.; DELGADO-CORTÉS, M. J.; ARGÜELLES, S.; CANO, J. Chronic stress as a risk factor for Alzheimer's disease. **Reviews in the Neurosciences**, v. 25, n. 6, 2014.
- MAIER, T.; GÜELL, M.; SERRANO, L. Correlation of mRNA and protein in complex biological samples. **FEBS Letters**, v. 583, n. 24, p. 3966–3973, 2009.
- MANNERS, M. T.; BRYNILDSEN, J. K.; SCHECHTER, M.; LIU, X.; EACRET, D.; BLENDY, J. A. CREB deletion increases resilience to stress and downregulates inflammatory gene expression in the hippocampus. **Brain, Behavior, and Immunity**, v. 81, p. 388–398, 2019.
- MARTIN, V.; ALLAÏLI, N.; EUVRARD, M.; MARDAY, T.; RIFFAUD, A.; FRANC, B.; MOCAËR, E.; GABRIEL, C.; FOSSATI, P.; LEHERICY, S.; LANFUMEY, L. Effect of agomelatine on memory deficits and hippocampal gene expression induced by chronic social defeat stress in mice. **Scientific Reports**, v. 7, n. 1, 2017.
- MARTINOWICH, K.; MANJI, H.; LU, B. New insights into BDNF function in depression and anxiety. **Nature Neuroscience**, v. 10, n. 9, p. 1089–1093, 2007.
- MASON, J. W. A Historical View of the Stress Field. **Journal of Human Stress**, v. 1, n. 2, p. 22–36, 1975.
- MASTEN, A. S. Ordinary magic: Resilience processes in development. **American Psychologist**, v. 56, n. 3, p. 227–238, 2001.
- MATOS, M.; AUGUSTO, E.; SANTOS-RODRIGUES, A. D.; SCHWARZSCHILD, M. A.; CHEN, J.-F.; CUNHA, R. A.; AGOSTINHO, P. Adenosine A2A receptors modulate glutamate uptake in cultured astrocytes and gliosomes. **Glia**, v. 60, n. 5, p. 702–716, 2012.
- MCEWEN, B. 213. Protective and damaging effects of mediators of stress and adaptation: Central role of the brain. **Brain, Behavior, and Immunity**, v. 25, p. S240, 2011.
- MCEWEN, B. S.; GRAY, J. D.; NASCA, C. Recognizing resilience: Learning from the effects of stress on the brain. **Neurobiology of Stress**, v. 1, p. 1–11, 2015.
- MCEWEN, B. S.; STELLAR, E. Stress and the individual. Mechanisms leading to disease. **Archives of Internal Medicine**, v. 153, n. 18, p. 2093–2101, 1993.
- MCEWEN, B. S.; WINGFIELD, J. C. The concept of allostasis in biology and biomedicine. **Hormones and Behavior**, v. 43, n. 1, p. 2–15, 2003.
- MCEWEN, B. Stress, Adaptation, and Disease: Allostasis and Allostatic Load. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 840, n. 1, p. 33–44, 1998.
- MEHRA, A.; LEE, K. H.; HATZIMANIKATIS, V. Insights into the relation between mRNA and protein expression patterns: I. theoretical considerations. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 84, n. 7, p. 822–833, 2003.

- MÉNARD, C.; PFAU, M. L.; HODES, G. E.; RUSSO, S. J. Immune and Neuroendocrine Mechanisms of Stress Vulnerability and Resilience. **Neuropsychopharmacology**, v. 42, n. 1, p. 62–80, 2016.
- MEYER, U.; VAN KAMPEN, M.; ISOVICH, E.; FLÜGGE, G.; FUCHS, E. Chronic psychosocial stress regulates the expression of both GR and MR mRNA in the hippocampal formation of tree shrews. **Hippocampus**, v. 11, n. 3, p. 329–336, 2001.
- MONLEÓN, S.; DUQUE, A.; VINADER-CAEROLS, C. Effects of several degrees of chronic social defeat stress on emotional and spatial memory in CD1 mice. **Behavioural Processes**, v. 124, p. 23–31, 2016.
- MÖNNIKES, H.; TEBBE, J. J.; HILDEBRANDT, M.; ARCK, P.; OSMANOGLU, E.; ROSE, M.; KLAPP, B.; WIEDENMANN, B.; HEYMANN-MÖNNIKES, I. Role of Stress in Functional Gastrointestinal Disorders. **Digestive Diseases**, v. 19, n. 3, p. 201–211, 2001.
- MONTEIRO, S.; ROQUE, S.; DE SÃŁ-CALÃŞADA, D.; SOUSA, N.; CORREIA-NEVES, M.; CERQUEIRA, J. J. An Efficient Chronic Unpredictable Stress Protocol to Induce Stress-Related Responses in C57BL/6 Mice. **Frontiers in Psychiatry**, v. 6, 2015.
- MONTGOMERY, K. C. The relation between fear induced by novel stimulation and exploratory drive. **Journal of Comparative and Physiological Psychology**, v. 48, n. 4, p. 254–260, 1955.
- MOSER, M.-B.; MOSER, E. I. Functional differentiation in the hippocampus. **Hippocampus**, v. 8, n. 6, p. 608–619, 1998.
- MUHAMMAD, A.; CARROLL, C.; KOLB, B. Stress during development alters dendritic morphology in the nucleus accumbens and prefrontal cortex. **Neuroscience**, v. 216, p. 103–109, 2012.
- MUIR, J.; TSE, Y. C.; IYER, E. S.; BIRIS, J.; CVETKOVSKA, V.; LOPEZ, J.; BAGOT, R. C. Ventral Hippocampal Afferents to Nucleus Accumbens Encode Both Latent Vulnerability and Stress-Induced Susceptibility. **Biological Psychiatry**, v. 88, n. 11, p. 843–854, 2020.
- MURISON, R. The Neurobiology of Stress. **Neuroscience of Pain, Stress, and Emotion**, p. 29–49, 2016.
- MURROUGH, J. W.; ABDALLAH, C. G.; MATHEW, S. J. Targeting glutamate signalling in depression: progress and prospects. **Nature Reviews Drug Discovery**, v. 16, n. 7, p. 472–486, 2017.
- NAGAYAMA, H.; KANO, O.; MURAKAMI, H.; ONO, K.; HAMADA, M.; TODA, T.; SENGOKU, R.; SHIMO, Y.; HATTORI, N. Effect of istradefylline on mood disorders in Parkinson's disease. **Journal of the Neurological Sciences**, v. 396, p. 78–83, 2019.
- NAKANISHI, S.; NAKAJIMA, Y.; MASU, M.; YOSHIKI UEDA; NAKAHARA, K.; WATANABE, D.; YAMAGUCHI, S.; KAWABATA, S.; OKADA, M. Glutamate receptors: brain function and signal transduction. **Brain Research Reviews**, v. 26, n. 2-3, p. 230–235, 1998.

- NAKATAKE, Y.; FURUIE, H.; YAMADA, M.; KUNIISHI, H.; UKEZONO, M.; YOSHIZAWA, K.; YAMADA, M. The effects of emotional stress are not identical to those of physical stress in mouse model of social defeat stress. **Neuroscience Research**, v. 158, p. 56–63, 2020.
- NAM, H.; CHANDRA, R.; FRANCIS, T. C.; DIAS, C.; CHEER, J. F.; LOBO, M. K. Reduced nucleus accumbens enkephalins underlie vulnerability to social defeat stress. **Neuropsychopharmacology**, v. 44, n. 11, p. 1876–1885, 2019.
- NASCA, C.; MENARD, C.; HODES, G.; BIGIO, B.; PENA, C.; LORSCH, Z.; ZELLI, D.; FERRIS, A.; KANA, V.; PURUSHOTHAMAN, I.; DOBBIN, J.; NASSIM, M.; DEANGELIS, P.; MERAD, M.; RASGON, N.; MEANEY, M.; NESTLER, E. J.; MCEWEN, B. S.; RUSSO, S. J. Multidimensional Predictors of Susceptibility and Resilience to Social Defeat Stress. **Biological Psychiatry**, v. 86, n. 6, p. 483–491, 2019.
- NICHOLS, R. A.; CHILCOTE, T. J.; CZERNIK, A. J.; GREENGARD, P. Synapsin I Regulates Glutamate Release from Rat Brain Synaptosomes. **Journal of Neurochemistry**, v. 58, n. 2, p. 783–785, 1992.
- O'NEILL, C. E.; LETENDRE, M. L.; BACHTELL, R. K. Adenosine A2A Receptors in the Nucleus Accumbens Bi-Directionally Alter Cocaine Seeking in Rats. **Neuropsychopharmacology**, v. 37, n. 5, p. 1245–1256, 2011.
- OBRENOVITCH, T. P.; URENJAK, J.; ZILKHA, E.; JAY, T. M. Excitotoxicity in neurological disorders — the glutamate paradox. **International Journal of Developmental Neuroscience**, v. 18, n. 2, p. 281–287, 2000.
- OHTA, A.; SITKOVSKY, M. Role of G-protein-coupled adenosine receptors in downregulation of inflammation and protection from tissue damage. **Nature**, v. 414, n. 6866, p. 916–920, 2001.
- OIZUMI, H.; KURIYAMA, N.; IMAMURA, S.; TABUCHI, M.; OMIYA, Y.; MIZOGUCHI, K.; KOBAYASHI, H. Influence of aging on the behavioral phenotypes of C57BL/6J mice after social defeat. **PLOS ONE**, v. 14, n. 9, p. e0222076, 2019.
- OLIVEIRA, S.; ARDAIS, A. P.; BASTOS, C. R.; GAZAL, M.; JANSEN, K.; DE MATTOS SOUZA, L.; DA SILVA, R. A.; KASTER, M. P.; LARA, D. R.; GHISLENI, G. Impact of genetic variations in ADORA2A gene on depression and symptoms: a cross-sectional population-based study. **Purinergic Signalling**, v. 15, n. 1, p. 37–44, 2018.
- OLLOQUEQUI, J.; CORNEJO-CÓRDOVA, E.; VERDAGUER, E.; SORIANO, F. X.; BINVIGNAT, O.; AULADELL, C.; CAMINS, A. Excitotoxicity in the pathogenesis of neurological and psychiatric disorders: Therapeutic implications. **Journal of Psychopharmacology**, v. 32, n. 3, p. 265–275, 2018.
- OMATA, Y.; AOKI, R.; AOKI-YOSHIDA, A.; HIEMORI, K.; TOYODA, A.; TATENO, H.; SUZUKI, C.; TAKAYAMA, Y. Reduced fucosylation in the distal intestinal epithelium of mice subjected to chronic social defeat stress. **Scientific Reports**, v. 8, n. 1, 2018.

- PAGLIUSI JR., M. O.; SARTORI, C. Social Defeat Stress (SDS) in Mice: Using Swiss Mice as Resident. **BIO-PROTOCOL**, v. 9, n. 6, 2019.
- PAGLIUSI, M.; BONET, I. J. M.; BRANDÃO, A. F.; MAGALHÃES, S. F.; TAMBELI, C. H.; PARADA, C. A.; SARTORI, C. R. Therapeutic and Preventive Effect of Voluntary Running Wheel Exercise on Social Defeat Stress (SDS)-induced Depressive-like Behavior and Chronic Pain in Mice. **Neuroscience**, v. 428, p. 165–177, 2020.
- PAOLETTI, P.; NEYTON, J. NMDA receptor subunits: function and pharmacology. **Current Opinion in Pharmacology**, v. 7, n. 1, p. 39–47, 2007.
- PAPILLOUD, A.; WEGER, M.; BACQ, A.; ZALACHORAS, I.; HOLLIS, F.; LARRIEU, T.; BATTIVELLI, D.; GROSSE, J.; ZANOLETTI, O.; PARNAUDEAU, S.; TRONCHE, F.; SANDI, C. The glucocorticoid receptor in the nucleus accumbens plays a crucial role in social rank attainment in rodents. **Psychoneuroendocrinology**, v. 112, p. 104538, 2020.
- PATTERSON, Z. R.; KHAZALL, R.; MACKAY, H.; ANISMAN, H.; ABIZAID, A. Central Ghrelin Signaling Mediates the Metabolic Response of C57BL/6 Male Mice to Chronic Social Defeat Stress. **Endocrinology**, v. 154, n. 3, p. 1080–1091, 2013.
- PAXINOS, G.; WATSON, C. **The rat brain in stereotaxic coordinates**. London, United Kingdom; San Diego, Ca: Elsevier Academic Press, 2018.
- PEDATA, F.; CORSI, C.; MELANI, A.; BORDONI, F.; LATINI, S. Adenosine Extracellular Brain Concentrations and Role of A2A Receptors in Ischemia. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 939, n. 1, p. 74–84, 2006.
- PELLOW, S.; CHOPIN, P.; FILE, S. E.; BRILEY, M. Validation of open: closed arm entries in an elevated plus-maze as a measure of anxiety in the rat. **Journal of Neuroscience Methods**, v. 14, n. 3, p. 149–167, 1985.
- PENNARTZ, C.; GROENEWEGEN, H.; LOPESDASILVA, F. The nucleus accumbens as a complex of functionally distinct neuronal ensembles: An integration of behavioural, electrophysiological and anatomical data. **Progress in Neurobiology**, v. 42, n. 6, p. 719–761, 1994.
- PENTKOWSKI, N. S.; BLANCHARD, D. C.; LEVER, C.; LITVIN, Y.; BLANCHARD, R. J. Effects of lesions to the dorsal and ventral hippocampus on defensive behaviors in rats. **European Journal of Neuroscience**, v. 23, n. 8, p. 2185–2196, 2006.
- PÉREZ-NIEVAS, B. G.; GARCÍA-BUENO, B.; CASO, J. R.; MENCHÉN, L.; LEZA, J. C. Corticosterone as a marker of susceptibility to oxidative/nitrosative cerebral damage after stress exposure in rats. **Psychoneuroendocrinology**, v. 32, n. 6, p. 703–711, 2007.
- PFAU, M. L.; RUSSO, S. J. Peripheral and central mechanisms of stress resilience. **Neurobiology of Stress**, v. 1, p. 66–79, 2015.
- PHILLIS, J. W. **Adenosine and Adenine Nucleotides As Regulators of Cellular Function**: CRC Press, 1991.

POPOLI, P.; BETTO, P.; REGGIO, R.; RICCIARELLO, G. Adenosine A2A receptor stimulation enhances striatal extracellular glutamate levels in rats. **European Journal of Pharmacology**, v. 287, n. 2, p. 215–217, 1995.

QU, Y.; YANG, C.; REN, Q.; MA, M.; DONG, C.; HASHIMOTO, K. Regional differences in dendritic spine density confer resilience to chronic social defeat stress. **Acta Neuropsychiatrica**, v. 30, n. 2, p. 117–122, 2017.

REBOLA, N.; CANAS, P. M.; OLIVEIRA, C. R.; CUNHA, R. A. Different synaptic and subsynaptic localization of adenosine A2A receptors in the hippocampus and striatum of the rat. **Neuroscience**, v. 132, n. 4, p. 893–903, 2005.

REGUILÓN, M. D.; BALLESTÍN, R.; MIÑARRO, J.; RODRÍGUEZ-ARIAS, M. Resilience to social defeat stress in adolescent male mice. **Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry**, v. 119, p. 110591, 2022.

RIEDEL, G. Glutamate receptor function in learning and memory. **Behavioural Brain Research**, v. 140, n. 1-2, p. 1–47, 2003.

ROBBINS, T. W.; MURPHY, E. R. Behavioural pharmacology: 40+ years of progress, with a focus on glutamate receptors and cognition. **Trends in Pharmacological Sciences**, v. 27, n. 3, p. 141–148, 2006.

RODRIGUES, R. J.; MARQUES, J. M.; CUNHA, R. A. Purinergic signalling and brain development. **Seminars in Cell & Developmental Biology**, 2018.

ROGERS, P. J.; HOHOFF, C.; HEATHERLEY, S. V.; MULLINGS, E. L.; MAXFIELD, P. J.; EVERSLED, R. P.; DECKERT, J.; NUTT, D. J. Association of the Anxiogenic and Alerting Effects of Caffeine with ADORA2A and ADORA1 Polymorphisms and Habitual Level of Caffeine Consumption. **Neuropsychopharmacology**, v. 35, n. 9, p. 1973–1983, 2010.

ROMERO, L. M.; DICKENS, M. J.; CYR, N. E. The reactive scope model — A new model integrating homeostasis, allostasis, and stress. **Hormones and Behavior**, v. 55, n. 3, p. 375–389, 2009.

RUSSO, S. J.; MURROUGH, J. W.; HAN, M.-H.; CHARNEY, D. S.; NESTLER, E. J. Neurobiology of resilience. **Nature Neuroscience**, v. 15, n. 11, p. 1475–1484, 2012.

RUSSO, S. J.; NESTLER, E. J. Erratum: The brain reward circuitry in mood disorders. **Nature Reviews Neuroscience**, v. 14, n. 10, p. 736–736, 2013.

RUTTER, M. Resilience as a dynamic concept. **Development and Psychopathology**, v. 24, n. 02, p. 335–344, 2012.

RYGULA, R.; ABUMARIA, N.; FLÜGGE, G.; FUCHS, E.; RÜTHER, E.; HAVEMANN-REINECKE, U. Anhedonia and motivational deficits in rats: Impact of chronic social stress. **Behavioural Brain Research**, v. 162, n. 1, p. 127–134, 2005.

- SALA, M.; PEREZ, J.; SOLLOF, P.; UCELLI DI NEMI, S.; CAVERZASI, E.; SOARES, J. C.; BRAMBILLA, P. Stress and hippocampal abnormalities in psychiatric disorders. **European Neuropsychopharmacology**, v. 14, n. 5, p. 393–405, 2004.
- SALGADO, S.; KAPLITT, M. G. The Nucleus Accumbens: A Comprehensive Review. **Stereotactic and Functional Neurosurgery**, v. 93, n. 2, p. 75–93, 2015.
- SANACORA, G.; TRECCANI, G.; POPOLI, M. Towards a glutamate hypothesis of depression. **Neuropharmacology**, v. 62, n. 1, p. 63–77, 2012.
- SANTOMAURO, D. F.; HERRERA, A. M. M.; SHADID, J.; ZHENG, P.; ASHBAUGH, C.; PIGOTT, D. M.; ABBAFATI, C.; ADOLPH, C.; AMLAG, J. O.; ARAVKIN, A. Y.; BANG-JENSEN, B. L.; BERTOLACCI, G. J.; BLOOM, S. S.; CASTELLANO, R.; CASTRO, E.; CHAKRABARTI, S.; CHATTOPADHYAY, J.; COGEN, R. M.; COLLINS, J. K.; DAI, X. Global prevalence and burden of depressive and anxiety disorders in 204 countries and territories in 2020 due to the COVID-19 pandemic. **The Lancet**, v. 398, n. 10312, p. 1700–1712, 2021.
- SAPOLSKY, R. M.; ROMERO, L. M.; MUNCK, A. U. How Do Glucocorticoids Influence Stress Responses? Integrating Permissive, Suppressive, Stimulatory, and Preparative Actions\*. **Endocrine Reviews**, v. 21, n. 1, p. 55–89, 2000.
- SARAWAGI, A.; SONI, N. D.; PATEL, A. B. Glutamate and GABA Homeostasis and Neurometabolism in Major Depressive Disorder. **Frontiers in Psychiatry**, v. 12, 2021.
- SAVIGNAC, H. M.; FINGER, B. C.; PIZZO, R. C.; O'LEARY, O. F.; DINAN, T. G.; CRYAN, J. F. Increased sensitivity to the effects of chronic social defeat stress in an innately anxious mouse strain. **Neuroscience**, v. 192, p. 524–536, 2011.
- SCACCIANOCE, S.; NAVARRA, D.; DI SCIULLO, A.; ANGELUCCI, L.; ENDRÖCZI, E. Adenosine and Pituitary-Adrenocortical Axis Activity in the Rat. **Neuroendocrinology**, v. 50, n. 4, p. 464–468, 1989.
- SCHARF, S. H.; SCHMIDT, M. V. Animal Models of Stress Vulnerability and Resilience in Translational Research. **Current Psychiatry Reports**, v. 14, n. 2, p. 159–165, 2012.
- SCHMIDT, M. V.; SCHARF, S. H.; STERLEMANN, V.; GANEA, K.; LIEBL, C.; HOLSBOER, F.; MÜLLER, M. B. High susceptibility to chronic social stress is associated with a depression-like phenotype. **Psychoneuroendocrinology**, v. 35, n. 5, p. 635–643, 2010.
- SCHNEIDER, P.; HO, Y.-J.; SPANAGEL, R.; PAWLAK, C. R. A Novel Elevated Plus-Maze Procedure to Avoid the One-Trial Tolerance Problem. **Frontiers in Behavioral Neuroscience**, v. 5, 2011.
- SCHRADER, J.; SCHÜTZ, W.; BARDENHEUER, H. Role of S-adenosylhomocysteine hydrolase in adenosine metabolism in mammalian heart. **Biochemical Journal**, v. 196, n. 1, p. 65–70, 1981.
- SEBASTIAO, A.; RIBEIRO, J. Tuning and Fine-Tuning of Synapses with Adenosine. **Current Neuropharmacology**, v. 7, n. 3, p. 180–194, 2009.

- SEIB, D. R. M.; MARTIN-VILLALBA, A. Neurogenesis in the Normal Ageing Hippocampus: A Mini-Review. **Gerontology**, v. 61, n. 4, p. 327–335, 2014.
- SEIBENHENER, M. L.; WOOTEN, M. C. Use of the Open Field Maze to Measure Locomotor and Anxiety-like Behavior in Mice. **Journal of Visualized Experiments**, n. 96, 2015.
- SELYE, H. A Syndrome produced by Diverse Nocuous Agents. **Nature**, v. 138, n. 3479, p. 32–32, 1936.
- SELYE, H. Stress and the General Adaptation Syndrome. **British Medical Journal**, v. 1, n. 4667, p. 1383–1392, 1950.
- SELYE, H. **Stress in Health and Disease**. Boston: Butterworths, 1976.
- SHENG, M. The postsynaptic NMDA-receptor—PSD-95 signaling complex in excitatory synapses of the brain. **Journal of Cell Science**, v. 114, n. 7, p. 1251, 2001.
- SHORS, T. J.; CHUA, C.; FALDUTO, J. Sex Differences and Opposite Effects of Stress on Dendritic Spine Density in the Male Versus Female Hippocampus. **The Journal of Neuroscience**, v. 21, n. 16, p. 6292–6297, 2001.
- SHUPLIAKOV, O.; HAUCKE, V.; PECHSTEIN, A. How synapsin I may cluster synaptic vesicles. **Seminars in Cell & Developmental Biology**, v. 22, n. 4, p. 393–399, 2011.
- SILLIVAN, S. E.; JOSEPH, N. F.; JAMIESON, S.; KING, M. L.; CHÉVERE-TORRES, I.; FUENTES, I.; SHUMYATSKY, G. P.; BRANTLEY, A. F.; RUMBAUGH, G.; MILLER, C. A. Susceptibility and Resilience to Posttraumatic Stress Disorder-like Behaviors in Inbred Mice. **Biological Psychiatry**, v. 82, n. 12, p. 924–933, 2017.
- SOUTHWICK, S. M.; VYTHILINGAM, M.; CHARNEY, D. S. The Psychobiology of Depression and Resilience to Stress: Implications for Prevention and Treatment. **Annual Review of Clinical Psychology**, v. 1, n. 1, p. 255–291, 2005.
- STACHOWICZ, K. Is PSD-95 entangled in the side effects of antidepressants? **Neurochemistry International**, v. 159, p. 105391, 2022.
- STEIN, M. B.; SAREEN, J. Generalized Anxiety Disorder. **New England Journal of Medicine**, v. 373, n. 21, p. 2059–2068, 2015.
- STEIN, M. B.; STEIN, D. J. Social anxiety disorder. **The Lancet**, v. 371, n. 9618, p. 1115–1125, 2008.
- STEPAN, J.; DINE, J.; EDER, M. Functional optical probing of the hippocampal trisynaptic circuit in vitro: network dynamics, filter properties, and polysynaptic induction of CA1 LTP. **Frontiers in Neuroscience**, v. 9, p. 160, 2015.
- STERLING, P.; EYER, J. **Handbook of Life Stress Cognition and Health**. Oxford: Oxford University Press, p. 629–650, 1998.

- STRANGE, B. A.; WITTER, M. P.; LEIN, E. S.; MOSER, E. I. Functional organization of the hippocampal longitudinal axis. **Nature Reviews Neuroscience**, v. 15, n. 10, p. 655–669, 2014.
- SVENNINGSSON, P.; FREDHOLM, B. B. Glucocorticoids regulate the expression of adenosine A1 but not A(2A) receptors in rat brain. **The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 280, n. 2, p. 1094–1101, 1997.
- TAKAHASHI, K.; FOSTER, J. B.; LIN, C.-L. G. Glutamate transporter EAAT2: regulation, function, and potential as a therapeutic target for neurological and psychiatric disease. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v. 72, n. 18, p. 3489–3506, 2015.
- TAKAMORI, S. VGLUTs: “Exciting” times for glutamatergic research? **Neuroscience Research**, v. 55, n. 4, p. 343–351, 2006.
- TAMASHIRO, K. L.; SAKAI, R. R.; SHIVELY, C. A.; KARATSOREOS, I. N.; REAGAN, L. P. Chronic stress, metabolism, and metabolic syndrome. **Stress**, v. 14, n. 5, p. 468–474, 2011.
- TAO, S.; WANG, Y.; PENG, J.; ZHAO, Y.; HE, X.; YU, X.; LIU, Q.; JIN, S.; XU, F. Whole-Brain Mapping the Direct Inputs of Dorsal and Ventral CA1 Projection Neurons. **Frontiers in Neural Circuits**, v. 15, 2021.
- TIAN, Q.; STEPANIANTS, S. B.; MAO, M.; WENG, L.; FEETHAM, M. C.; DOYLE, M. J.; YI, E. C.; DAI, H.; THORSSON, V.; ENG, J.; GOODLETT, D.; BERGER, J. P.; GUNTER, B.; LINSELEY, P. S.; STOUGHTON, R. B.; AEBERSOLD, R.; COLLINS, S. J.; HANLON, W. A.; HOOD, L. E. Integrated Genomic and Proteomic Analyses of Gene Expression in Mammalian Cells. **Molecular & Cellular Proteomics**, v. 3, n. 10, p. 960–969, 2004.
- TORDERA, R. M.; TOTTERDELL, S.; WOJCIK, S. M.; BROSE, N.; ELIZALDE, N.; LASHERAS, B.; DEL RIO, J. Enhanced anxiety, depressive-like behaviour and impaired recognition memory in mice with reduced expression of the vesicular glutamate transporter 1 (VGLUT1). **European Journal of Neuroscience**, v. 25, n. 1, p. 281–290, 2007.
- TOTH, E.; GERSNER, R.; WILF-YARKONI, A.; RAIZEL, H.; DAR, D. E.; RICHTER-LEVIN, G.; LEVIT, O.; ZANGEN, A. Age-dependent effects of chronic stress on brain plasticity and depressive behavior. **Journal of Neurochemistry**, v. 107, n. 2, p. 522–532, 2008.
- TOYODA, A. Social defeat models in animal science: What we have learned from rodent models. **Animal Science Journal**, v. 88, n. 7, p. 944–952, 2017.
- TSE, Y. C.; LOPEZ, J.; MOQUIN, A.; WONG, S.-M. A.; MAYSINGER, D.; WONG, T. P. The susceptibility to chronic social defeat stress is related to low hippocampal extrasynaptic NMDA receptor function. **Neuropsychopharmacology**, v. 44, n. 7, p. 1310–1318, 2019.
- TYAGARAJAN, S. K.; FRITSCHY, J.-M. Gephyrin: a master regulator of neuronal function? **Nature Reviews Neuroscience**, v. 15, n. 3, p. 141–156, 2014.

ULRICH-LAI, Y. M.; HERMAN, J. P. Neural regulation of endocrine and autonomic stress responses. **Nature Reviews Neuroscience**, v. 10, n. 6, p. 397–409, 2009.

VASCONCELOS, M.; CHATAIN, C. P.; GEHRES, S. W.; STEIN, D. J.; GUAHYBA, B. L.; GÉA, L. P.; DA ROSA, E. D.; PFAFFENSELLER, B.; ROSA, A. R.; DE ALMEIDA, R. M. M. The costs of coping: Different strategies to deal with social defeat stress might come with distinct immunologic, neuroplastic, and oxidative stress consequences in male Wistar rats. **Behavioral Neuroscience**, v. 135, n. 5, p. 654–667, 2021.

VECCHIO, E.; TN NGUYEN, A.; TAN, C.; WHITE, P.; MAY, L. A tale of two receptors - Investigating how adenosine A2 receptors modulate adenosine A1 receptor-mediated cardioprotection. **Heart, Lung and Circulation** v. 24, p. S134, 2015.

WALF, A. A.; FRYE, C. A. The use of the elevated plus maze as an assay of anxiety-related behavior in rodents. **Nature Protocols**, v. 2, n. 2, p. 322–328, 2007.

WANG, H.; XU, J.; LAZAROVICI, P.; QUIRION, R.; ZHENG, W. cAMP Response Element-Binding Protein (CREB): A Possible Signaling Molecule Link in the Pathophysiology of Schizophrenia. **Frontiers in Molecular Neuroscience**, v. 11, 2018.

WANG, L.; SHEN, X.; WU, Y.; ZHANG, D. Coffee and caffeine consumption and depression: A meta-analysis of observational studies. **Australian & New Zealand Journal of Psychiatry**, v. 50, n. 3, p. 228–242, 2015.

WANG, S.; QU, Y.; CHANG, L.; PU, Y.; ZHANG, K.; HASHIMOTO, K. Antibiotic-induced microbiome depletion is associated with resilience in mice after chronic social defeat stress. **Journal of Affective Disorders**, v. 260, p. 448–457, 2020.

WANG, W.; LIU, L.; YANG, X.; GAO, H.; TANG, Q.-K.; YIN, L.-Y.; YIN, X.-Y.; HAO, J.-R.; GENG, D.-Q.; GAO, C. Ketamine improved depressive-like behaviors via hippocampal glucocorticoid receptor in chronic stress induced- susceptible mice. **Behavioural Brain Research**, v. 364, p. 75–84, 2019.

WANG, W.; LIU, W.; DUAN, D.; BAI, H.; WANG, Z.; XING, Y. Chronic social defeat stress mouse model: Current view on its behavioral deficits and modifications. **Behavioral Neuroscience**, v. 135, n. 3, p. 326–335, 2021.

WANG, Z.; FREDERICK, J.; GARABEDIAN, M. J. Deciphering the Phosphorylation “Code” of the Glucocorticoid Receptorin Vivo. **Journal of Biological Chemistry**, v. 277, n. 29, p. 26573–26580, 2002.

WEN, Y.; DONG, Z.; LIU, J.; AXERIO-CILIES, P.; DU, Y.; LI, J.; CHEN, L.; ZHANG, L.; LIU, L.; LU, J.; ZHOU, N.; CHUAN WU, D.; WANG, Y. T. Glutamate and GABAA receptor crosstalk mediates homeostatic regulation of neuronal excitation in the mammalian brain. **Signal Transduction and Targeted Therapy**, v. 7, n. 1, p. 1–18, 2022.

WERNER, E. E.; SMITH, R. S. **Overcoming the odds: high risk children from birth to adulthood**. Ithaca, Ny: Cornell University Press, 1995.

WILLMORE, L.; CAMERON, C.; YANG, J.; WITTEN, I. B.; FALKNER, A. L. Behavioural and dopaminergic signatures of resilience. **Nature**, v. 611, n. 7934, p. 124–132, 2022.

WIRTZ, P. H.; VON KÄNEL, R. Psychological Stress, Inflammation, and coronary heart disease. **Current Cardiology Reports**, v. 19, n. 11, 2017.

WITTER, M. Hippocampus. **The Mouse Nervous System**, p. 112–139, 2012.

WOOD, S. K.; BHATNAGAR, S. Resilience to the effects of social stress: Evidence from clinical and preclinical studies on the role of coping strategies. **Neurobiology of Stress**, v. 1, p. 164–173, 2015.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Depression and other common mental disorders: global health estimates**. World Health Organization, 2017.

YAMADA, K.; KOBAYASHI, M.; MORI, A.; JENNER, P.; KANDA, T. Antidepressant-like activity of the adenosine A2A receptor antagonist, istradefylline (KW-6002), in the forced swim test and the tail suspension test in rodents. **Pharmacology Biochemistry and Behavior**, v. 114-115, p. 23–30, 2013.

YASHIRO, S.; SEKI, K. Association of social defeat stress-induced anhedonia-like symptoms with mGluR1-dependent decrease in membrane-bound AMPA-GluR1 in the mouse ventral midbrain. **Stress**, v. 20, n. 4, p. 404–418, 2022.

YIN, Y.-Q.; ZHANG, C.; WANG, J.-X.; HOU, J.; YANG, X.; QIN, J. Chronic caffeine treatment enhances the resilience to social defeat stress in mice. **Food & Function**, v. 6, n. 2, p. 479–491, 2015.

ZAHM, D. S.; BROG, J. S. On the significance of sub territories in the “accumbens” part of the rat ventral striatum. **Neuroscience**, v. 50, n. 4, p. 751–767, 1992.

ZHE, D.; FANG, H.; YUXIU, S. Expressions of Hippocampal Mineralocorticoid Receptor (MR) and Glucocorticoid Receptor (GR) in the Single-Prolonged Stress-Rats. **Acta histochemica et cytochemica**, v. 41, n. 4, p. 89–95, 2008.

ZHOU, J.; LIU, Z.; YU, J.; HAN, X.; FAN, S.; SHAO, W.; CHEN, J.; QIAO, R.; XIE, P. Quantitative Proteomic Analysis Reveals Molecular Adaptations in the Hippocampal Synaptic Active Zone of Chronic Mild Stress-Unsusceptible Rats. **International Journal of Neuropsychopharmacology**, v. 19, n. 1, p. pyv100, 2015.

ZIMMERMANN, H.; ZEBISCH, M.; STRÄTER, N. Cellular function and molecular structure of ecto-nucleotidases. **Purinergic Signalling**, v. 8, n. 3, p. 437–502, 2012.