



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

ANA CAROLINA DA SILVA VIEIRA

INVESTIGAÇÃO DA RELAÇÃO DE BIOMARCADORES HIPOCAMPAIS COM O
COMPORTAMENTO EMOCIONAL EM LINHAGENS ISOGÊNICAS DE RATOS
SHR e SLA16

FLORIANÓPOLIS

2021

ANA CAROLINA DA SILVA VIEIRA

**INVESTIGAÇÃO DA RELAÇÃO DE BIOMARCADORES HIPOCAMPAIS
COM O COMPORTAMENTO EMOCIONAL EM LINHAGENS ISOGÊNICAS
DE RATOS SHR e SLA16**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Farmacologia da Universidade Federal de Santa Catarina para obtenção do título de Mestre em Farmacologia

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Fernanda Barbosa Lima

Co-orientador: Prof. Dr. Geison de Souza Izídio

Florianópolis

2021

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

VIEIRA, ANA CAROLINA DA SILVA
INVESTIGAÇÃO DA RELAÇÃO DE BIOMARCADORES HIPOCAMPAIS
COM O COMPORTAMENTO EMOCIONAL EM LINHAGENS ISOGÊNICAS DE
RATOS SHR e SLA16 / ANA CAROLINA DA SILVA VIEIRA ;
orientador, Fernanda Barbosa Lima, coorientador, Geison
de Souza Izídio, 2021.
72 p.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Santa
Catarina, Centro de Ciências Biológicas, Programa de Pós
Graduação em Farmacologia, Florianópolis, 2021.

Inclui referências.

1. Farmacologia. 2. BIOMARCADORES. 3. HIPOCAMPO. 4.
LINHAGEM ISOGÊNICA. 5. COMPORTAMENTO ANIMAL. I. Lima,
Fernanda Barbosa . II. Izídio, Geison de Souza . III.
Universidade Federal de Santa Catarina. Programa de Pós
Graduação em Farmacologia. IV. Título.

Ana Carolina da Silva Vieira

**INVESTIGAÇÃO DA RELAÇÃO DE BIOMARCADORES HIPOCAMPAIS
COM O COMPORTAMENTO EMOCIONAL EM LINHAGENS ISOGÊNICAS
DE RATOS SHR e SLA16**

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

Prof.(a) Dr.(a) Fernanda Barbosa Lima
Universidade Federal de Santa Catarina

Prof. Dr. Patrick Remus Suman
Universidade Federal do Rio de Janeiro

Prof.(a) Dr.(a) Helena Iturvides Cimarosti
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 Farmacologia.

Coordenação do Programa de Pós-Graduação

Prof^ª. Dr^ª. Fernanda Barbosa Lima
Orientador(a)

Florianópolis, 2021

Dedicatória

A minha família,
Não foi fácil, mas eu consegui!

Agradecimentos

Primeiramente, agradeço a Deus, pelo dom da ciência e da sabedoria.

Agradeço a Universidade Federal de Santa Catarina, por ser uma universidade pública e que luta incansavelmente para manter o ensino de qualidade a todos os alunos de seus campi!

À CAPES e ao CNPq pelo suporte financeiro.

À pós-graduação em Farmacologia, aos discentes que se unem, seja para greve, seja para um litrão no bar. Aos docentes que não medem esforços para passar todo conhecimento possível, influentes em grande parte da nossa formação.

Ao LENEC, que me recebeu de braços abertos. O convívio leve e imprescindível fez toda a diferença durante esses anos. Reuniões virtuais durante a pandemia era como a luz no fim do túnel e a certeza que estamos juntos, pro que der e vier.

À professora Fernanda, minha orientadora, que caiu de paraquedas nesse projeto, e me orientou de forma extraordinária. Deixo aqui minha gratidão, por ter aceitado essa empreitada!

Ao Flaviano e a Tamires, que me explicavam tudinho, quantas vezes fossem necessárias.

Não poderia deixar de agradecer ao LGC, Prof. Geison, Ariela, Natalli, Júlia e Breno, por todo o apoio durante essa trajetória!

Ao Labnec, onde me senti muito em casa. Obrigada Prof. Cilene, por toda a ajuda e por ter me acolhido! Obrigada Karol, Patrick, Fabi, Tami e Juliana B., pelos cafés, chimas, RU's e fofocas!

Ao Laboratório de Fisiopatologia Experimental, que aos 45 do segundo tempo me auxiliaram nos últimos experimentos. Monique, Helo, Lu e Emily, obrigada por me salvarem!!

As minhas colegas de mestrado, que se tornaram amigas! Roberta, Letícia e Juliana M. A parceria que deixou tudo mais tranquilo!

Agradeço imensamente aos que muito me apoiaram nessa jornada: Thay, Day, Fer, Matheus, Zé, Lais, Juliano, Ana, Marina, Miguel, obrigada!

Aos meus pais, que me incentivam sempre a seguir meu sonho, acreditam que sou capaz e eu sou mesmo viú? Graças a vocês!

A minha avó, Conceição. Muitas e muitas novenas para apoiar a neta e que com a fé que tem, eu não tinha dúvidas alguma que tudo daria certo!

Ao meu avô, João (*in memoriam*), que não vive mais nesse tempo, mas que viverá para sempre nas minhas memórias. *Essa história aqui é para você!*

Epígrafe

“Cada tic-tac é um segundo de vida que passa e não se repete. Há nele tanta intensidade, tanto interesse, que o único problema é como vive-lo”

- Frida Kahlo

Resumo

Estudar o comportamento animal é uma ferramenta importante para a compreensão de transtornos relacionados à emocionalidade. Ratos isogênicos das linhagens SHR (*Spontaneously Hypertensive Rats*) e SLA16 (SHR.LEW.Anxrr16) apresentam comportamento emocional característico de cada linhagem e podem ser utilizados na busca por biomarcadores envolvidos com as respostas comportamentais. O hipocampo, além de apresentar neurogênese na vida adulta, é uma das principais estruturas relacionadas com memória, aprendizado e medo e pouco se sabe sobre neuromarcadores nesta área nas linhagens SHR e SLA16. O objetivo do presente estudo foi investigar o imunocontéudo de marcadores hipocampais neuronais como doublecortina (DCX), receptores de glicocorticoides (GR) e a acetilação da histona H3 (H3Lys14) em machos e fêmeas das linhagens SHR e SLA16. Propomos a hipótese de que mudanças no imunocontéudo destes marcadores possam se correlacionar com as respostas específicas desses ratos isogênicos em testes comportamentais de emocionalidade. Foram utilizados 2 grupos contendo machos e fêmeas de ambas as linhagens: grupo *naive* —que não foi submetido a testes comportamentais— e grupo “pós-comportamento” —que foi submetido aos seguintes testes: labirinto em cruz elevado (LCE), campo aberto (CA) e reconhecimento de objeto (RO). Todos os animais foram eutanasiados aos 60 dias de idade para análises do conteúdo hipocampal de DCX, GR e H3. No LCE, fêmeas SLA16 apresentaram maior frequência de entradas nos braços fechados ($p=0,0277$) comparadas às fêmeas SHR, enquanto os machos SLA16 apresentaram maior tempo de permanência nos braços fechados ($p=0,0349$) comparados aos machos SHR. No CA, fêmeas SLA16 apresentaram maior locomoção em comparação com as SHR ($p=0,0195$). Comparando-se animais *naive* e “pós-comportamento” observou-se um aumento do conteúdo hipocampal de H3 em machos SHR após os testes comportamentais, comparados com fêmeas da mesma linhagem. O conteúdo hipocampal de DCX e GR não foi diferente entre os grupos experimentais. Os dados sugerem que o aumento de neurônios imaturos parece não estar envolvido na modulação do comportamento emocional destas linhagens. O maior imunocontéudo de H3 em machos SHR do que em fêmeas indica a necessidade de uma melhor avaliação da epigenética envolvida no comportamento emocional para se determinar quais genes têm o o imunocontéudo aumentado após acetilação. Além disso, a descoberta do imunocontéudo diferencial entre sexos, de biomarcadores envolvidos com o comportamento emocional poderá contribuir para o diagnóstico, tratamento e melhor compreensão dos transtornos emocionais e suas diferenças entre homens e mulheres. **Palavras-chave:** Transtornos neuropsiquiátricos, humor, biomarcadores, epigenética

ABSTRACT

Studying animal behavior is an important tool to understand emotionality related disorders. Isogenic rat strains like SHR (Spontaneously Hypertensive Rats) and SLA16 (SHR.LEW.Anxrr16) exhibit distinctive emotional behaviors and can be used to find biomarkers that modulate behavioral responses. Hippocampus can present adult neurogenesis and is one of the main areas processing memory, learning and fear, but little is known about the expression of hippocampal biomarkers in the SHR and SLA16 strains. We aimed to investigate the hippocampal expression of biomarkers like doublecortin (DCX), glucocorticoid receptors (GR) as well as H3 histone acetylation (H3Lys14) in male and female rats from the SHR and SLA16 strains. We hypothesized that changes in these biomarkers' expression might correlate to the typical responses of these strains in emotionality behavioral tests. Rats were separated in two groups with males and females from both strains: the "naïve group", in which rats were not exposed to behavioral tests; and the "post-test group", in which rats were exposed to the following tests: elevated plus maze (EPM), open field (OF) and object recognition (OR). All animals were euthanized at 60 days of age, when the hippocampal content of DCX, GR and H3 was analyzed. In the EPM test, SLA16 females presented a higher frequency of entrances in the closed arms ($p=0,0277$) compared to SHR females, while SLA16 males spent more time in the closed arms ($p=0,0349$) than SHR males. Also, SLA16 females had higher levels of locomotion in the OF compared to SHR females ($p=0,0195$). The comparison of "naïve" and "post-test" groups showed that SHR males presented a higher content of H3 in the hippocampus compared to females from the same strain. The hippocampal content of DCX and GR was not different among the groups. These data suggest that an increase of immature neurons does not seem to be involved in the modulation of emotional behavior in these rat strains. The higher expression of H3 in SHR males compared to females raises the attention to the need for a better evaluation of epigenetic mechanisms involved in the emotional behavior to determine which genes present increased expression after the acetylation. Also, the differential expression of molecular markers involved in behavioral responses between males and females can contribute to the diagnosis, treatment and better understanding of emotional disorders and their differences between men and women.

Keywords: neuropsychiatric disorders, humor, biomarkers, epigenetics.

Lista de Figuras

Figura 1. Construção da linhagem congênica SLA16.....	19
Figura 2. Neurogênese Hipocampal Adulta.....	23
Figura 3. Acetilação da Histona H3 altera a conformação nucleossomal.....	26
Figura 4. Desenho experimental animal.....	31
Figura 5. Linha do tempo dos experimentos.....	32
Figura 6. Teste de reconhecimento de objeto.....	34
Figura 7. Análise do tempo de permanência e entradas nos braços abertos e fechados no labirinto em cruz elevado de ambos os sexos e linhagens.....	38
Figura 8. Variações etológicas observadas no teste de labirinto em cruz elevado.....	39
Figura 9. Locomoção no teste de campo aberto.....	40
Figura 10. Variações etológicas observadas no teste de campo aberto.....	41
Figura 11. Teste de reconhecimento de um novo objeto.....	42
Figura 12 Análise do imunoconteúdo do marcador molecular DCX em machos e fêmeas.....	43
Figura 13. Análise do imunoconteúdo do marcador molecular GR em machos e fêmeas.....	44
Figura 14. Análise do imunoconteúdo do marcador molecular H3 em machos e fêmeas.....	45
Figura 15. Comparação do imunoconteúdo do marcador molecular DCX entre sexo.....	46
Figura 16. Comparação do imunoconteúdo do marcador molecular GR entre sexo.....	47
Figura 17. Comparação do imunoconteúdo do marcador molecular H3 entre sexo.....	48

Lista de anexo

ANEXO 1 - Aprovação da CEUA.....	73
----------------------------------	----

Lista de abreviatura e siglas

Anxrr16	do inglês: <i>Anxiety-related response #16</i>
BSA	Albumina
CA	Campo Aberto
CBP	Proteína coativadora da ligação a CREB
CCB	Centro de Ciências Biológicas
CEUA	Comitê de Ética e Uso de Animais
ChIP	Imunoprecipitação da cromatina
DCX	Doublecortina
DNA	do inglês: <i>Deoxyribonucleic acid</i>
DP	Desvio Padrão
GD	Giro denteado
GR	do inglês: <i>Glucocorticoid Receptor</i>
GRE	do inglês: <i>Glucocorticoid responsive elements</i>
H3Lys14	Acetilação à Lisina da posição 14 da histona H3
HAT	Histonas Acetiltransferase
HPA	Hipotálamo-piruitária-adrenal
HR	do inglês: High responders
LCE	Labirinto em cruz elevado
LEW	<i>Lewis</i>
LR	do inglês: <i>Low responders</i>
LTP	Potenciação de longo prazo
M	Média
NC3Rs	do inglês: <i>The Rat Grimace Scale</i>
Ofil1	do inglês: <i>Open field inner locomotion 1</i>

pCAF	p300/fator associado ao CBP
PMSF	Fluoreto de fenilmetilsufonil
PVC	Policloreto de Vinila
RO	Reconhecimento de Objetos
SAP	do inglês: <i>Stretched attend posture</i>
SD	Sprague-Dawley
SHR	do inglês: <i>Spontaneously Hypertensive Rats</i>
SLA16	SHR.LEW.Anxrr16
TBST	do inglês: <i>Tris Buffered Saline with Tween 20</i>
UFSC	Universidade Federal de Santa Catarina

Sumário

1. INTRODUÇÃO	17
1.1 LINHAGENS ISOGÊNICAS COMO MODELOS GENÉTICOS PARA O ESTUDO DA EMOCIONALIDADE	17
1.2 DIMORFISMO SEXUAL NO COMPORTAMENTO	20
1.3.1 A maturação de novos neurônios e a emocionalidade	22
1.3.2 O estresse na modulação do comportamento ansioso	24
1.3.3 Aprendizagem, memória e a epigenética	26
2. HIPÓTESES	28
3. OBJETIVOS.....	29
3.1 OBJETIVO GERAL	29
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	29
4. MATERIAL E MÉTODOS.....	30
4.1 ANIMAIS	30
4.2 TESTES COMPORTAMENTAIS	31
4.2.1 Teste do Labirinto em Cruz Elevado.....	32
4.2.2 Campo Aberto	33
4.2.3 Reconhecimento de Objetos.....	33
4.3 <i>WESTERN BLOTTING</i>	34
4.3.1 Coleta de materiais	34
4.3.2 <i>Western Blotting</i>	35
4.4 ANÁLISE ESTATÍSTICA	36
5.RESULTADOS	37
5.1 ANÁLISES COMPORTAMENTAIS	37
5.1.1 Labirinto em cruz elevado.....	37
5.1.2 Campo aberto	39
5.1.3 Reconhecimento de objetos.....	42
5.2 DOSAGENS MOLECULARES HIPOCAMPAIS	42
5.2.1 Doublecortina (DCX).....	42
5.3 AVALIAÇÃO ENTRE SEXOS NO IMUNOCONTEÚDO DOS MARCADORES MOLECULARES HIPOCAMPAIS	46
6. DISCUSSÃO	49
6.1 O COMPORTAMENTO RELACIONADO A ANSIEDADE	49
6.2 ANSIEDADE E MATURAÇÃO NEURONAL.	53

6.3 O IMUNOCONTEÚDO DAS MOLECULAS GR E H3 APÓS EXPOSIÇÃO A TESTES COMPORTAMENTAIS NÃO CONDICIONANTES.	54
6.4 O IMUNOCONTEÚDO DOS MARCADORES DCX, GR E H3 ENTRE MACHOS E FÊMEAS.	55
7. CONCLUSÃO.....	58
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	59
ANEXO 1 - Aprovação da CEUA.....	72

1. INTRODUÇÃO

Desde a década de 70, apesar das ferramentas limitadas disponíveis na época, pesquisadores reconheceram que a compreensão da função cerebral era o rumo do desenvolvimento da ciência do comportamento (GUR; GUR, 2017). As análises de comportamentos em modelos animais vêm sendo utilizada para esclarecer os mecanismos das diversas doenças neuropsiquiátricas existentes. A compreensão de determinados comportamentos facilita o tratamento farmacológico e aumenta as chances de sucesso no prognóstico (DONNER; LOWRY, 2013).

Ainda que transtornos psiquiátricos complexos não possam ser verdadeiramente mimetizados em modelos animais, há conservação de certos fenótipos em todas as espécies que permite medir o comportamento e os fatores neurobiológicos de interesse em animais e usá-los para a melhor compreensão desses eventos em humanos (BURKE et al., 2016). Portanto, testes comportamentais em modelos animais traduzem uma situação de teste que é comparável e relevante entre os roedores e os humanos (DONNER; LOWRY, 2013). Sendo assim, modelos animais *naïves*, sem exposição anterior a tratamentos e/ou testes, são frequentemente usados em análises, pois garantem a comparação com o estado basal do animal, com representação melhor das diferenças comportamentais ou moleculares observadas.

1.1 LINHAGENS ISOGÊNICAS COMO MODELOS GENÉTICOS PARA O ESTUDO DA EMOCIONALIDADE

Em contraste com estudos em humanos, os modelos experimentais permitem que fatores genéticos e ambientais possam ser controlados. Sendo assim, o uso de modelos animais usados para investigar influências genéticas em fenótipos semelhantes à ansiedade, têm validade preditiva para mimetizar traços de ansiedade em humanos (GILL; BOYLE, 2005). A utilização de linhagens isogênicas é uma das melhores ferramentas para se estudar determinantes genéticos devido ao fato de apresentarem uniformidade gênica gerando estabilidade genética para as análises (SLATTERY; CRYAN, 2014). Essas linhagens são desenvolvidas a partir de cruzamentos

consanguíneos, que acarretam animais com o genoma praticamente idêntico após aproximadamente 20 gerações (STEIMER, 2011).

Através do mapeamento genético é possível identificar genes e produtos de interações gênicas envolvidas com os fenótipos comportamentais (YALCIN; FLINT; MOTT, 2005). Ramos et al. (1999), por exemplo, foram capazes de mapear uma região genômica nomeada *Ofil1* (do inglês: *open field inner locomotion 1*), a qual influencia a locomoção de ratos no campo aberto (CA). A análise da locomoção de roedores neste aparato é utilizada como um índice experimental de ansiedade (CONTI et al., 2004). A partir disso, estudos complementares observaram outros fatores, para melhor compreensão da influência dessa região genômica, como a preferência por álcool (BICE et al., 1998), alterações nos níveis plasmáticos de corticosterona (POTENZA et al., 2004), atividade locomotora induzida por novidade/estresse (GILL; BOYLE, 2005), regulação da neuroinflamação (MARTA et al., 2010) e doenças coronárias e metabólicas (AITMAN et al., 1997).

De acordo com estudos realizados por Ramos et al (1997), duas linhagens consanguíneas de ratos espontaneamente hipertensos (SHR – do inglês: *Spontaneously Hypertensive Rats*) e *Lewis* (LEW) se mostraram promissoras como um modelo genético de estudo da emocionalidade. Os SHR e LEW apresentam comportamentos contrastantes quando submetidos a testes comportamentais, tendo sido confirmado em estudo posterior que essa diferença corresponde a diferenças genéticas, na região *Ofil1* do cromossomo 4 dos ratos. Atualmente, essa região é nomeada como *Anxrr16* (do inglês: *anxiety-related response #16*) descrita no *Rat Genome Database* (LAULEDERKIND et al., 2013). Quando submetidos a testes comportamentais de ansiedade (labirinto em cruz elevado e caixa claro e escuro), a linhagem SHR apresenta maior resposta aos estímulos aversivos quando comparada a linhagem LEW, o que é interpretado como um comportamento menos ansioso. Entretanto, as linhagens não são diferentes com relação à locomoção total, nem à taxa de defecação em ambientes novos (RAMOS et al., 1998)

Em um cruzamento entre as linhagens, inicialmente observou-se que a região *Anxrr16* afetava de maneira contraintuitiva somente as fêmeas, ou seja, os animais com alelos provenientes da linhagem LEW atribuíram maior locomoção no campo aberto, quando comparada à linhagem parental de SHR. A ocorrência contraintuitiva não é rara em análises de variação genética. Isso porque as proles, por apresentarem mistura genética, podem desenvolver um comportamento diferente do esperado (CALDARONE

et al., 1997; LLAMAS et al., 2005; SILVA et al., 2007). Outras análises revelaram que o comportamento emocional da região *Anxrr16* não é apenas sexo específico, como também seria dependente do tipo de cruzamento parental, sendo possível a herança genética de determinado comportamento (RAMOS et al., 1998; VENDRUSCOLO et al., 2006).

Com o objetivo de refinar e isolar a região *Anxrr16* para uma melhor compreensão da diferença de comportamento nessas linhagens, De Medeiros e colaboradores (2013) obtiveram uma linhagem denominada SHR.LEW.Anxrr16 (SLA16), a qual possui um fragmento do cromossomo 4 de ratos contendo a região *Anxrr16* proveniente da linhagem LEW (doador) na linhagem base de SHR (receptor). Este estudo sugere ainda que os animais da linhagem SLA16 apresentam maiores índices de locomoção no centro do campo aberto, comparados aos animais SHR (RAMOS et al., 1997, 1998). O *Anxrr16* afeta os descendentes de linhagens LEW e SHR de maneira contraintuitiva, ou seja, os alelos LEW conferem um perfil de ansiedade mais reduzido. O aumento da locomoção no centro do campo aberto que se relaciona à redução dos níveis de ansiedade foi observado em ambos os sexos e foi independente do ciclo estral (DE MEDEIROS et al., 2013).

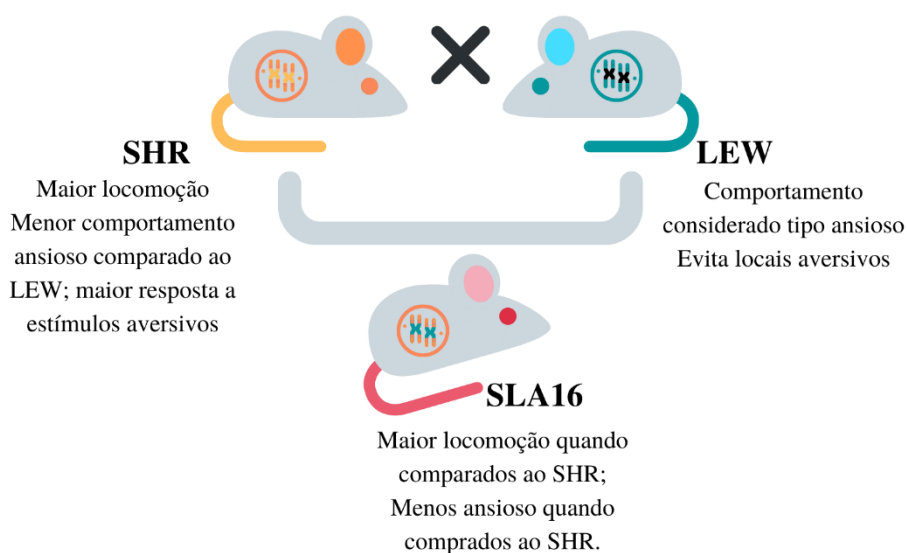


Figura 1: Os animais da linhagem SLA16 foram gerados a partir de retrocruzamento entre LEW e SHR. A linhagem SLA16 possui alelos LEW no *locus Anxrr16* e o resto do genoma proveniente da linhagem SHR. Fonte: Autor (2021)

1.2 DIMORFISMO SEXUAL NO COMPORTAMENTO

Durante décadas, os estudos de comportamento animal realizados utilizavam apenas machos em seus testes. Isso traz um viés de sexo que implica na pesquisa de novos tratamentos nos transtornos neuro-psíquicos (RUBINOW; SCHMIDT, 2019). A fim de diminuir esse enviesamento, neste trabalho ambos os sexos foram analisados, com o objetivo de observar se existe diferença comportamental entre sexos em cada uma das linhagens.

Embora as mulheres mostrem uma prevalência mais alta de transtornos emocionais como ansiedade e depressão (ALTEMUS; SARVAIYA; NEILL EPPERSON, 2014; DONNER; LOWRY, 2013), o sexo como uma variável biológica principal é pouco representado na pesquisa. As fêmeas são constantemente negligenciadas devido a preocupações de que a variação hormonal durante o ciclo reprodutivo feminino possa confundir a interpretação dos dados experimentais, apesar de meta-análises com roedores fêmeas comprovarem que isso não é uma regra, já que algumas medidas neurais e comportamentais parecem não ser diretamente afetadas pelos ciclos hormonais reprodutivos quando ratas são comparadas aos machos (SCHOLL et al., 2019).

Sendo assim, torna-se imprescindível a análise de como machos e fêmeas em seu estado basal reagem às variedades de contextos. Ainda, compreender como testes comportamentais e contextos ansiogênicos interferem nas vias moleculares pode auxiliar no direcionamento de estudos futuros, garantindo a eficiência de tratamentos que considerem essas vias (STRAWN; LEVINE, 2020). Além disso, os resultados podem contribuir para a determinação do agrupamento de dados de ambos os sexos na investigação de mecanismos neurobiológicos nos transtornos de humor (SCHOLL et al., 2019), caso não se encontrem evidências de dimorfismo sexual.

Muita atenção tem sido voltada para diferenças sexuais no eixo hipotálamo-pituitária-adrenal (HPA) de roedores, pois a regulação do eixo é frequentemente perturbada durante episódios emocionais (ALTEMUS; SARVAIYA; NEILL EPPERSON, 2014; KUDIENKA; KIRSCHBAUM, 2005). Também é de se esperar que existam diferenças sexuais biológicas relevantes para a ansiedade no que diz respeito à vulnerabilidade ao estresse, percepção e processamento de eventos estressantes, e que

algumas dessas diferenças possam ser detectáveis em nível molecular (DONNER; LOWRY, 2013).

Em contraste com os humanos, as roedoras adultas apresentam menos ansiedade do que os machos em muitos testes comportamentais específicos, como no teste de campo aberto e no labirinto em cruz elevado (BRAND; SLOB, 1988; JOHNSTON; FILE, 1991; DOMONKOS et al., 2017). Os sexos têm impacto relevante na fisiologia, em processos cerebrais de recompensa, na resposta ao ambiente, na farmacocinética e farmacodinâmica, influenciando na resposta ao tratamento, na transdução de sinal e no metabolismo (JENNINGS; LECEA, 2020; SRAMEK; MURPHY; CUTLER, 2016). Desta forma os mecanismos pelos quais ocorre a modulação na sinalização celular em transtornos emocionais e como o sexo interfere nestes comportamentos ainda são um mistério, devido a complexidade não só das vias neurais, mas também das ações dos hormônios sexuais no sistema nervoso central e dos modelos utilizados nos estudos (RUBINOW; SCHMIDT, 2019).

1.3 O CONSTRUTO DA EMOCIONALIDADE EM MODELOS ANIMAIS E MARCADORES MOLECULARES NEURAIIS

O hipocampo é uma das estruturas que compõem o sistema límbico, desempenhando um papel importante não só em processos de memória e aprendizagem mas também em funções autonômicas e neuroendócrinas (EICHENBAUM; OTTO; COHEN, 1992). Além disso, o hipocampo é uma estrutura-chave do chamado “cérebro emocional”, pois a região dorsal do hipocampo está preferencialmente envolvida nas funções relacionadas à memória, enquanto o hipocampo ventral tem um papel no processamento de informações emocionais, como o medo relacionado à ansiedade (REVEST et al., 2009) e está envolvido na regulação do eixo HPA, que modula os níveis de hormônios glicocorticoides circulantes (BOYLE et al., 2005; DE KLOET et al., 1998; DE KLOET; REUL, 1987; REUL et al., 2000). Em contrapartida, os glicocorticoides atuam na consolidação de memórias e situações emocionalmente estimulantes, através da ativação dos receptores de glicocorticoides (GR – do inglês: *Glucocorticoid Receptor*) e mineralocorticoides presentes no hipocampo (BEYLIN; SHORS, 2003; MCGAUGH; ROOZENDAAL, 2002).

Sendo assim, compreende-se que o hipocampo está envolvido em respostas fisiológicas e comportamentais em situações que desafiam a homeostase. É também no hipocampo, em sua região do giro denteado (GD), que ocorre a maior parte da neurogênese adulta, ou seja, o nascimento de novos neurônios e astrócitos (GOULD et al., 1997; VAN PRAAG et al., 2002). Além disso, o hipocampo está envolvido na neuroplasticidade, que inclui o remodelamento dendrítico de neurônios piramidais na região CA3 (MCEWEN, 1999), sinaptogênese e potenciação de longo prazo – LTP) (BILANG-BLEUEL et al., 2005; KIM; DIAMOND, 2002).

1.3.1 A maturação de novos neurônios e a emocionalidade

O remodelamento neuronal pode ocorrer em diversos pontos, desde modificações epigenéticas da expressão gênica, até a modulação das sinapses ativando vias de sinalização celular (CHRISTIAN; SONG; MING, 2014). Supõe-se que a geração e integração de novos neurônios no circuito existente seja uma das principais formas de plasticidade estrutural no sistema nervoso adulto (KEMPERMANN et al., 2010). O processo de formação de neurônios, ocorre em mamíferos na fase de desenvolvimento neural (período embrionário). Já na fase adulta, a neurogênese passa a ocorrer principalmente em três regiões encefálicas, conhecidas como zona subventricular, na região dos ventrículos laterais, e zona subgranular, na região do GD hipocampal e no bulbo olfatório (FUCHS; FLUGGE; CZECH, 2006).

Basicamente, o processo de neurogênese se inicia a partir da divisão de células tronco neurais, em um período chamado de fase quiescente. A divisão ocorre de forma assimétrica tornando precursores tipo 2a, que originam subsequentemente células progenitoras intermediárias do tipo 2b. A partir das células 2b se originam os neuroblastos, identificados pela expressão de doublecortina (DCX), que se destaca como um biomarcador para neurogênese (COVIC; KARACA; LIE, 2010). Por fim, os neuroblastos se diferenciam em células granulares, se tornando agora neurônios imaturos, com propriedades morfológicas e eletrofisiológicas ainda não desenvolvidas totalmente. Se a conexão entre neurônios se fortalecerem, os neurônios se especificam e integram a rede de neurônios maduros (Figura 2) (BÁTIZ et al., 2016).

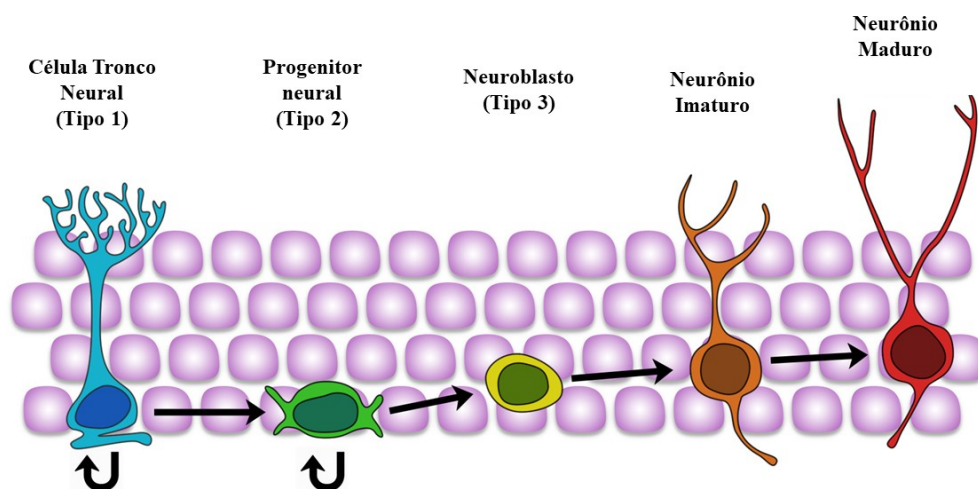


Figura 2: Imagem ilustrativa do processo de maturação neuronal. Após o início da divisão das células tronco neurais, as células progenitoras se maturam, passando pelas formas: Tipo 2, Neuroblasto, Neurônio Imaturo até se tornarem o Neurônio Maduro. Fonte: Hsieh (2012) – Adaptado.

A DCX é encontrada na camada granular GD do hipocampo e tem se mostrado expressiva durante o desenvolvimento de células-tronco neurais (KELOGLAN; SAHIN; CEVIK, 2019). A DCX também está envolvida na migração de neuroblastos e na regulação da migração neuronal ao estabilizar a função dos microtúbulos (FRANCIS et al., 1999; GLEESON et al., 1999). É possível encontrar a DCX no alongamento de neuritos, de axônios e na sinaptogênese, sendo considerada, portanto, um marcador de neurônios imaturos (D’ALESSIO et al., 2010).

Devido ao seu importante papel na formação e aprendizagem da memória, o comprometimento da neurogênese hipocampal adulta leva a déficits nas tarefas de aprendizagem dependentes do hipocampo (JOBE; MCQUATE; ZHAO, 2012; MING; SONG, 2011). Além disso, distúrbios do humor, como ansiedade e depressão, são afetados pela regulação neuroendócrina do hipocampo e se exacerbam quando a neurogênese adulta é inibida (SNYDER et al., 2011). Segundo Santarelli e colaboradores (2003), a neurogênese é um processo essencial para a eficácia de antidepressivos. Isso porque foi demonstrado que a indução de dano neuronal por radiação impede a neurogênese do hipocampo de ratos adultos, não reduzindo comportamentos emocionais

após o tratamento com antidepressivos. Esse dado sugere o envolvimento da neurogênese na presença de traços ansiosos e depressivos (PETRIK; LAGACE; EISCH, 2012).

Neste sentido, a neurogênese adulta, se prejudicada, tem sido associada às deficiências cognitivas que estão frequentemente presentes em pacientes com transtornos neuropsíquicos, como estresse, depressão, esquizofrenia, transtornos de ansiedade e comportamentos relacionados com a dependência (CHRISTIAN; SONG; MING, 2014). Na maioria desses transtornos psiquiátricos foi relatada uma diminuição da proliferação celular no GD e do volume do hipocampo, prejudicando funções dependentes do hipocampo, como a memória operacional e espacial (MIRESCU; GOULD, 2006; MORRIS et al., 2010; REVEST et al., 2009).

Por outro lado, as mudanças estruturais e funcionais no hipocampo podem ser atenuadas ou revertidas, por exemplo, com a realização de exercícios físicos ou no tratamento com antidepressivos (ANACKER et al., 2011; KEMPERMANN et al., 2010; SANTARELLI et al., 2003). Portanto, pode-se considerar que a neurogênese hipocampal seja crucial não apenas para o aprendizado e a memória, mas também para comportamentos de conduta social e controle emocional (LIEBERWIRTH et al., 2016). A neurogênese mostra efeitos ansiolíticos em camundongos submetidos a estresse de derrota social crônica (modelos de depressão), tratados com corticosterona, reduzindo os traços ansiosos quando submetidos ao teste de labirinto em cruz elevado e ao teste de nado forçado (DENOTH-LIPPUNER; JESSBERGER, 2021; HILL; SAHAY; HEN, 2015; YUN et al., 2018).

1.3.2 O estresse na modulação do comportamento ansioso

A resposta ao estresse ocorre quando um animal se depara com um desafio físico ou psicológico, que ameaça interromper a homeostase (PATTWELL; BATH, 2017). A formação da memória desses eventos é útil para que o indivíduo responda de forma mais adequada caso a situação seja encontrada novamente (TROLLOPE et al., 2017). Em 1908, Yerkes e Dodson propuseram o modelo conhecido como a curva de Yerkes-Dodson, onde acredita-se que a memória poderia ser modulada pelo estresse e pela ansiedade. Fatores emocionais regulam os níveis de hormônios do estresse liberados no momento da codificação da memória emocional, o que conseqüentemente influencia a fase de aquisição (MCGAUGH; ROOZENDAAL, 2002). Sendo assim, níveis de

ansiedade elevados causam prejuízos associados à memória e ao aprendizado (YERKES; DODSON, 1908), em uma situação em que a aquisição dessa memória é fundamental para o enfrentamento de situações similares. Devido à semelhança da etiologia e fisiopatologia dos transtornos de humor, é desafiador identificar vias neurais e sinalizações moleculares específicas, que possam potencial de auxiliar no diagnóstico e no tratamento dessas patologias (ANACKER et al., 2011).

Apesar da sinalização que leva a redução da neurogênese adulta no giro denteado não ter sido ainda completamente elucidada, evidências substanciais sugerem que hormônios relacionados com o estresse estejam envolvidos (MIRESCU; GOULD, 2006). Sabendo que o hipocampo apresenta alta expressão de GR, é pressuposto que os hormônios possam funcionar como mediadores do processo neurogênico (SNYDER et al., 2011).

Os GR são receptores nucleares, ou seja, a partir do momento que são ativados, se deslocam até o núcleo celular e ativam a transcrição de seus genes alvo por meio da ligação de homodímeros de GR aos elementos responsivos ao glicocorticoide (GRE – de inglês: *glucocorticoid responsive elements*). Quando inativos, os GR permanecem no citoplasma em um complexo proteico e chaperonas (PALUMBO; DOMINGUEZ; DONG, 2020). No hipocampo, a ativação de GR leva a expressão de cerca de 70 a 100 genes, entretanto, a identificação de genes modulados por GR é difícil devido à complexidade anatômica e heterogeneidade celular de sua distribuição (MEIJER; BUURSTEDÉ; SCHAAF, 2019). Estudos transcriptômicos no hipocampo identificaram classes funcionais de genes alvo de GR, incluindo genes que codificam o catabolismo de neurotransmissores, enzimas e receptores de aminas biogênicas, neuropeptídeos, fatores de crescimento e fatores de adesão (DATSON et al., 2008; HANSSON et al., 2000; SABBAN; KVETŇANSK, 2001; SANDI, 2004; SCHAAF et al., 1997). O GR também possui a capacidade de reprimir a expressão de genes alvos, no controle do feedback negativo, impedindo a expressão de moléculas pró-inflamatórias (MEIJER; BUURSTEDÉ; SCHAAF, 2019), portanto, desempenham um papel fundamental na manutenção da função do eixo HPA (DE KLOET; JOËLS; HOLSBOER, 2005). Como uma exceção, os GR alcançam a ativação de seus elementos responsivos a hormônios, acarretando no desbloqueio do emaranhado de nucleossomos, tornando a transcrição do gene acessível (HEBBAR; ARCHER, 2003).

1.3.3 Aprendizagem, memória e a epigenética

O nucleossomo é a unidade fundamental da cromatina, formado por aproximadamente 147pb de DNA enrolados em torno de um octâmero de histonas. O octâmero é formado por duas cópias de Histonas H2A, H2B, H3 e H4 (KURDISTANI; TAVAZOIE; GRUNSTEIN, 2004). Essas histonas estão propensas a sofrerem mudanças conformacionais em suas caudas N-terminais a partir de mecanismos epigenéticos, como a metilação e acetilação em resíduos de lisina e arginina. Entre as histonas centrais, os estudos que investigam as mudanças globais nos níveis de acetilação das histonas no hipocampo de roedores após o aprendizado têm se concentrado principalmente no tipo H3 (BOUSIGES et al., 2013).

Os nucleossomos em sua forma emaranhada (heterocromatina), representam uma barreira na transcrição gênica, bloqueando o acesso de fatores de transcrição aos genes alvo, tornando a expressão gênica rigidamente controlada (BILANG-BLEUEL et al., 2005). Neste sentido, a acetilação da histona H3 na lisina 14 (H3Lys14), geralmente está associada à ativação da transcrição por meio da neutralização da carga positiva dos aminoácidos lisina, reduzindo a afinidade das histonas pelo DNA e abrindo a cromatina, possibilitando que os fatores de transcrição encontrem os promotores dos genes (GRUNSTEIN, 1997; KOCH et al., 2007; WOLFFE; PRUSS, 1996).

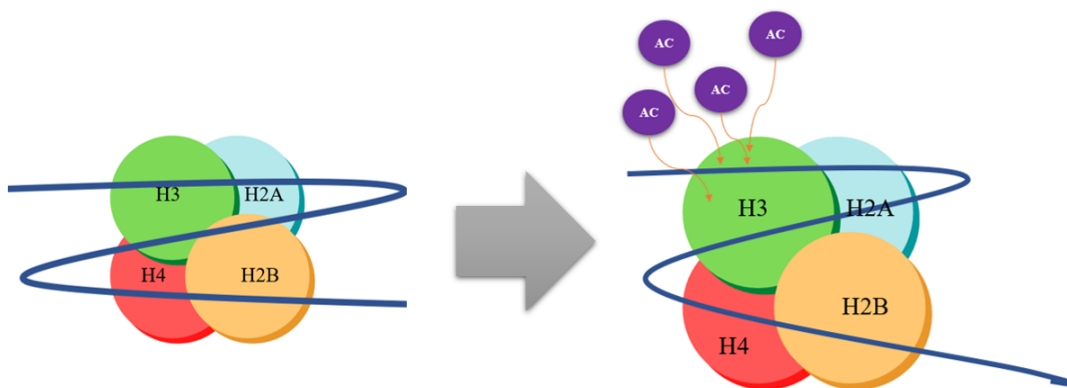


Figura 3: Imagem representativa da disposição das histonas H2A, H2B, H3 e H4 e alteração no afrouxamento da cromatina que facilita a transcrição gênica. **Fonte:** Autor (2021).

A acetilação das histonas é realizada pelas enzimas histonas acetiltransferases (HATs) (BARRETT; WOOD, 2008; BOUSIGES et al., 2010) e o aumento da acetilação das histonas H3 e H4 no hipocampo dorsal realçam memórias de medo contextual, de reconhecimento de objeto e espacial de roedores (WOOD et al., 2005, 2006; ZHAO et al., 2012). Hiperacetilações da histona H2 e H4 foram observadas no paradigma de aprendizagem, enquanto a acetilação na lisina 14 e 9 de H3 foram relacionadas ao contexto de exploração, facilmente modificada em resposta ao contexto (SCHNEIDER et al., 2013).

Nas últimas quatro décadas, a tecnologia permitiu aos pesquisadores estudarem como os fatores de transcrição individuais regulam a expressão gênica necessária para os processos de memória em mais detalhes (BARRETT; WOOD, 2008). Com o aumento do índice populacional mundial de pessoas com transtornos psiquiátricos relacionados à emocionalidade, a avaliação de biomarcadores neuronais pode contribuir com o diagnóstico e tratamento medicamentoso. Isto porque estes transtornos estão entre as doenças mais difíceis de tratar, devido à adaptação ao medicamento e principalmente pelo tempo necessário para atingir o efeito medicamentoso desejado (KANG et al., 2016). Desta forma, a pesquisa por novos biomarcadores em regiões do sistema límbico pode ser capaz de revelar moléculas importantes na modulação destes comportamentos. Sendo a pesquisa biomédica responsável pela análise primária de moléculas com potencial de envolvimento em determinados tipos de comportamento, este trabalho busca elucidar o envolvimento de biomoléculas hipocampais em linhagens isogênicas usadas como modelos animais de ansiedade e emocionalidade.

2. HIPÓTESES

Os animais da linhagem SLA16 apresentarão maior imunoconteúdo de DCX no hipocampo, considerando-se a relação já estabelecida entre aumento de neurogênese hipocampal e redução de comportamentos relacionados à ansiedade. Entretanto, pós comportamento não condicionantes o imunoconteúdo dos marcadores GR e H3 serão elevados nos grupos SHR, quando comparados aos animais *naïves*.

3. OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Buscar biomarcadores moleculares, que estejam envolvidos no comportamento de ansiedade/emocionalidade das linhagens SHR e SLA16.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Analisar se o imunoconteúdo de GR no hipocampo é diferente entre as linhagens SLA16 e SHR, bem como após a exposição a testes comportamentais o imunoconteúdo destes receptores hipocampais altera.
- Caracterizar o imunoconteúdo da molécula H3 nos grupos *naives* e após testes comportamentais, de ambos os gêneros das linhagens SHR e SLA16, a fim de ponderar diferenças epigenéticas entre os grupos.
- Investigar se existe correlação entre a expressão de marcadores neurais do hipocampo de ratos machos e fêmeas das linhagens SHR e SLA16 com seu desempenho em testes comportamentais para análise de ansiedade e cognição/aprendizagem.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1 ANIMAIS

Os animais das linhagens SHR e SLA16 foram criados no Laboratório de Genética do Comportamento-CCB-UFSC. O desmame aconteceu aos 28 dias após o nascimento e foram alojados 5 animais por gaiola, de acordo com o sexo, em caixa de polipropileno (41 cm x 34 cm x 16 cm de altura) forrada com maravalha, em concordância com a legislação vigente. Os animais tiveram água e comida à vontade e foram mantidos em ciclo claro/escuro de 12h com temperatura de $22\pm 2^{\circ}\text{C}$. Seguindo o que é preconizado pela *The Rat Grimace Scale* (NC3Rs), o número de animais utilizados para análise foi reduzido e os animais foram acompanhados a fim de garantir seu bem-estar.

Foi utilizado um total de 52 animais neste trabalho, sendo divididos em grupo de animais *naïves* (n=24) e grupo pós-comportamento (n=28) (Figura 4). Em ambos os grupos foi realizado a subdivisão entre SHR machos e SHR fêmeas, SLA machos e SLA fêmeas. Devido aos animais serem provenientes de linhagens isogênicas e de difícil reprodução, não foi possível obter o número amostral igual nos grupos analisados.

Todos os procedimentos descritos aqui foram aprovados pelo Comitê de Ética e Uso de Animais em Pesquisa da Universidade Federal de Santa Catarina – CEUA/UFSC, sob o protocolo nº PP00903.

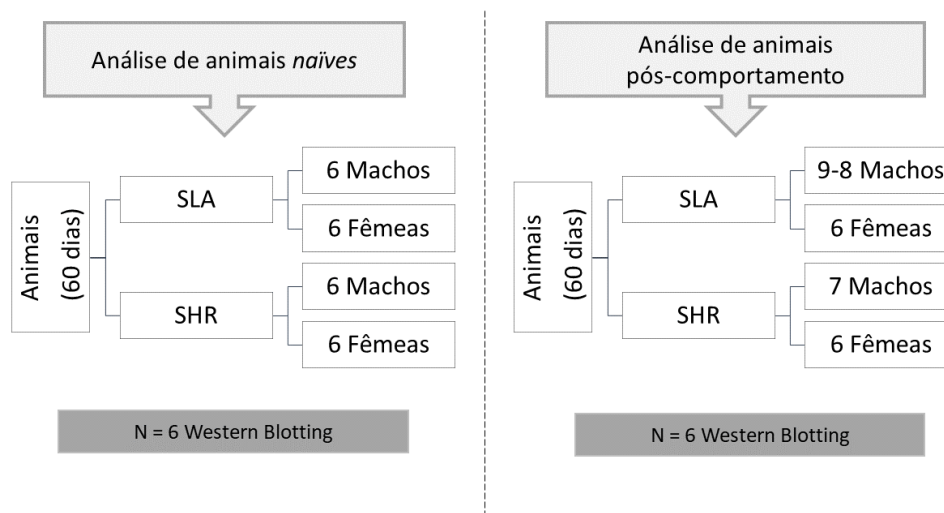


Figura 4 – Desenho experimental. Organograma dos grupos utilizados nos experimentos, sendo os grupos *naïves* os que não foram submetidos aos testes comportamentais e os grupos pós-comportamento, que foram submetidos aos testes.

4.2 TESTES COMPORTAMENTAIS

Os testes comportamentais foram realizados com os animais do segundo bloco experimental a partir dos 54 dias após o nascimento. Foram realizados os seguintes testes comportamentais: teste do Labirinto em Cruz Elevado, para análise do comportamento do tipo ansioso; teste do Campo Aberto, para análise do comportamento de locomoção e de ansiedade; e teste do Reconhecimento de Objeto, para estudo da memória de curto prazo (Figura 5). Os animais foram submetidos a cada teste de maneira arbitrária, alternando entre machos e fêmeas de ambas as linhagens. O teste de LCE foi realizado em uma sala com temperatura de $\pm 22^{\circ}\text{C}$, após 2h de ambientação, com iluminação idêntica a mantida no biotério. Já o teste de CA e RO foram realizados em outra sala, com as mesmas condições do LCE.

Os testes foram gravados e antes da análise foi realizado o cegamento dos vídeos por um terceiro, sendo o código do animal alterado para um código e sequência aleatória escolhida pelo terceiro. A quantificação dos dados foi realizada por meio do Software Ethowatcher (CRISPIM JUNIOR et al., 2012). Após o término das análises, foi revelado de quem as amostras pertenciam, para realizar os cálculos estatísticos.

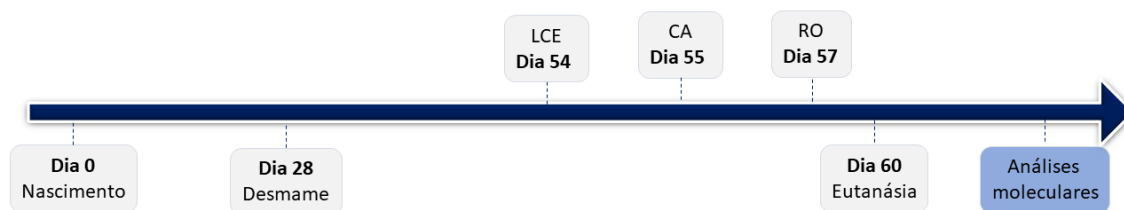


Figura 5: Ordem cronológica em que os testes comportamentais foram realizados até a eutanásia. LCE: Labirinto em cruz elevado. CA: Campo aberto. RO: Reconhecimento de objeto.

4.2.1 Teste do Labirinto em Cruz Elevado

O labirinto em cruz elevado (LCE), uma modificação do procedimento proposto por Montgomery (1955), tem sido frequentemente usado para medir o comportamento tipo-ansioso em roedores, com base em extensa investigação de seus aspectos comportamentais, fisiológicos e farmacológicos.

Neste teste utilizou-se um aparato composto por quatro braços posicionados em formato de cruz, sendo dois deles fechados (50 cm) e dois abertos (50 cm), ambos com 10 cm de largura, elevados a 60 cm do chão. Os testes foram realizados nas primeiras horas do ciclo claro (entre 7h e 10h), com permanência de 5 minutos no aparato, para cada animal. Na troca de animais do aparato foi realizada a limpeza do mesmo, com álcool 20%. O teste foi gravado no programa VirtualDub e posteriormente analisou-se a porcentagem do número de entradas nos braços abertos, a porcentagem do tempo de permanência nos braços abertos, o número de entradas nos braços abertos e nos braços fechados e a frequência de comportamentos de autolimpeza, elevação vertical, imersão de cabeça e *Stretched attend posture* (SAP), por meio do Software (CRISPIM JUNIOR et al., 2012).

4.2.2 Campo Aberto

Os animais foram expostos durante 5 minutos a uma arena de madeira (60x60cm) com superfície e paredes pretas de 45 cm de altura. A superfície da arena foi dividida em 16 quadrados de 15x15cm, sendo os quadrados próximos as paredes consideradas como periferia e os quadrantes sem contato com as paredes considerados como área central. O número de entradas no centro foi contabilizado na presença do animal no meio dos quadrantes centrais. Os animais foram colocados no centro do aparato e as sessões foram gravadas e analisadas posteriormente, onde foram observados o tempo de locomoção total do animal, a locomoção no centro e na periferia, e a frequência dos comportamentos de autolimpeza, elevação vertical e número de bolos fecais. No intervalo de cada sessão, o aparato foi higienizado com álcool 20% (KUNIISHI et al., 2017).

4.2.3 Reconhecimento de Objetos

O teste de reconhecimento de objetos (RO) para avaliação da memória de trabalho foi realizado como proposto por Bevins & Besheer (2006), em uma arena de madeira com fundo pintado em preto (60x60cm) e teve duração de três dias. Os dois primeiros dias foram utilizados para habituação e o terceiro dia foi realizado o treino e teste propriamente dito. Na habituação, os animais foram submetidos a arena, no período de 15 minutos por dia, sem nenhum objeto na área, com objetivo de ambientar os animais no aparato. Na sessão de treino, os animais foram expostos a dois objetos idênticos, confeccionados em cerâmica, com textura nas laterais, circular. Os objetos foram posicionados paralelamente, voltados para baixo, e a exploração destes objetos foi gravada por 15 minutos. Três horas depois, na sessão de teste (Figura 6), o objeto do lado direito foi substituído por um novo objeto, diferente do primeiro, com característica circular, fabricado em policloreto de vinila (PVC), de tamanho menor comparado ao objeto anterior, com a superfície voltada para cima. O teste foi gravado por 5 minutos para posterior análise, onde foi observado o índice de reconhecimento, que equivale ao tempo de exploração do objeto novo em relação ao tempo de exploração total (do objeto conhecido + o objeto novo). No intervalo de cada sessão, o aparato e os objetos foram higienizados com álcool 20%.

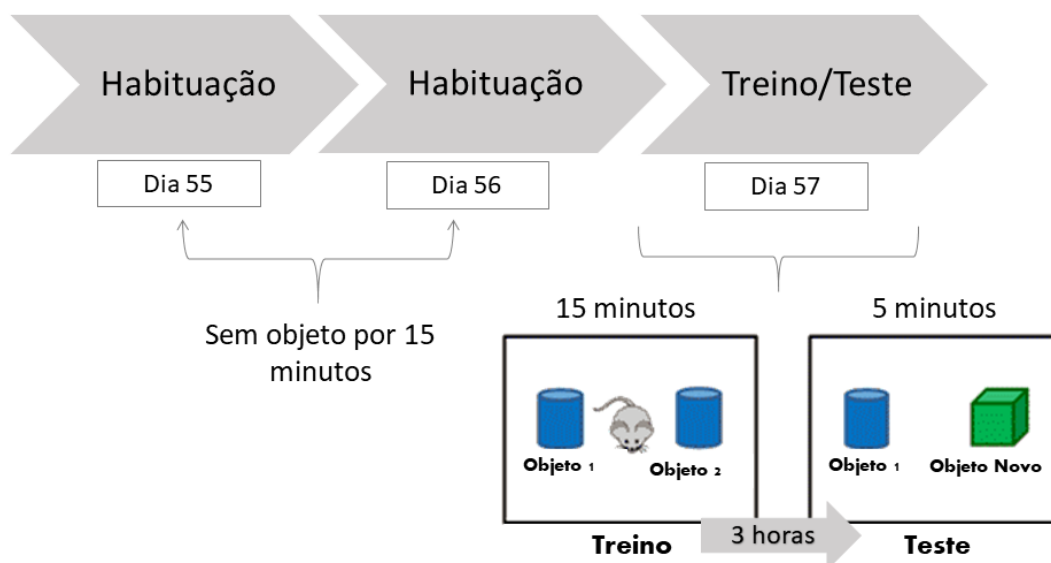


Figura 6: Teste de reconhecimento de objeto. Na realização do teste de RO os animais passam por dois dias de habituação (Dia 55 e 58 pós-nascimento), durante 15 minutos. No dia 57 são realizados os treinos e o teste, sendo o treino com duração de 15 minutos, com a exposição de dois objetos idênticos e o teste, 3 horas após o treino, realizado durante 5 minutos com a exposição de um objetivo usado anteriormente e um objeto novo.

4.3 WESTERN BLOTTING

4.3.1 Coleta de materiais

Os animais foram eutanasiados aos 60 dias de idade, por meio de anestesia por inalação de isoflurano e decapitados com o auxílio de uma guilhotina. Os encéfalos foram retirados e a região do hipocampo dissecada. Estas amostras foram imediatamente acondicionadas no freezer de -20°C e em seguida transferidas ao freezer -80° até as análises.

4.3.2 Western Blotting

As estruturas coletadas e armazenadas no -80°C foram homogeneizadas com tampão para extração de proteína contendo fluoreto de fenilmetilsulfonil (PMSF), um inibidor de proteases, e em seguida foram centrifugadas por 30min a 14.000g , 4°C . Os sobrenadantes foram retirados para dosagem de proteína total pelo método de Bradford, utilizando-se o reagente *Bio-Rad protein assay* (Bradford, 1976). A quantidade de proteína total foi obtida correlacionando-se a leitura da absorbância por filtro de 620nm em espectrofotômetro.

Para o procedimento de eletroforese, 30ml de proteína total de cada amostra foram aplicados no gel de eletroforese. A eletroforese foi conduzida à temperatura ambiente, sob corrente de 140 volts até correr todo corante, sendo posteriormente realizado o procedimento de eletrotransferência. As proteínas do gel foram transferidas para uma membrana de nitrocelulose (0.45mm , Millipore) pela passagem de uma corrente de 100 volts durante 2 horas em tampão de transferência contendo glicina 950 mM, Tris 125 mM e SDS $0,25\%$ em Metanol e água deionizada na proporção de $1:2:10$ ($100\text{mL}:200\text{mL}:800\text{mL}$), o processo de transferência foi realizado submerso em gelo. Em seguida as membranas foram incubadas em solução de bloqueio (leite desnatado 5%) por 60 min, lavadas por 3 vezes de 5 minutos em tampão Tris-salina, Tween 20 (TBST) e incubadas com os anticorpos primários específicos para GAPDH ($1:1000$; 37 à 40kDa ; Abcam, Reino Unido), DCX ($1:500$; 40 à 45 kDa; Abcam, Reino Unido), GR ($1:1000$; 86 à 95 kDa; Santa Cruz Biotechnology, EUA) e H3Lys14 ($1:1000$ – 17 kDa – Milipore - EUA) diluídos em Albumina (BSA) 3% em overnight a 4°C , sob agitação. Após 3 lavagens de 5 minutos cada, as membranas foram incubadas durante 1 hora com solução contendo os anticorpos secundários de acordo com a espécie em que o anticorpo primário foi produzido, o DCX e H3 tendo como secundário anti-coelho (Abcam, Reino Unido) diluído em $1:10000$ e GAPDH e GR tendo como anticorpo secundário anti-camundongo (Abcam, Reino Unido) diluído em $1:10000$. As marcações foram reveladas utilizando-se o kit ECL (Pierce™) para posterior quantificação das densidades ópticas por meio do software ImageJ, onde as amostras foram normalizadas, através de cálculos de relação da densitometria da proteína em análise (DCX, GR ou H3) sobre a densitometria da proteína padrão GAPDH.

4.4 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Todos os dados foram analisados quanto à normalidade pelo teste de Shapiro-Wilk. Nos testes comportamentais LCE, CA e RO os dados foram apresentados como média \pm erro padrão da média. Os dados que apresentaram distribuição normal foram comparados pelo teste *t student*, enquanto aqueles que não cumpriram as condições de normalidade foram submetidos ao teste *Mann-Whitney*. No teste de RO, os dados foram submetidos a análise de variância (ANOVA).

Os dados vindos da medida do imunocorrelato de DCX, GR e H3 foram submetidos a duas análises: ANOVA de duas vias, tendo como fatores linhagem e influência de testes comportamentais, e o teste *t student* na análise entre sexos. Sempre que necessário, o teste de comparação de médias (*post-hoc*) *Tuckey* foi usado após a ANOVA. O tamanho do efeito foi calculado através da fórmula *Cohen's d* = (M2 - M1) / *DPpooled* (onde, *DPpooled* = $\sqrt{((DP1^2 + DP2^2) / 2)}$), nas análises submetidas ao teste *t*, sendo interpretado como pequeno (*Cohen's d* = <0,2), médio (*Cohen's d* = 0,3-0,7) ou grande (*Cohen's d* = >0,8). Em todas as comparações, $p < 0,05$ foi considerado significativo. O software estatístico utilizado foi o GraphPad Prism 7.

5.RESULTADOS

5.1 ANÁLISES COMPORTAMENTAIS

5.1.1 Labirinto em cruz elevado

Com relação ao tempo de permanência nos braços abertos, as fêmeas apresentaram uma diferença próxima ao nível de significância ($p=0,07$; *Cohen's d* = 1.255039; Figura 7A), permanecendo por mais tempo nos braços abertos, quando comparadas aos machos. Já na observação do tempo de permanência dos braços fechados houve aumento significativo na comparação dos machos SLA16 com machos SHR ($p=0,0349$; *Cohen's d* = 2.231389; Figura 7B). Ainda, na observação da frequência de entradas nos braços abertos as fêmeas SLA16 também apresentaram uma diferença próxima aos níveis de significância, com maior entrada nos braços abertos quando comparadas as fêmeas SHR ($p=0,09$; *Cohen's d* = 1.065071; Figura 7C). As fêmeas SLA16 apresentaram um aumento significativo na frequência de entradas nos braços fechados quando comparada as fêmeas SHR, com $p=0,0277$; (*Cohen's d*= 4.353451) (Figura 7D).

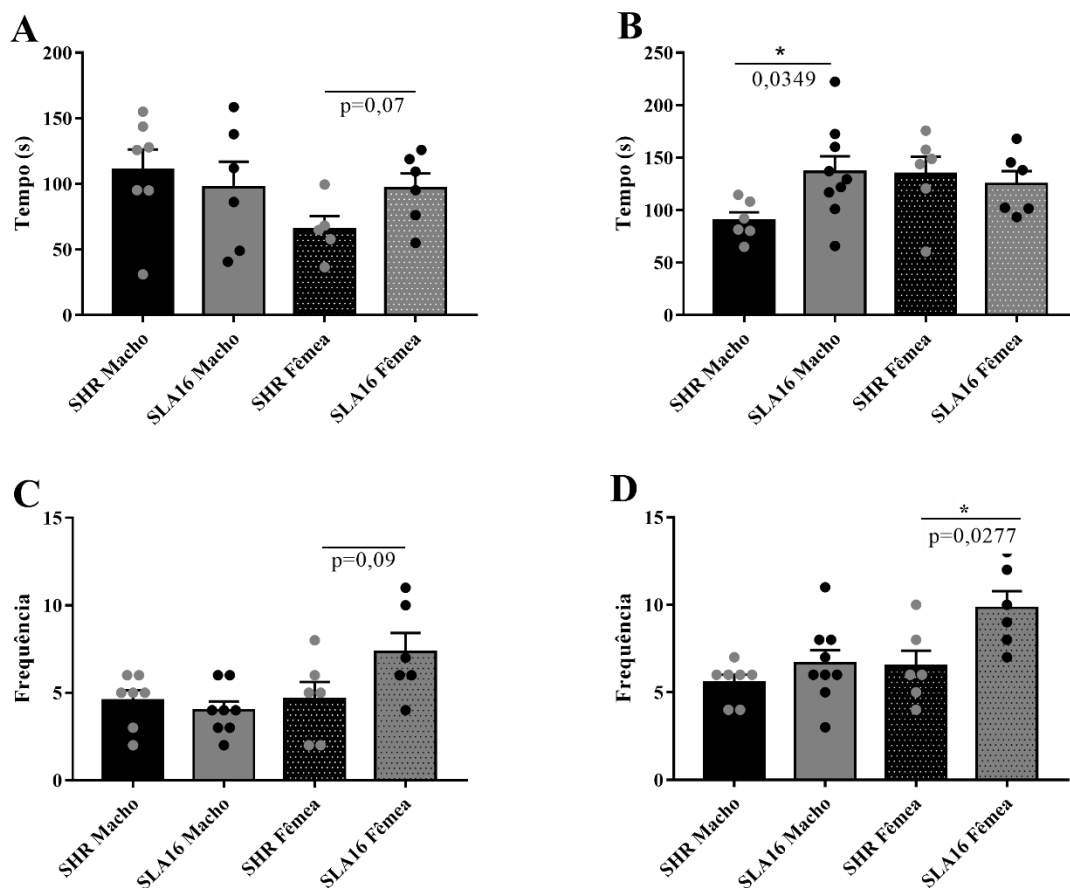


Figura 7: Performance no Labirinto em Cruz Elevado mensurada como tempo de permanência e frequência de entrada nos braços abertos (a, c) e tempo de permanência e frequência de entradas nos braços fechados (b, d) em machos (barras pretas) e fêmeas (barras pretas pontilhadas) da linhagem SHR e machos (barras cinzas) e fêmeas (barras cinzas pontilhadas) da linhagem SLA16. Teste *t student* ou *Mann-Whitney*. Os dados estão expressos como média \pm EPM. * $p < 0,05$.

Com relação as variáveis etológicas avaliadas no LCE, não houve diferença significativa entre os grupos estudados na frequência de autolimpeza (Figura 8A), imersão de cabeça (Figura 8B), SAP (Figura 8C) e elevação vertical (Figura 8D). Contudo, é possível observar uma tendência de aumento na frequência de autolimpeza em fêmeas comparadas aos machos da mesma linhagem ($p = 0,0536$; *Cohen D* = 0.070479).

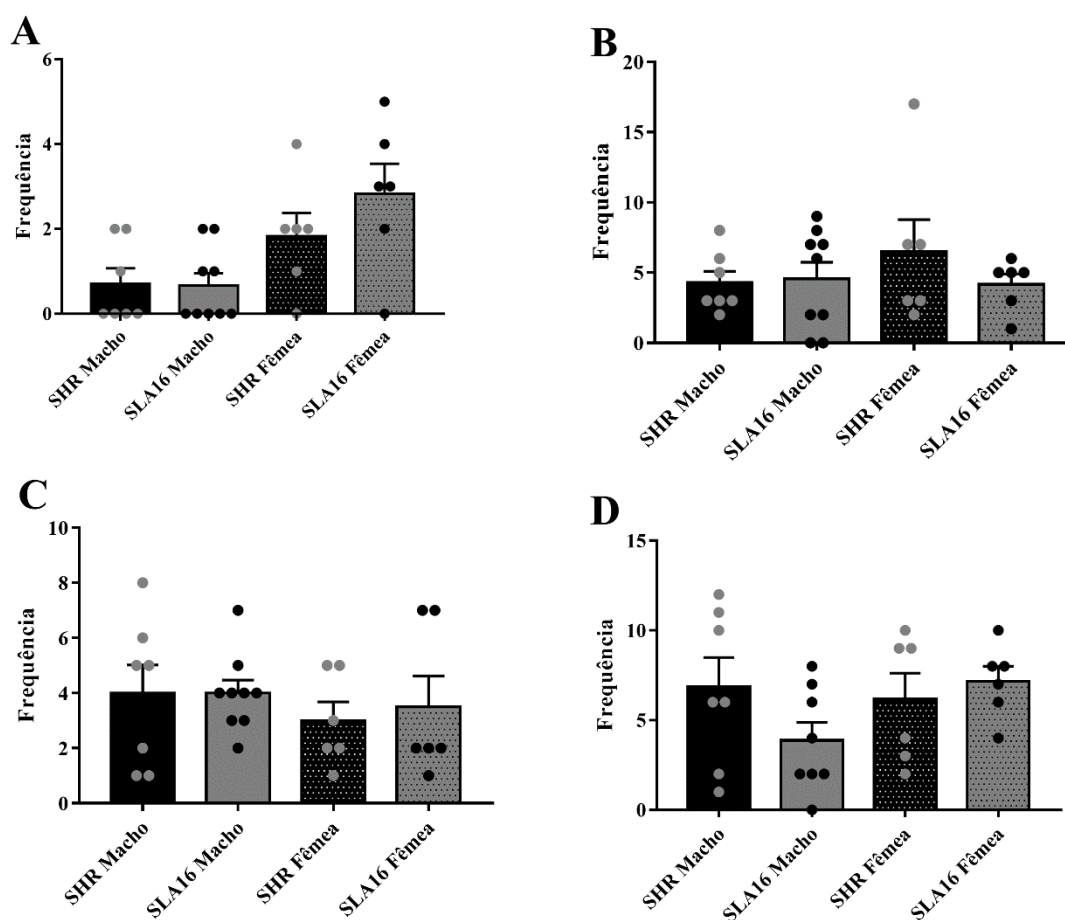


Figura 8. Variações etológicas observadas no Labirinto em Cruz Elevado através da frequência de: (A) autolimpieza, (B) imersão de cabeça, (C) SAP e (D) elevação vertical em machos (barras pretas lisas) e em fêmeas (barras pretas pontilhadas) da linhagem SHR e machos (barras cinza lisa) e em fêmeas (barra cinza pontilhada) da linhagem SLA16. Foram utilizados os testes *t student* ou *Mann-Whitney*. Os dados estão expressos como média \pm EPM. * $p < 0,05$.

5.1.2 Campo aberto

Com relação à locomoção avaliada no CA, houve diferença significativa entre fêmeas das duas linhagens analisadas, sendo que fêmeas SLA16 apresentaram maior locomoção quando comparadas as fêmeas SHR ($p < 0,0195$; *Cohen's d* = 0.160094; Figura 9A). Já com relação à frequência de passagens pelo centro do CA houve novamente um aumento próximo dos níveis de significância ($p = 0,06$; *Cohen's d* = 2.1895), nas fêmeas

SLA16 em comparação com as fêmeas SHR (Figura 9B). O tempo de tigmotaxia não foi diferente entre os grupos estudados (Figura 9C)

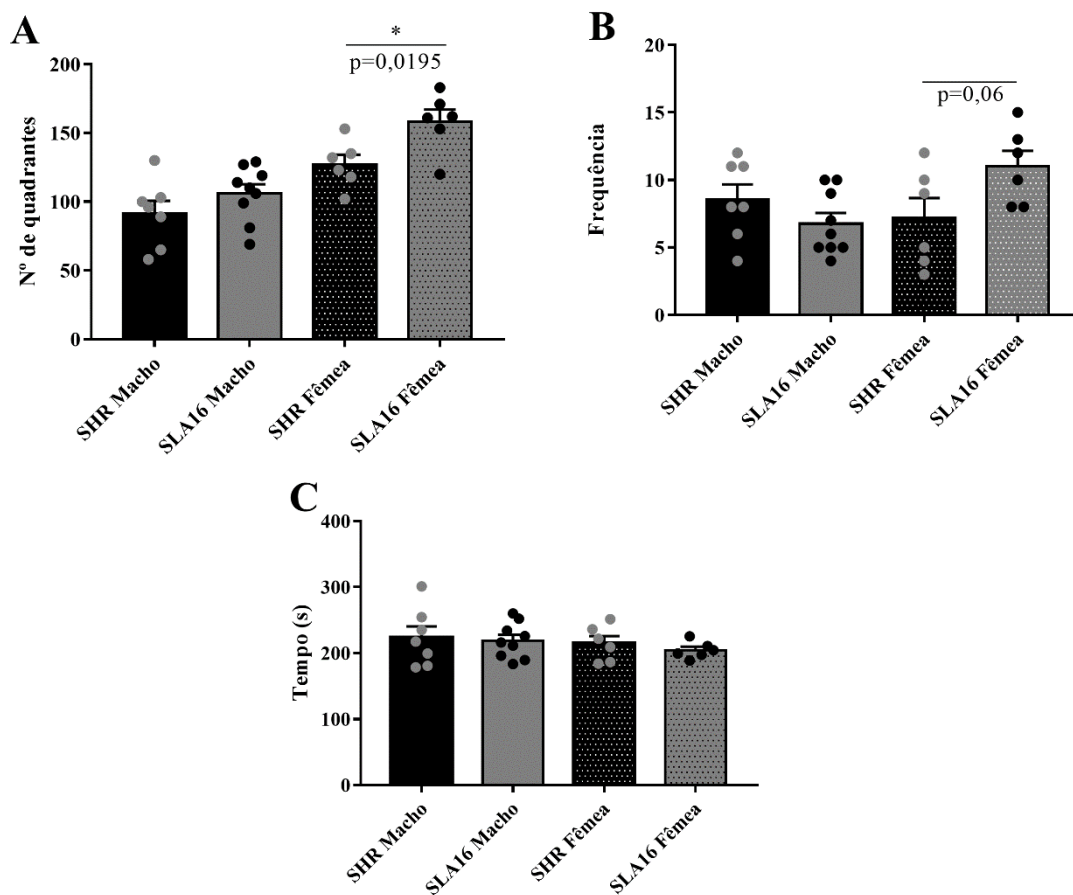


Figura 9: Performance no Campo Aberto mensurada como (a) total de quadrantes percorridos, (b) nº de passagens pelo centro do campo aberto e (c) tempo de tigmotaxia em machos (barras pretas) e fêmeas (barras pretas pontilhadas) da linhagem SHR e machos (barras cinzas) e fêmeas (barras cinzas pontilhadas) da linhagem SLA16. Foram utilizados os testes *t student* ou *Mann-Whitney*. Os dados estão expressos como média ± EPM. * $p < 0,05$.

Com relação as variáveis etológicas analisadas no CA, não houve diferença significativa entre os grupos estudados na frequência de autolimpeza (Figura 10A) e no número de bolos fecais (Figura 10C). Porém, as fêmeas SLA16 apresentaram uma

tendência ($p=0,05$; *Cohen's d* = 0.969694.) a maior frequência de elevação vertical, quando comparadas às fêmeas SHR (Figura 10B).

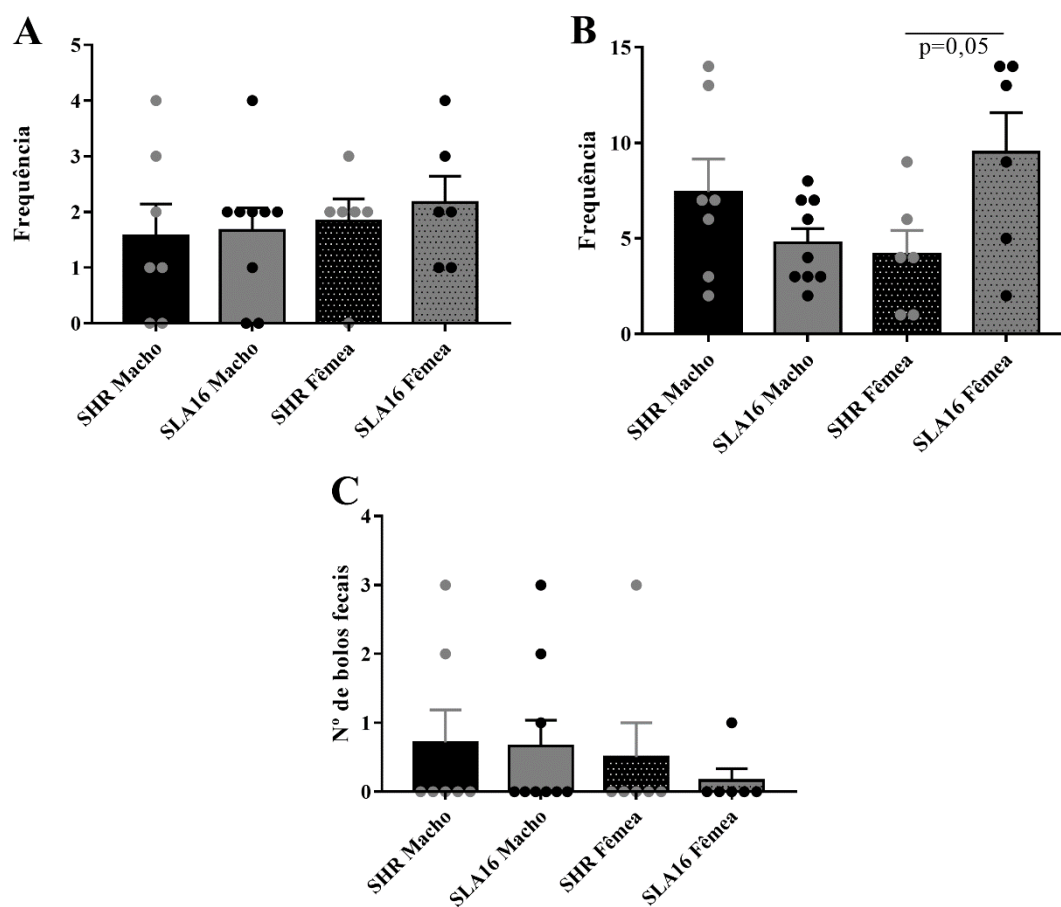


Figura 10: Variações etológicas observadas no Campo Aberto através da frequência de: (a) autolimpeza, (b) elevação vertical e (c) bolos fecais em machos (barras pretas lisas) e em fêmeas (barras pretas pontilhadas) da linhagem SHR e machos (barras cinza lisa) e em fêmeas (barra cinza pontilhada) da linhagem SLA16. Foram utilizados os testes *t student* ou *Mann-Whitney*. Os dados estão expressos como média ± EPM. * $p<0,05$.

5.1.3 Reconhecimento de objetos

No teste de RO, o índice de discriminação não foi estatisticamente diferente entre os grupos estudados (Figura 11). O índice de reconhecimento entre os grupos foi utilizado para observar o aprendizado da atividade em identificar o objeto novo.

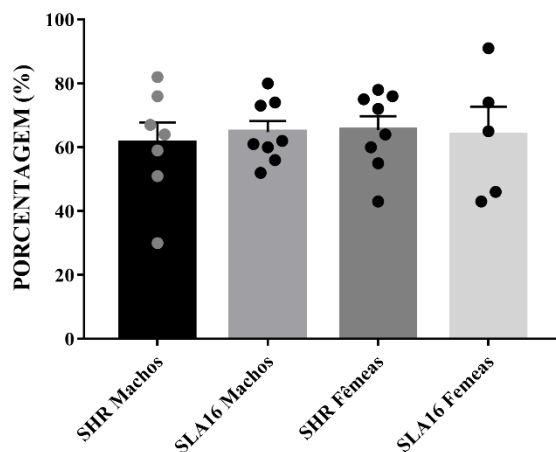


Figura 11. (a) Performance no teste de Reconhecimento de Objeto mensurado em porcentagem do tempo de exploração do objeto novo em relação ao tempo total do teste. No eixo x estão apresentados em barras, respectivamente, os grupos SHR Machos, SLA16 Machos, SHR Fêmeas, SLA16 Fêmeas. O teste utilizado para análise foi ANOVA de uma via. Os dados estão expressos como média \pm SEM. * $p < 0,05$

5.2 DOSAGENS MOLECULARES HIPOCAMPAIS

5.2.1 Doublecortina (DCX)

Quando observada o imunoconteúdo hipocampal de DCX, pode-se observar que não houve efeito significativo nem da exposição aos testes comportamentais e nem das linhagens, tanto em machos (Figura 12A), quanto em fêmeas (Figura 12B).

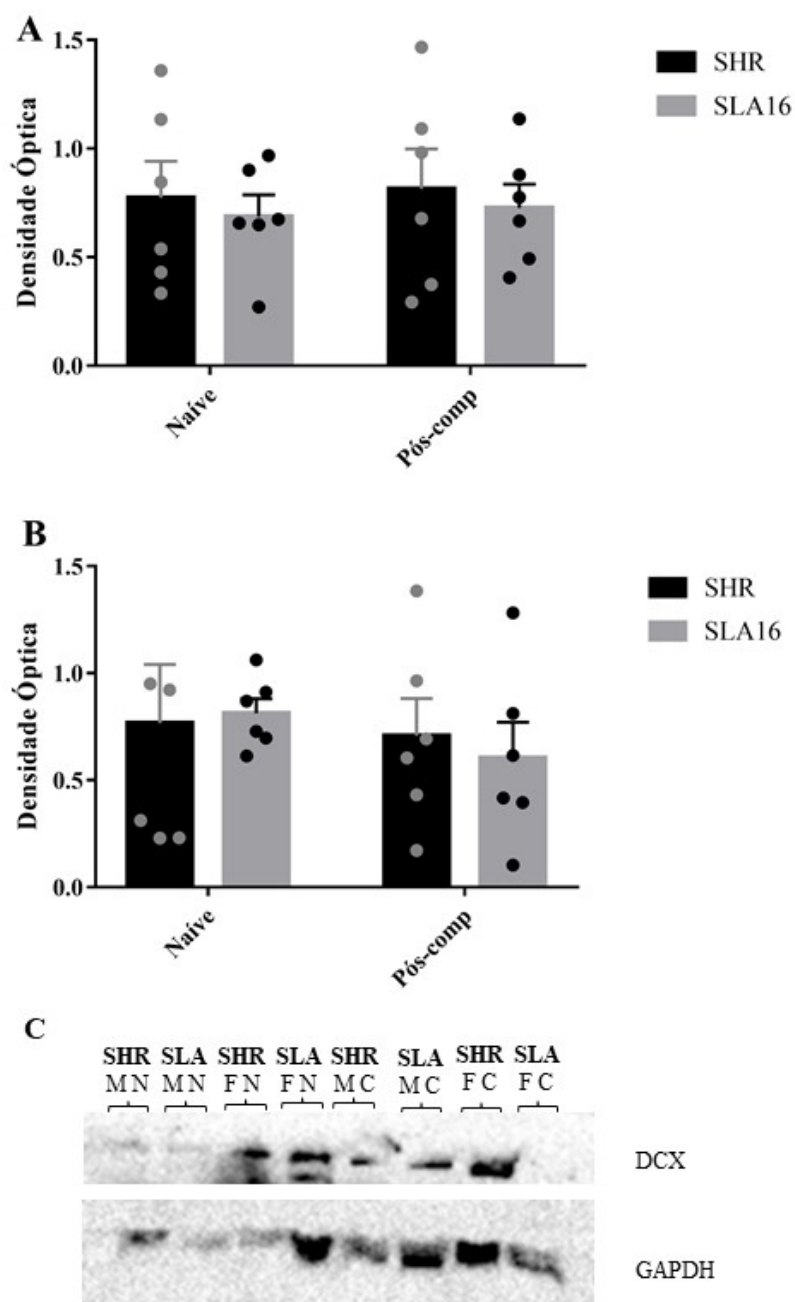


Figura 12: Os gráficos (a-b) demonstram a densidade óptica de DCX hipocampal dos grupos *naïves* e pós-comportamento, respectivamente e a relação entre as linhagens SHR (cinza) e SLA16 (preto). (c) Densidade óptica utilizada para análise. O teste utilizado para análise foi ANOVA de duas vias tendo como fator comportamento e linhagem. Os dados estão expressos como média \pm SEM. * $p < 0,05$

O mesmo resultado foi encontrado com relação ao imunocontéudo hipocampal de GR, onde não houve efeito significativo nem da exposição aos testes

comportamentais e nem das linhagens estudadas, tanto em machos (Figura 13A) quanto em fêmeas (Figura 13B).

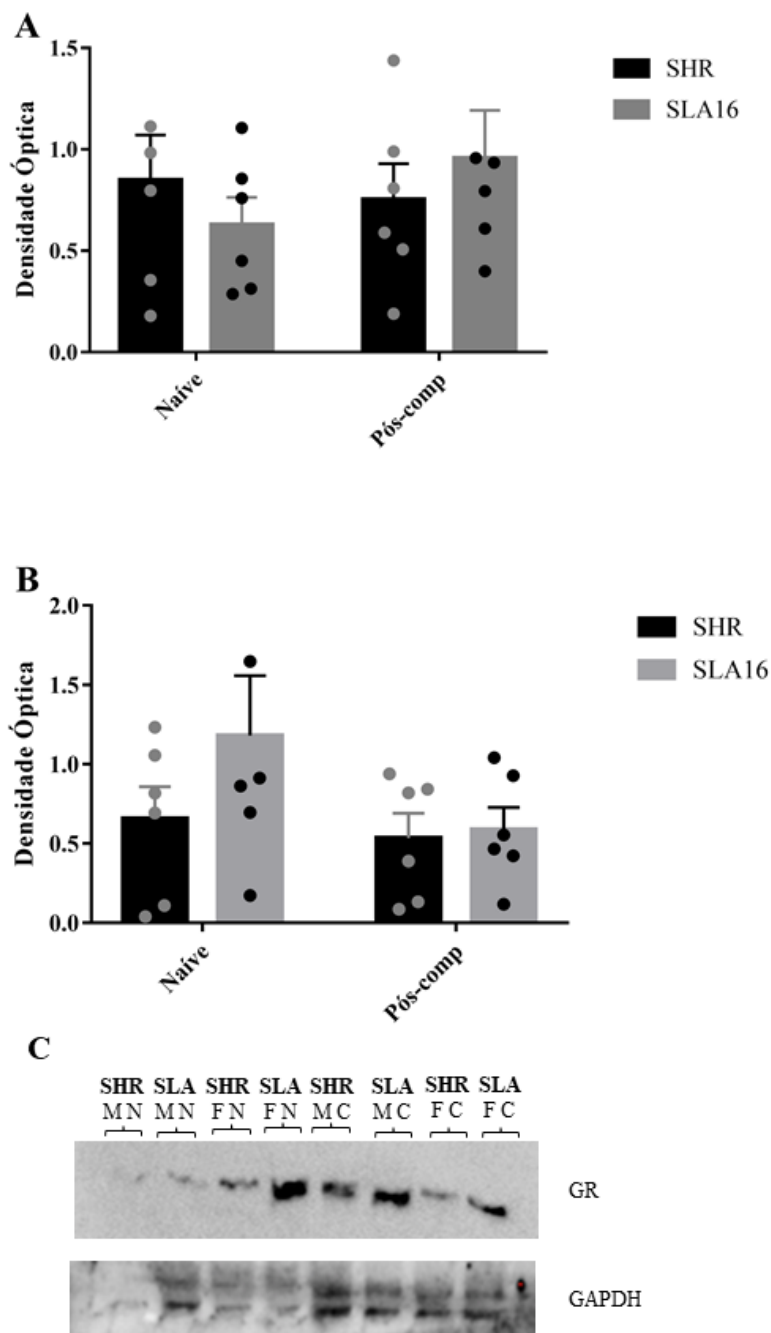


Figura 13. Os gráficos (a-b) demonstram a densidade óptica de GR hipocampal dos grupos *naïves* e pós-comportamento, respectivamente e a relação entre as linhagens SHR (cinza) e SLA16 (preto). (c) Densidade óptica utilizada para análise. O teste utilizado para análise foi ANOVA de duas vias tendo como fator comportamento e linhagem. Os dados estão expressos como média \pm SEM. * $p < 0,05$

Na avaliação do imunocontéudo hipocampal da histona H3, também não observamos nenhuma influência significativa da exposição aos testes comportamentais ou das linhagens, seja nos machos (Figura 14A) ou nas fêmeas (Figura 14B).

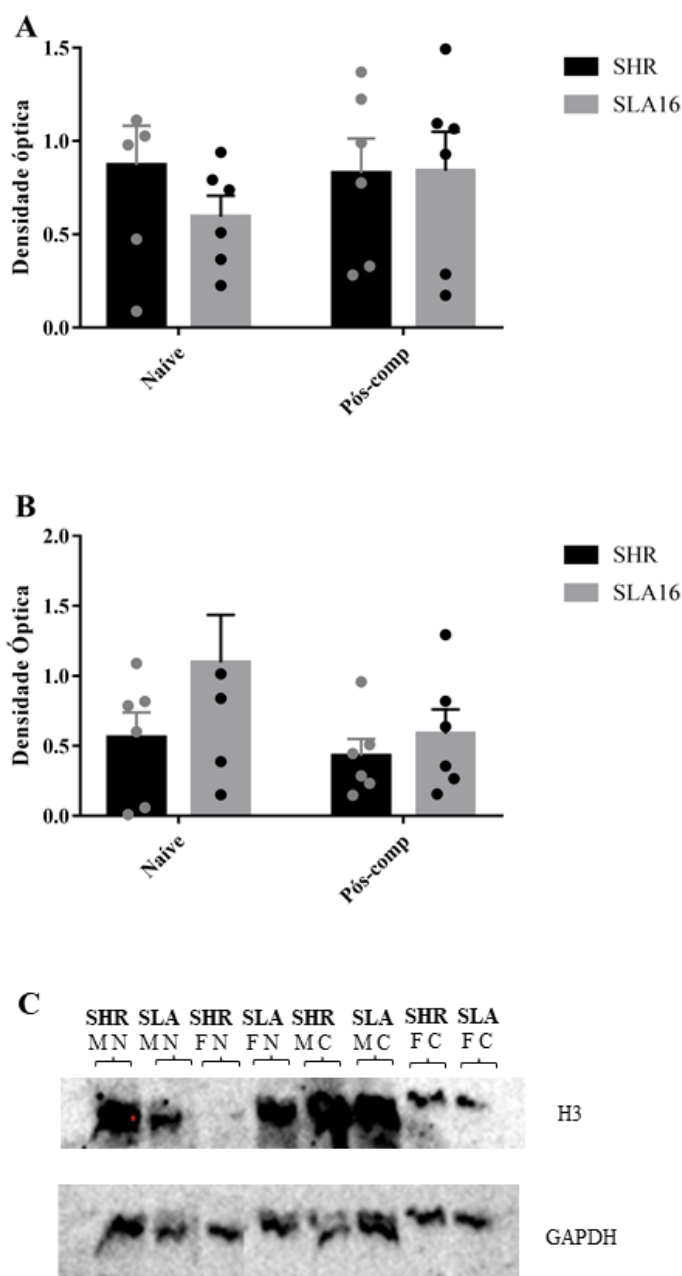


Figura 14: Os gráficos (a-b) demonstram a densidade óptica de H3 hipocampal dos grupos *naïves* e pós-comportamento, respectivamente e a relação entre as linhagens SHR (cinza) e SLA16 (preto). (c) Densidade óptica utilizada para análise. O teste utilizado para análise foi ANOVA de duas vias tendo como fator comportamento e linhagem. Os dados estão expressos como média \pm SEM. * $p < 0,05$

5.3 AVALIAÇÃO ENTRE SEXOS NO IMUNOCONTEÚDO DOS MARCADORES MOLECULARES HIPOCAMPAIS

Com a finalidade de se comparar as expressões moleculares de DCX, GR e H3 entre sexos, os grupos *naïves* e pós-comportamentos foram comparados em cada linhagem

Com relação ao imunoconteúdo de DCX entre gêneros, não houve diferenças significantes entre machos e fêmeas dos grupos *naïve* ou pós-comportamento na linhagem SHR (Figura 15A). Da mesma forma a linhagem SLA16 não revelou nenhuma diferença significativa entre os sexos (Figura 15B).

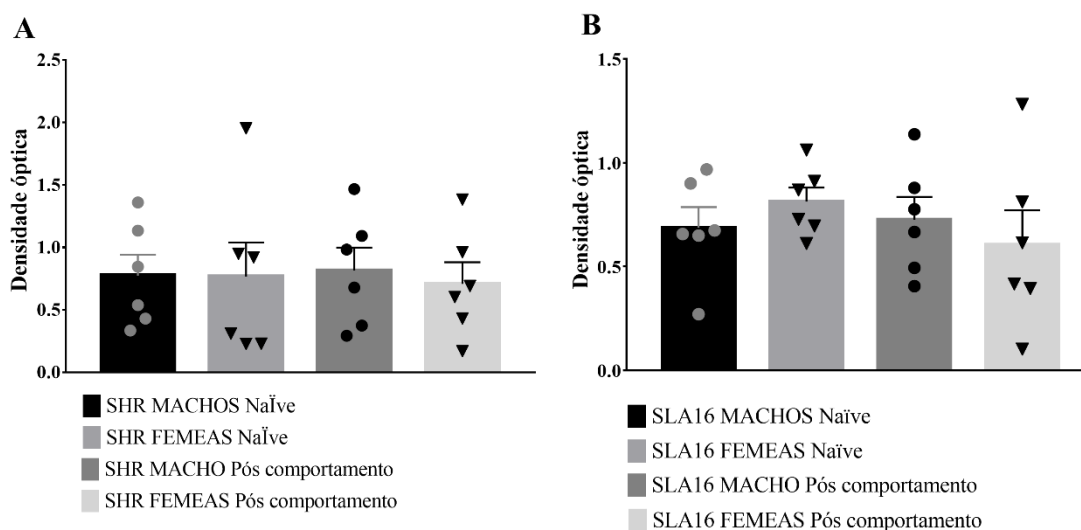


Figura 15: Comparação do imunoconteúdo de DCX hipocampal entre gêneros, de grupos *naïves* e pós-comportamento, das linhagens (a) SHR e (b) SLA16. Utilização do test t pareado. Os dados estão expressos como média \pm SEM. * $p < 0,05$.

Quando machos e fêmeas SHR (Figura 16A) e SLA16 (Figura 16B), *naïves* ou pós-comportamento foram comparados quanto o imunoconteúdo de GR, não foram observadas diferenças estatisticamente significativas.

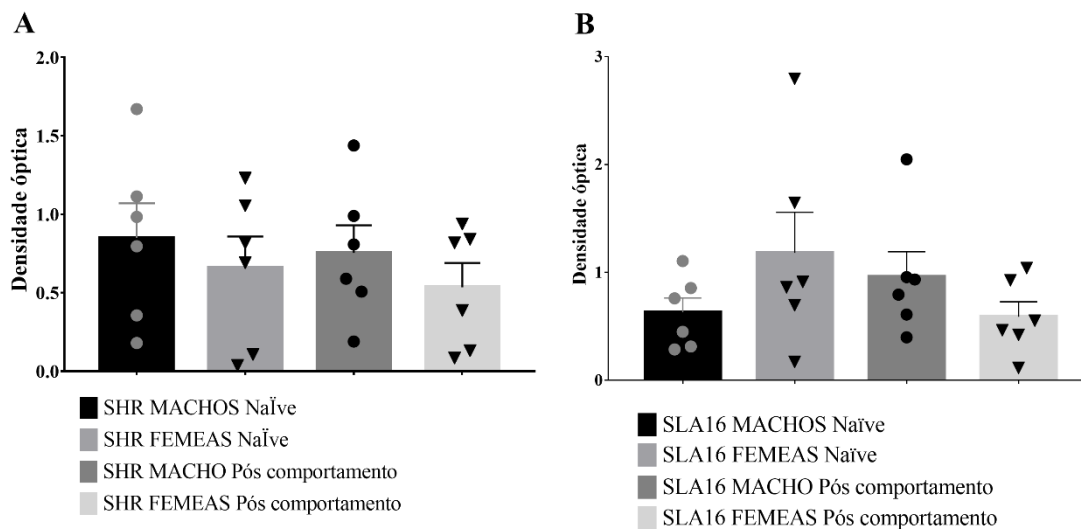


Figura 16: Comparação do imunoconteúdo de GR hipocampal entre sexos, de grupos *naïves* e pós-comportamento, das linhagens (a) SHR e (b) SLA16. Utilização do teste *t* pareado. Os dados estão expressos como média \pm SEM. * $p < 0,05$.

Como pode-se observar na Figura 17A, o imunoconteúdo de H3 foi reduzida ($p = 0,0243$; *Cohen's d* = 1.046325.) em fêmeas SHR pós-comportamento em comparação com machos SHR do mesmo grupo. Entretanto a comparação entre machos e fêmeas *naïves* não apresentou diferença entre os sexos (Figura 17A). A análise realizada entre machos e fêmeas da linhagem SLA16 não revelou diferença significativa em nenhum dos grupos, *naïve* ou pós-comportamento (Figura 17B).

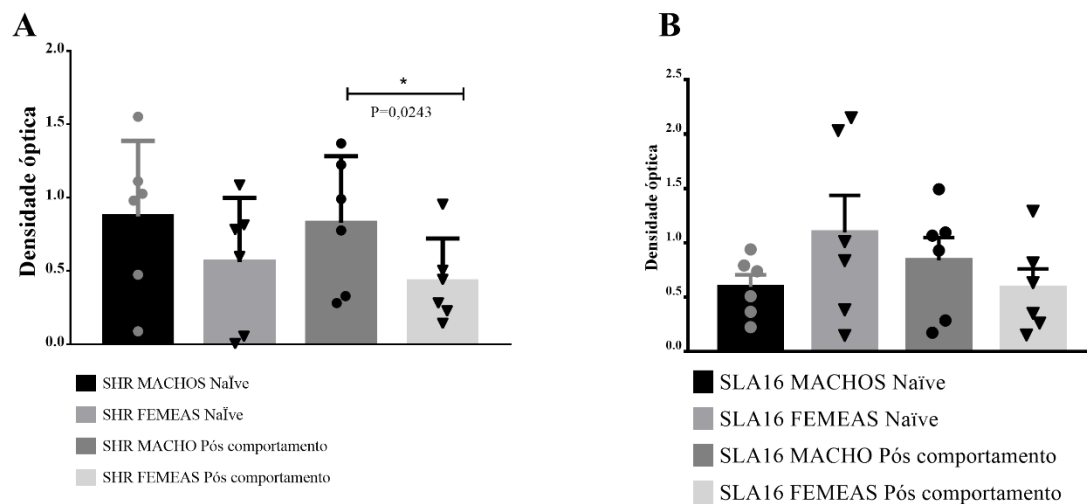


Figura 17: Comparação do imunoconteúdo de H3 hipocampal entre gêneros, de grupos *naïves* e pós-comportamento, das linhagens (a) SHR e (b) SLA16. Utilização do teste *t* pareado. Os dados estão expressos como média \pm SEM. * $p < 0,05$.

6. DISCUSSÃO

O presente estudo comprovou apenas parcialmente a hipótese proposta, visto que os animais da linhagem SLA16, tanto machos quanto fêmeas, não apresentaram maior imunocontéudo de DCX no hipocampo, apesar de apresentarem diferenças comportamentais. Ainda, a análise realizada entre os grupos de animais *naives* e pós comportamento mostrou que nem os machos e nem as fêmeas *naives* apresentaram aumento do imunocontéudo de GR e H3 no hipocampo. Entretanto, na linhagem SHR os machos do grupo pós comportamento apresentaram maior imunocontéudo de H3 quando comparados com as fêmeas da mesma linhagem. As comparações entre as expressões de DCX e GR não apresentaram diferenças entre os grupos analisados.

De maneira geral, as linhagens não diferiram entre si com relação a expressão de marcadores neurais no hipocampo, mesmo na presença de algumas diferenças comportamentais, principalmente relacionadas ao comportamento do tipo ansioso. Entretanto, como proposto inicialmente, encontramos dimorfismo sexual no imunocontéudo de pelo menos um dos marcadores estudados, o que confirma a importância de se analisar fêmeas e machos em estudos pré-clínicos e clínicos.

6.1 O COMPORTAMENTO RELACIONADO A ANSIEDADE

Na primeira fase experimental, a proposta envolvia a submissão dos animais a testes comportamentais para observação de comportamentos relacionados à emocionalidade/ansiedade. Tais testes são utilizados para investigação da função cerebral e possíveis tratamentos em diversos modelos (ARAKAWA; IGUCHI, 2018; RAMOS, 2008). Os testes comportamentais realizados neste trabalho são descritos como não condicionados, conforme proposto anteriormente (GRIEBEL, 1995), baseando-se principalmente no comportamento exploratório em roedores (FUCHS; FLUGGE; CZECH, 2006).

Os roedores possuem a tendência natural de explorar ambientes, mas tendem a evitar lugares desprotegidos, iluminados e elevados. No LCE, os animais são submetidos ao aparato, sendo observado o comportamento inato de evitar locais como os braços abertos, onde estariam se expondo ao risco (KORTE, 2001). O número de entradas

nos braços abertos e o tempo de permanência, são utilizados como índice de ansiedade, ou seja, animais com maior nível de ansiedade tendem a evitar o braço aberto, enquanto animais com menor nível tendem a entrar mais no ambiente aberto. O aumento da preferência pelos braços abertos também indica redução do medo não condicionado (ARI et al., 2019). Por outro lado, o número de entradas nos braços fechados é normalmente utilizado como medida de atividade locomotora (CAMPOS et al., 2013; RODGERS et al., 1997). Dessa forma, o presente trabalho mostrou que as fêmeas SLA16 mostraram uma tendência a apresentar menor nível de comportamento relacionado à ansiedade, quando comparadas às fêmeas SHR. Já com relação aos braços fechados, as fêmeas da linhagem SLA16 demonstraram uma frequência de entrada mais elevada, sugerindo maior atividade locomotora quando comparada às ratas SHR (CAMPOS et al., 2013). Ambos os resultados corroboram dados prévios (ANSELMINI et al., 2016; CORRÊA, 2015) que mostram que animais da linhagem SLA16 apresentam maiores níveis de atividade locomotora e menores níveis de ansiedade do que aqueles da linhagem SHR.

Foi interessante notar que houve dimorfismo sexual na resposta comportamental das linhagens no LCE. Enquanto os machos de ambas as linhagens apresentaram resposta comportamental semelhante nos braços abertos, nos braços fechados foi observado um aumento do tempo de permanência dos machos SLA16, quando comparados aos machos SHR. A maior permanência nos braços fechados no labirinto pode ser interpretada como um comportamento relacionado à ansiedade, visto que o animal se mantém no local mais protegido do aparato (RODGERS et al., 1997).

Quando submetidos ao campo aberto, os modelos animais com altos níveis de ansiedade, tendem a se manter próximos as paredes, por ser um local considerado seguro pelos roedores, que evitam o centro da arena, o que chamamos de tigmotaxia, (ENNACEUR et al., 2010). Animais com fenótipos de alta emocionalidade/ansiedade são capazes de se submeter com mais frequência ao centro da arena, como observado no grupo SLA16 (SEIBENHENER; WOOTEN, 2015). Os resultados encontrados no teste do CA também corroboraram a ideia de que as fêmeas da linhagem SLA16 apresentam maiores níveis de atividade locomotora visto pelo aumento do número de quadrantes percorridos (RAMOS et al., 1997). Vale ressaltar que a locomoção aumentada pode também ser interpretada como sinal de baixa resposta emocional, não inibida pelo medo (GENTSCH; LICHTSTEINER; FEER, 1991). Ao contrário do que é visto na literatura, o número de passagens pelo centro do CA não foi diferente entre SLA16 e SHR machos

(CORRÊA, 2015). Entre as fêmeas, foi observada apenas uma tendência das ratas SLA16 realizarem mais passagens pelo centro do CA, o que também corrobora dados da literatura (ANSELMÍ et al., 2016). O aumento da tigmotaxia, que poderia indicar um aumento do comportamento tipo ansioso, não ocorreu em nenhuma das linhagens e nem entre sexos.

O nível de atividade locomotora, juntamente com outros parâmetros (por exemplo, defecação), é frequentemente considerado um indicador da emocionalidade do animal. Apesar de estudos relacionarem a reatividade emocional do SHR com a emocionalidade diminuída (GENTSCH; LICHTSTEINER; FEER, 1991; HÅRD et al., 1985; ROGERS; SINK; HAMBLEY, 1988), há evidências que sugerem que não é ideal assumir a emocionalidade como um traço unidirecional (RAMOS et al., 1998).

Descobertas anteriores mostraram que fêmeas de diferentes linhagens de ratos apresentam maior locomoção no CA, quando comparadas aos machos (MCCORMICK et al., 2005; RAMOS et al., 1997). Este fato foi observado no presente estudo, onde as fêmeas de ambas as linhagens apresentaram maior nível de locomoção. Há autores que correlacionam essa característica com o fato de, por serem mães em potencial, as fêmeas se familiarizam melhor com o ambiente desconhecido do que os machos, o que permitiria uma gestação, parto e cuidado da prole com menos distúrbios ambientais (DUBOVICKÝ; ŠKULTÉTYOVÁ; JEŽOVÁ, 1999).

A visão de que os animais expressam um impulso para explorar um espaço desprotegido permanece especulativa. Portanto, para complementar os dados, avaliamos também parâmetros etológicos durante o LCE e o CA. A variação etológica nos permite avaliar um padrão mais completo do comportamento animal durante a sessão de teste de 5 minutos, complementando a avaliação da locomoção espacial (CAROBREZ; BERTOGLIO, 2005).

A autolimpeza, um comportamento inato realizado pelos roedores, pode ser apresentada com maior frequência em momentos de baixo ou alto estresse. A diferença é que, quando realizado sem o fator estresse, a autolimpeza é feita de forma cuidadosa, como lamber a pata, cauda e genitais. Na realização da limpeza em situação estressante, são observados movimentos curtos e rápidos (KALUEFF; TUOHIMAA, 2004). No presente estudo, não foram encontradas diferenças significativas na frequência da autolimpeza entre os grupos, tanto no LCE, quanto no CA, sugerindo que a resposta ao estímulo estressante de exposição aos testes comportamentais foi similar entre as linhagens e sexos.

O mesmo ocorreu com relação ao número de bolos fecais nos diferentes grupos. Esta é uma medida especulativa de reatividade emocional quanto à exposição a um ambiente novo (GENTSCH; LICHTSTEINER; FEER, 1987). Os resultados de variação etológica, da autolimpeza e do número de bolos fecais nos mostram que os grupos analisados apresentam variabilidade, sendo necessários mais testes, com moduladores emocionais, com o intuito de determinar a relação da emocionalidade e das variações etológicas nas linhagens estudadas. Outro parâmetro interessante para análise é a elevação vertical, que está relacionada com a exploração/atividade, e inversamente correlacionada à defecação (STURMAN; GERMAIN; BOHACEK, 2018). Enquanto no LCE não foram encontradas diferenças nas frequências de elevações entre machos ou fêmeas, no CA observou-se uma tendência no aumento da frequência de elevações das fêmeas SLA16 quando comparadas as fêmeas SHR, sugerindo maior atividade exploratória das ratas SLA16.

O comportamento de imersão de cabeça se relaciona com a avaliação de risco do animal, bem como com sua atividade exploratória (DALVI; RODGERS, 1999) e a exposição a altura pode facilitar o aprendizado sobre relações espaciais. (LEVER; BURTON; O'KEEFE, 2006). Já o SAP integra o repertório de "avaliação de risco" de comportamentos defensivos em roedores, que ocorrem em resposta a estímulos de ameaça discretos (GREWAL et al., 1997). A ausência de diferenças entre os grupos do presente trabalho com relação à imersão de cabeça e ao SAP também sugerem respostas comportamentais similares frente ao ambiente aversivo elicitado por estes testes comportamentais.

De maneira geral, nossos dados mostraram que fêmeas SLA16 apresentaram diferenças significantes quando comparadas com fêmeas SHR, mas o mesmo não ocorreu quando os machos de ambas as linhagens foram comparados. Medeiros e colaboradores (2013) evidenciaram a confiabilidade da linhagem SLA16 em testes comportamentais relacionados à emocionalidade em ambos os sexos. Além disso, e ao contrário do presente estudo, outros autores encontraram diferenças significativas comportamentais apenas entre os machos (CÔRREA, 2015). É importante ressaltar que apesar da expectativa teórica de que o modelo reproduza todas as características do contexto esperado, isso raramente é alcançado. Além disso, as condições em que os testes comportamentais são aplicados, bem como as próprias características dos aparatos utilizados podem interferir nos resultados encontrados, gerando dados contraditórios. Ademais, existem diversas

diferenças cognitivas entre humanos e animais com relação aos transtornos psiquiátricos. Os modelos animais de ansiedade, portanto, não pretendem replicar todas as características e sintomas de um transtorno de ansiedade específico, mas sim gerar um estado de ansiedade que possa estar relacionado a esses transtornos (CAMPOS et al., 2013).

6.2 ANSIEDADE E MATURAÇÃO NEURONAL.

A influência das emoções defensivas de ansiedade e medo no comportamento motor do rato é um tópico complexo. O estresse é outro fator importante na etiologia dos distúrbios comportamentais afetando o comportamento em campo aberto (SESTAKOVA et al., 2013). O hipocampo é um alvo-chave da resposta ao estresse, e os comportamentos dependentes do hipocampo são fortemente influenciados (STURMAN; GERMAIN; BOHACEK, 2018).

Para melhor avaliar a memória e os efeitos da exposição a testes comportamentais, avaliamos o imunocontéudo da proteína DCX, que é um marcador de neurogênese. Tendo em vista que a atividade locomotora foi diferente entre as linhagens, era esperado encontrar diferenças, mesmo que sutis, na expressão deste marcador, tendo em vista estudos anteriores que mostraram esta diferença em ratos machos (NOKIA et al., 2016). Entretanto, os dados do presente estudo não mostraram diferenças no imunocontéudo hipocampal de DCX entre os grupos. Acreditamos que, possivelmente, se esses animais fossem desafiados em uma situação de estresse, por exemplo, as diferenças entre os grupos seriam mais evidenciadas (MCEWEN; NASCA; GRAY, 2016). Sendo a neurogênese um processo dinâmico, o estresse crônico e a resposta aos níveis de corticosterona diminuem a proliferação celular, enquanto a atividade física e um ambiente enriquecido aumentam o volume do giro dentado e o número de neurônios incorporados (KEMPERMANN et al., 2010; KEMPERMANN; KUHN; GAGE, 1997; MCEWEN; NASCA; GRAY, 2016). Outra hipótese para a ausência de diferenças entre os grupos estudados seria o fato da neurogênese ocorrer principalmente no giro dentado, enquanto no presente estudo foi utilizado todo o hipocampo. Isto pode ter mascarado possíveis diferenças de imunomarcção entre os grupos.

Além disso, estudos com roedores demonstraram que a redução ou aumento da neurogênese modula comportamentos do tipo ansioso e depressivo apenas em resposta ao estresse e que a neurogênese não modula esses comportamentos se o estresse estiver ausente (ANACKER et al., 2011). Em contrapartida, alguns experimentos revelaram que

mesmo sem estímulo do estresse a diminuição da neurogênese aumenta o comportamento semelhante a ansiedade (REVEST et al., 2009).

6.3 O IMUNOCONTEÚDO DAS MOLECULAS GR E H3 APÓS EXPOSIÇÃO A TESTES COMPORTAMENTAIS NÃO CONDICIONANTES.

Para observar o imunocontéudo basal de marcadores de estresse, optamos pela avaliação da imunomarcção de GR no hipocampo. Os transtornos de ansiedade estão frequentemente associados à hiperatividade do eixo HPA e comumente fêmeas apresentam maior desregulação do eixo HPA do que machos (DALLA et al., 2005; GRAY et al., 2017). Os GR medeiam a consolidação de informações relevantes ao contexto, otimizando a adaptação e a sobrevivência em uma variedade de tarefas de memória espaciais e relacionadas ao medo. Após uma situação estressante, a ativação do GR leva a excitabilidade neuronal, devido a modulação do fluxo de cálcio e com seu envolvimento com receptores de glutamato. Dessa forma, as redes neurais conseguem normalizar a atividade hipocampal e proteger as informações adquiridas durante experiência (MYERS; MCKLVEEN; HERMAN, 2014).

Por sua vez, quando a expressão de GR é inibida em todo cérebro, é observada a diminuição de comportamentos ansiosos (TRONCHE et al., 1999). Entretanto, no presente estudo, não foi observada diferença significativa no imunocontéudo de GR no hipocampo após os testes comportamentais, seja pela exposição ao ambiente novo ou pelo estímulo de aprendizagem. Alguns estudos revelam a elevação da expressão de GR após estresse crônico e memória contextual por medo (GRAY et al., 2017). Todavia, mais estudos com dosagens de corticosteroide agudo e crônico precisam ser realizados para melhor caracterização e análise de distúrbios presentes nessa via nas linhagens estudadas.

Os GR quando ativados modulam a transcrição ao interagir com outros fatores de transcrição, como a proteína de ligação a CREB (CBP) e a p300/fator associado ao CBP (pCAF), envolvidas na acetilação de histonas (BARNES, 2006). A análise de modificações nas histonas, como a acetilação da histona H3, fornece informações sobre um evento importante denominado de epigenética, isto é, a modulação do aumento ou diminuição da expressão gênica no local analisado (BOUSIGES et al., 2010). Vários estudos evidenciaram modificações na acetilação das histonas em resposta à formação da memória, em particular nas histonas H3 e H4 (GRÄFF; MANSUY, 2008).

Mecanismos epigenéticos têm sido usados para explicar como as exposições a estímulos tóxicos ou estressantes podem contribuir para a predisposição ou o desenvolvimento de doenças mentais (YOUNG et al., 2016). Neste estudo, optamos por caracterizar a presença do imunocontéudo de H3 no hipocampo após o teste de reconhecimento de objeto, que avalia o desempenho cognitivo sem reforços positivos ou negativos, sendo mais apropriado no estudo de mecanismos neurais relativos ao desempenho cognitivo. Não encontramos diferenças significativas entre as linhagens e nem entre os sexos, indicando que a região *Anxrr16* não parece estar diretamente relacionada com este aspecto do processo cognitivo.

Estudos anteriores encontraram a maior expressão de H3 em neurônios granulares do hipocampo, em ratos, após uma situação de estresse eminente de nado forçado e exposição ao predador (KURDISTANI; TAVAZOIE; GRUNSTEIN, 2004) e também, mostrou-se elevado rapidamente 1 hora após teste de aprendizagem espacial (Labirinto aquático) e medo condicionado. Desta forma, parece que o aumento da expressão de H3 pode ser estimulado a partir dos estímulos mais relacionados à indução do medo (BOUSIGES et al., 2010; LEVENSON et al., 2004).

6.4 O IMUNOCONTEÚDO DOS MARCADORES DCX, GR E H3 EM MACHOS E FÊMEAS.

O imunocontéudo de DCX foi observada entre machos e fêmeas de cada linhagem, a fim de encontrarmos diferenças na proliferação celular e corroborar os resultados encontrados nos testes comportamentais, onde as fêmeas apresentaram maior locomoção e exploração nos braços abertos do LCE. Yagi & Galea (2019), trazem que as diferenças entre os sexos na neurogênese adulta após o estresse dependem da natureza do estressor. Quanto maior o nível de estresse, mais afetada seria a proliferação celular. Podemos supor que os testes comportamentais realizados no presente estudo não tenham elevado o nível de estresse de maneira significativa e portanto, não foram encontradas diferenças sexuais no imunocontéudo de DCX. Apesar disso, sabemos que existem importantes diferenças sexuais nos efeitos do estresse no sistema límbico. Segundo Galea e colaboradores (1997), os estressores não causam encolhimento dos dendritos nos neurônios no hipocampo de fêmeas. De outro modo, em machos é encontrado o encurtamento dos neurônios após estresse, mas no córtex pré-frontal, não sendo

observado em fêmeas (MCEWEN; GRAY; NASCA, 2015; SHANSKY et al., 2009, 2010).

Um estudo descobriu que apenas fêmeas regulam positivamente as co-chaperonas, responsáveis por inibir a translocação de GR e prejudicam o feedback negativo de glicocorticoides (BOURKE et al., 2013). Algumas evidências sugerem que o efeito do estresse sobre a proliferação celular pode ser dependente do sexo do animal. Machos e fêmeas respondem de forma diferente nos aspectos fisiológicos e neuroendócrinos do estresse, o que pode influenciar a vulnerabilidade ou resiliência de certos indivíduos ao estresse (PALUMBO; DOMINGUEZ; DONG, 2020).

Com isso, no presente estudo, realizou-se análises comparativas entre machos e fêmeas de cada linhagem, com intuito de se caracterizar o imunocontéudo de GR e definir possíveis dimorfismos sexuais. Entretanto, não foram observadas diferenças significativas na comparação entre machos e fêmeas SHR ou SLA16, indicando que o imunocontéudo do GR parece não apresentar dimorfismo sexual quando os animais não são submetidos a estresse crônico.

Por outro lado, no presente estudo encontrou-se esse dimorfismo sexual no imunocontéudo de H3 na linhagem SHR nos grupos pós-comportamento. Machos apresentaram maior imunocontéudo, quando comparados às fêmeas. Estudos avaliando dimorfismo sexual nos mecanismos epigenéticos em roedores foram iniciados há poucos anos, resultando em poucos dados comparativos entre gêneros (MCCARTHY et al., 2009). O medo condicionado induz aumento na acetilação de H3 em ratos machos (FORTRESS; FRICK, 2014), corroborando parcialmente os presentes resultados, considerando que a diferença estatisticamente significativa foi encontrada entre machos e fêmeas, apesar dos animais deste estudo não terem sido submetidos a testes condicionados.

Tsai e colaboradores (2009) apresentaram diferenças significativas, com maior imunocontéudo de H3, em camundongos machos, porém somente no 18º dia embrionário e no dia do nascimento. Entretanto, seis dias após o nascimento essa diferença não foi mais observada em animais não condicionados ao medo. Com relação à comparação entre sexos, diferenças sexuais na memória de reconhecimento de ratos foram relatadas principalmente em animais em idades mais avançadas, sugerindo que ratos machos e fêmeas podem ter desempenho igual em testes de reconhecimento

espontâneo de objetos enquanto são jovens-adultos (CYRENNE; BROWN, 2011), como é o caso do presente estudo. Em resumo, pode-se sugerir que as modificações epigenéticas de longo prazo desempenham um papel importante nas respostas comportamentais desencadeadas pelo estresse, susceptíveis a distúrbios emocionais. No entanto, para que os achados epigenéticos sejam usados como biomarcadores de emocionalidade, mais pesquisas nesse campo são necessárias.

Alguns fatores devem ser levados em consideração a respeito das limitações do presente estudo. A heterogeneidade do resultado comportamental encontrada no RO é provavelmente devida à variabilidade nos protocolos e condições experimentais, o que afeta o uso de estratégias eficazes. Desta forma, variações de testes comportamentais para análise da cognição são indicados. Ainda, os protocolos utilizados por outros grupos de pesquisa na avaliação da ansiedade são diferentes dos utilizados aqui. Nossos resultados são uma caracterização inicial comparativa de marcadores hipocâmpais nas linhagens isogênicas SHR e SLA16. Essa caracterização indicou que, para que haja variação na neurogênese a ponto de haver alteração do comportamento ansiolítico do animal, provavelmente se faz necessária a administração de antidepressivos, ou o uso de indução de estresse crônico. Outra limitação importante deste estudo é que como as linhagens isogênicas apresentam comportamento emocional alterado sem o uso de protocolos de indução, as possibilidades de comparação dos resultados com a literatura ficou reduzida.

7. CONCLUSÃO

Os dados sugerem primeiramente que neurônios imaturos parecem não estar envolvidos na modulação do comportamento emocional destas linhagens. Além disso, a diferença comportamental entre sexos observada nos dados comportamentais de exploração parece acontecer por meio de um mecanismo independente do imunocontéudo de GR. Ainda assim, machos SHR apresentaram maior imunocontéudo de H3 do que fêmeas, não sendo observado essa diferença na linhagem SLA16. Para melhor avaliação da epigenética envolvida com comportamento emocional e quais genes têm a expressão aumentada após acetilação, são necessários novos estudos com sequenciamento de DNA na região *Anxrr16* e com maior especificidade na marcação celular.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AITMAN, T. J. et al. Quantitative trait loci for cellular defects in glucose and fatty acid metabolism in hypertensive rats. **Nature Genetics**, v. 16, n. 2, p. 197–201, 1997.

ALTEMUS, M.; SARVAIYA, N.; NEILL EPPERSON, C. **Sex differences in anxiety and depression clinical perspectives** *Frontiers in Neuroendocrinology* Academic Press Inc., , 2014. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24887405/>>.

Acesso em: 21 mar. 2021

ANACKER, C. et al. Antidepressants increase human hippocampal neurogenesis by activating the glucocorticoid receptor. **Molecular Psychiatry**, v. 16, n. 7, p. 738–750, jul. 2011.

ANSELMINI, M. et al. Genetic evidence for chromosome 4 loci influencing learning and memory. **Neurobiology of Learning and Memory**, v. 131, p. 182–191, 2016.

ARAKAWA, H.; IGUCHI, Y. **Ethological and multi-behavioral analysis of learning and memory performance in laboratory rodent models** *Neuroscience Research* Elsevier Ireland Ltd, , 1 out. 2018. Disponível em:

<<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0168010217307149>>. Acesso em: 24 mar. 2021

ARI, C. et al. Elevated plus maze test combined with video tracking software to investigate the anxiolytic effect of exogenous ketogenic supplements. **Journal of Visualized Experiments**, v. 2019, n. 143, 1 jan. 2019.

BARNES, P. J. **Corticosteroid effects on cell signalling** *European Respiratory Journal* European Respiratory Society, , 1 fev. 2006. Disponível em:

<<https://erj.ersjournals.com/content/27/2/413>>. Acesso em: 6 abr. 2021

BARRETT, R. M.; WOOD, M. A. **Beyond transcription factors: The role of chromatin modifying enzymes in regulating transcription required for memory** *Learning and Memory* Cold Spring Harbor Laboratory Press, , jul. 2008.

Disponível em: <pmc/articles/PMC3960025/>. Acesso em: 21 mar. 2021

BÁTIZ, L. F. et al. Exosomes as novel regulators of adult neurogenic niches. **Frontiers in Cellular Neuroscience**, v. 9, n. JAN2016, 19 jan. 2016.

BEYLIN, A. V.; SHORS, T. J. Glucocorticoids are necessary for enhancing the acquisition of associative memories after acute stressful experience. **Hormones and**

Behavior, v. 43, n. 1, p. 124–131, 2003.

BICE, P. et al. Genomic screen for QTLs underlying alcohol consumption in the P and NP rat lines. **Mammalian Genome**, v. 9, n. 12, p. 949–955, 1998.

BILANG-BLEUEL, A. et al. Psychological stress increases histone H3 phosphorylation in adult dentate gyrus granule neurons: Involvement in a glucocorticoid receptor-dependent behavioural response. **European Journal of Neuroscience**, v. 22, n. 7, p. 1691–1700, out. 2005.

BOURKE, C. H. et al. Glucocorticoid sensitizers Bag1 and Ppid are regulated by adolescent stress in a sex-dependent manner. **Psychoneuroendocrinology**, v. 38, n. 1, p. 84–93, 1 jan. 2013.

BOUSIGES, O. et al. Spatial memory consolidation is associated with induction of several lysine-acetyltransferase (histone acetyltransferase) expression levels and H2B/H4 acetylation-dependent transcriptional events in the rat hippocampus. **Neuropsychopharmacology**, v. 35, n. 13, p. 2521–2537, dez. 2010.

BOUSIGES, O. et al. Detection of Histone Acetylation Levels in the Dorsal Hippocampus Reveals Early Tagging on Specific Residues of H2B and H4 Histones in Response to Learning. **PLoS ONE**, v. 8, n. 3, 4 mar. 2013.

BOYLE, M. P. et al. Acquired deficit of forebrain glucocorticoid receptor produces depression-like changes in adrenal axis regulation and behavior. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 102, n. 2, p. 473–478, 11 jan. 2005.

BRAND, T.; SLOB, A. K. Peripubertal castration of male rats, adult open field ambulation and partner preference behavior. **Behavioural Brain Research**, v. 30, n. 2, p. 111–117, 15 set. 1988.

BURKE, N. N. et al. Sex differences and similarities in depressive- and anxiety-like behaviour in the Wistar-Kyoto rat. **Physiology and Behavior**, v. 167, p. 28–34, 1 dez. 2016.

CALDARONE, B. et al. Quantitative trait loci analysis affecting contextual conditioning in mice. **Nature Genetics**, v. 17, n. 3, p. 335–337, 1997.

CAMPOS, A. C. et al. Animal models of anxiety disorders and stress. **Revista Brasileira de Psiquiatria**, v. 35, n. SUPPL.2, p. S101–S111, 2013.

CAROBREZ, A. P.; BERTOGLIO, L. J. **Ethological and temporal analyses of anxiety-like behavior: The elevated plus-maze model 20 years on.** *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*. **Anais...**jan. 2005Disponível em:

<<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0149763405000680>>. Acesso em: 6 abr. 2021

CHRISTIAN, K. M.; SONG, H.; MING, G. L. **Functions and dysfunctions of adult hippocampal neurogenesis***Annual Review of Neuroscience*Annual Reviews Inc., , 2014. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24905596/>>. Acesso em: 21 mar. 2021

CONTI, L. H. et al. Identification of Quantitative Trait Loci for Anxiety and Locomotion Phenotypes in Rat Recombinant Inbred Strains. **Behavior Genetics**, v. 34, n. 1, p. 93–103, jan. 2004.

CORRÊA, F. J. **O CROMOSSOMO 4 INFLUENCIA COMPORTAMENTOS RELACIONADOS À MEMÓRIA EM UM MODELO GENÉTICO DE RATOS.** [s.l: s.n.].

COVIC, M.; KARACA, E.; LIE, D. C. **Epigenetic regulation of neurogenesis in the adult hippocampus***Heredity*Nature Publishing Group, , 24 jul. 2010. Disponível em: <www.nature.com/hdy>. Acesso em: 31 mar. 2021

CRISPIM JUNIOR, C. F. et al. ETHOWATCHER: Validation of a tool for behavioral and video-tracking analysis in laboratory animals. **Computers in Biology and Medicine**, v. 42, n. 2, p. 257–264, fev. 2012.

CYRENNE, D. L. M.; BROWN, G. R. Ontogeny of sex differences in response to novel objects from adolescence to adulthood in lister-hooded rats. **Developmental Psychobiology**, v. 53, n. 7, p. 670–676, nov. 2011.

D’ALESSIO, L. et al. Doublecortin (DCX) immunoreactivity in hippocampus of chronic refractory temporal lobe epilepsy patients with hippocampal sclerosis. **Seizure**, v. 19, n. 9, p. 567–572, nov. 2010.

DALLA, C. et al. Chronic mild stress impact: Are females more vulnerable? **Neuroscience**, v. 135, n. 3, p. 703–714, 2005.

DALVI, A.; RODGERS, R. J. Behavioral effects of diazepam in the murine plus-maze: Flumazenil antagonism of enhanced head dipping but not the disinhibition of open-arm

avoidance. **Pharmacology Biochemistry and Behavior**, v. 62, n. 4, p. 727–734, abr. 1999.

DATSON, N. A. et al. **Central corticosteroid actions: Search for gene targets****European Journal of Pharmacology***Eur J Pharmacol*, , 7 abr. 2008. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18295201/>>. Acesso em: 21 mar. 2021

DE KLOET, E. R. et al. Brain Corticosteroid Receptor Balance in Health and Disease*. **Endocrine Reviews**, v. 19, n. 3, p. 269–301, 1 jun. 1998.

DE KLOET, E. R.; JOËLS, M.; HOLSBOER, F. **Stress and the brain: From adaptation to disease****Nature Reviews Neuroscience***Nat Rev Neurosci*, , jun. 2005. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15891777/>>. Acesso em: 21 mar. 2021

DE KLOET, E. R.; REUL, J. M. H. M. Feedback action and tonic influence of corticosteroids on brain function: A concept arising from the heterogeneity of brain receptor systems. **Psychoneuroendocrinology**, v. 12, n. 2, p. 83–105, 1987.

DE MEDEIROS, G. F. et al. Low-Anxiety rat phenotypes can be further reduced through genetic intervention. **PLoS ONE**, v. 8, n. 12, 2013.

DENOTH-LIPPUNER, A.; JESSBERGER, S. **Formation and integration of new neurons in the adult hippocampus****Nature Reviews Neuroscience***Nature Research*, , 25 fev. 2021. Disponível em: <www.nature.com/nrn>. Acesso em: 21 mar. 2021

DOMONKOS, E. et al. Sex differences and sex hormones in anxiety-like behavior of aging rats. **Hormones and Behavior**, v. 93, p. 159–165, 1 jul. 2017.

DONNER, N. C.; LOWRY, C. A. **Sex differences in anxiety and emotional behavior****Pflugers Archiv European Journal of Physiology***Pflugers Arch*, , maio 2013. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23588380/>>. Acesso em: 21 mar. 2021

DUBOVICKÝ, M.; ŠKULTÉTYOVÁ, I.; JEŽOVÁ, D. Neonatal stress alters habituation of exploratory behavior in adult male but not female rats. **Pharmacology Biochemistry and Behavior**, v. 64, n. 4, p. 681–686, dez. 1999.

EICHENBAUM, H.; OTTO, T.; COHEN, N. J. **The hippocampus-what does it do?****Behavioral and Neural Biology***Academic Press*, , 1 jan. 1992.

ENNACEUR, A. et al. Distinguishing anxiety and hyperactivity in an open space behavioral test. **Behavioural Brain Research**, v. 207, n. 1, p. 84–98, 11 fev. 2010.

FORTRESS, A. M.; FRICK, K. M. **Epigenetic regulation of estrogen-dependent memory** *Frontiers in Neuroendocrinology* Academic Press Inc., , 1 out. 2014.

Disponível em: </pmc/articles/PMC4174980/>. Acesso em: 6 abr. 2021

FRANCIS, F. et al. Doublecortin is a developmentally regulated, microtubule-associated protein expressed in migrating and differentiating neurons. **Neuron**, v. 23, n. 2, p. 247–256, 1999.

FUCHS, E.; FLUGGE, G.; CZECH, B. **Remodeling of neuronal networks by stress** *Frontiers in Bioscience* Front Biosci, , 2006. Disponível em:

<<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16720347/>>. Acesso em: 24 mar. 2021

GENTSCH, C.; LICHTSTEINER, M.; FEER, H. Open field and elevated plus-maze: A behavioural comparison between spontaneously hypertensive (SHR) and Wistar-Kyoto (WKY) rats and the effects of chlordiazepoxide. **Behavioural Brain Research**, v. 25, n. 2, p. 101–107, ago. 1987.

GENTSCH, C.; LICHTSTEINER, M.; FEER, H. **Genetic and environmental influences on reactive and spontaneous locomotor activities in rats** *Experientia* Birkhäuser-Verlag, , out. 1991. Disponível em:

<<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/1936209/>>. Acesso em: 27 mar. 2021

GILL, K. J.; BOYLE, A. E. Quantitative trait loci for novelty/stress-induced locomotor activation in recombinant inbred (RI) and recombinant congenic (RC) strains of mice. **Behavioural Brain Research**, v. 161, n. 1, p. 113–124, 3 jun. 2005.

GLEESON, J. G. et al. Doublecortin is a microtubule-associated protein and is expressed widely by migrating neurons. **Neuron**, v. 23, n. 2, p. 257–271, 1 jun. 1999.

GOULD, E. et al. Neurogenesis in the dentate gyrus of the adult tree shrew is regulated by psychosocial stress and NMDA receptor activation. **Journal of Neuroscience**, v. 17, n. 7, p. 2492–2498, 1997.

GRÄFF, J.; MANSUY, I. M. **Epigenetic codes in cognition and behaviour** *Behavioural Brain Research*, 1 set. 2008. Disponível em:

<<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0166432808000739>>. Acesso em: 30 mar. 2021

GRAY, J. D. et al. **Genomic and epigenomic mechanisms of glucocorticoids in the brain***Nature Reviews Endocrinology* Nature Publishing Group, , 1 nov. 2017.

Disponível em: <www.nature.com/nrendo>. Acesso em: 31 mar. 2021

GREWAL, S. S. et al. Behavioural and pharmacological characterisation of the canopy stretched attend posture test as a model of anxiety in mice and rats.

Psychopharmacology, v. 133, n. 1, p. 29–38, 4 set. 1997.

GRIEBEL, G. **5-Hydroxytryptamine-interacting drugs in animal models of anxiety disorders: More than 30 years of research***Pharmacology and*

Therapeutics Pharmacol Ther, , 1995. Disponível em:

<<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/7644567/>>. Acesso em: 23 mar. 2021

GRUNSTEIN, M. **Histone acetylation in chromatin structure and transcription***Nature* Nature Publishing Group, , 1997. Disponível em:

<<https://www.nature.com/articles/38664>>. Acesso em: 21 mar. 2021

GUR, R. C.; GUR, R. E. **Complementarity of sex differences in brain and behavior: From laterality to multimodal neuroimaging***Journal of Neuroscience Research* John

Wiley and Sons Inc., , 1 jan. 2017. Disponível em: <[pmc/articles/PMC5129843/](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31111111/)>.

Acesso em: 21 mar. 2021

HANSSON, A. C. et al. Gluco- and mineralocorticoid receptor-mediated regulation of neurotrophic factor gene expression in the dorsal hippocampus and the neocortex of the rat. *European Journal of Neuroscience*, v. 12, n. 8, p. 2918–2934, 2000.

HÅRD, E. et al. Behavioral reactivity in spontaneously hypertensive rats. *Physiology and Behavior*, v. 35, n. 4, p. 487–492, 1985.

HEBBAR, P. B.; ARCHER, T. K. **Chromatin remodeling by nuclear receptors***Chromosoma* Springer Verlag, , 2003. Disponível em:

<<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/12743713/>>. Acesso em: 21 mar. 2021

HILL, A. S.; SAHAY, A.; HEN, R. Increasing Adult Hippocampal Neurogenesis is Sufficient to Reduce Anxiety and Depression-Like Behaviors.

Neuropsychopharmacology, v. 40, n. 10, p. 2368–2378, 14 set. 2015.

JENNINGS, K. J.; LECEA, L. DE. Neural and Hormonal Control of Sexual Behavior. *Endocrinology*, v. 161, n. 10, 1 out. 2020.

JOBE, E. M.; MCQUATE, A. L.; ZHAO, X. **Crosstalk among epigenetic pathways**

regulates neurogenesis *Frontiers in Neuroscience* *Frontiers*, , 8 maio 2012.

JOHNSTON, A. L.; FILE, S. E. Sex differences in animal tests of anxiety. **Physiology and Behavior**, v. 49, n. 2, p. 245–250, 1991.

KALUEFF, A. V.; TUOHIMAA, P. Grooming analysis algorithm for neurobehavioural stress research. **Brain Research Protocols**, v. 13, n. 3, p. 151–158, ago. 2004.

KANG, E. et al. Adult neurogenesis and psychiatric disorders. **Cold Spring Harbor Perspectives in Biology**, v. 8, n. 9, 1 set. 2016.

KELOGLAN, S.; SAHIN, L.; CEVIK, O. S. Long-term treadmill exercise upregulated hippocampal learning-related genes without improving cognitive behaviour in socially isolated rats. **Folia Morphol**, v. 78, n. 4, p. 668–675, 2019.

KEMPERMANN, G. et al. **Why and how physical activity promotes experience-induced brain plasticity** *Frontiers in Neuroscience* *Frontiers Media SA*, , 2010.

Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21111111/>. Acesso em: 21 mar. 2021

KEMPERMANN, G.; KUHN, H. G.; GAGE, F. H. More hippocampal neurons in adult mice living in an enriched environment. **Nature**, v. 386, n. 6624, p. 493–495, 3 abr. 1997.

KIM, J. J.; DIAMOND, D. M. The stressed hippocampus, synaptic plasticity and lost memories. **Nature Reviews Neuroscience**, v. 3, n. 6, p. 453–462, 2002.

KOCH, C. M. et al. The landscape of histone modifications across 1% of the human genome in five human cell lines. **Genome Research**, v. 17, n. 6, p. 691–707, jun. 2007.

KORTE, S. M. **Corticosteroids in relation to fear, anxiety and psychopathology** *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*, mar. 2001. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0149763401000021>. Acesso em: 5 abr. 2021

KUDIENKA, B. M.; KIRSCHBAUM, C. **Sex differences in HPA axis responses to stress: A review** *Biological Psychology* *Elsevier*, , 2005. Disponível em:

<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15740829/>. Acesso em: 21 mar. 2021

KUNIISHI, H. et al. Early deprivation increases high-leaning behavior, a novel anxiety-like behavior, in the open field test in rats. **Neuroscience Research**, v. 123, p. 27–35, 1 out. 2017.

- KURDISTANI, S. K.; TAVAZOIE, S.; GRUNSTEIN, M. Mapping global histone acetylation patterns to gene expression. **Cell**, v. 117, n. 6, p. 721–733, 11 jun. 2004.
- LAULEDERKIND, S. J. F. et al. The Rat Genome Database 2013-data, tools and users. **Briefings in Bioinformatics**, v. 14, n. 4, p. 520–526, jul. 2013.
- LEVENSON, J. M. et al. Regulation of histone acetylation during memory formation in the hippocampus. **Journal of Biological Chemistry**, v. 279, n. 39, p. 40545–40559, 24 set. 2004.
- LEVER, C.; BURTON, S.; O’KEEFE, J. **Rearing on hind legs, environmental novelty, and the hippocampal formation** *Reviews in the Neurosciences* Freund Publishing House Ltd, , jan. 2006. Disponível em: <<https://www.degruyter.com/document/doi/10.1515/REVNEURO.2006.17.1-2.111/html>>. Acesso em: 29 mar. 2021
- LIEBERWIRTH, C. et al. **Hippocampal adult neurogenesis: Its regulation and potential role in spatial learning and memory** *Brain Research* Elsevier B.V., , 1 ago. 2016. Disponível em: <[pmc/articles/PMC5064285/](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/264285/)>. Acesso em: 1 abr. 2021
- LLAMAS, B. et al. QTL mapping for traits associated with stress neuroendocrine reactivity in rats. **Mammalian Genome**, v. 16, n. 7, p. 505–515, jul. 2005.
- MARTA, M. et al. Multiple loci comprising immune-related genes regulate experimental neuroinflammation. **Genes and Immunity**, v. 11, n. 1, p. 21–36, 13 jan. 2010.
- MCCARTHY, M. M. et al. **The epigenetics of sex differences in the brain**. *Journal of Neuroscience*. **Anais...J Neurosci**, 14 out. 2009 Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19828794/>>. Acesso em: 6 abr. 2021
- MCCORMICK, C. M. et al. Long-lasting, sex- and age-specific effects of social stressors on corticosterone responses to restraint and on locomotor responses to psychostimulants in rats. **Hormones and Behavior**, v. 48, n. 1 SPEC. ISS., p. 64–74, 2005.
- MCEWEN, B. S. **Stress and hippocampal plasticity** *Annual Review of Neuroscience* Annu Rev Neurosci, , 1999. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/10202533/>>. Acesso em: 21 mar. 2021
- MCEWEN, B. S.; GRAY, J. D.; NASCA, C. **Redefining neuroendocrinology: Stress,**

- sex and cognitive and emotional regulation** *Journal of Endocrinology* BioScientifica Ltd., , 2015. Disponível em: </pmc/articles/PMC4515381/>. Acesso em: 3 abr. 2021
- MCEWEN, B. S.; NASCA, C.; GRAY, J. D. **Stress Effects on Neuronal Structure: Hippocampus, Amygdala, and Prefrontal Cortex** *Neuropsychopharmacology* Nature Publishing Group, , 1 jan. 2016. Disponível em: </pmc/articles/PMC4677120/>. Acesso em: 31 mar. 2021
- MCGAUGH, J. L.; ROOZENDAAL, B. **Role of adrenal stress hormones in forming lasting memories in the brain** *Current Opinion in Neurobiology* Elsevier Ltd, , 1 abr. 2002. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/12015238/>. Acesso em: 21 mar. 2021
- MEIJER, O. C.; BUURSTEDDE, J. C.; SCHAAF, M. J. M. **Corticosteroid Receptors in the Brain: Transcriptional Mechanisms for Specificity and Context-Dependent Effects** *Cellular and Molecular Neurobiology* Springer New York LLC, , 1 maio 2019. Disponível em: </pmc/articles/PMC6469829/>. Acesso em: 3 abr. 2021
- MING, G. LI; SONG, H. **Adult Neurogenesis in the Mammalian Brain: Significant Answers and Significant Questions** *Neuron* Elsevier, , 26 maio 2011. Disponível em: <http://www.cell.com/article/S0896627311003485/fulltext>. Acesso em: 31 mar. 2021
- MIRESCU, C.; GOULD, E. **Stress and adult neurogenesis** *Hippocampus* Hippocampus, , 2006. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16411244/>. Acesso em: 21 mar. 2021
- MORRIS, S. A. et al. Alcohol inhibition of neurogenesis: A mechanism of hippocampal neurodegeneration in an adolescent alcohol abuse model. **Hippocampus**, v. 20, n. 5, p. 596–607, maio 2010.
- MYERS, B.; MCKLVEEN, J. M.; HERMAN, J. P. **Glucocorticoid actions on synapses, circuits, and behavior: Implications for the energetics of stress** *Frontiers in Neuroendocrinology* Academic Press Inc., , 2014. Disponível em: </pmc/articles/PMC4422101/>. Acesso em: 5 abr. 2021
- NOKIA, M. S. et al. Physical exercise increases adult hippocampal neurogenesis in male rats provided it is aerobic and sustained. **The Journal of Physiology**, v. 594, n. 7, p. 1855, 1 abr. 2016.
- PALUMBO, M. C.; DOMINGUEZ, S.; DONG, H. Sex differences in hypothalamic–

pituitary–adrenal axis regulation after chronic unpredictable stress. **Brain and Behavior**, v. 10, n. 4, p. e01586, 10 abr. 2020.

PATTWELL, S. S.; BATH, K. G. **Emotional learning, stress, and development: An ever-changing landscape shaped by early-life experience** *Neurobiology of Learning and Memory* Academic Press Inc., , 1 set. 2017. Disponível em:

<<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28458034/>>. Acesso em: 21 mar. 2021

PETRIK, D.; LAGACE, D. C.; EISCH, A. J. **The neurogenesis hypothesis of affective and anxiety disorders: Are we mistaking the scaffolding for the building?**

Neuropharmacology. Anais...Neuropharmacology, jan. 2012 Disponível em:

<<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21945290/>>. Acesso em: 21 mar. 2021

POTENZA, M. N. et al. Genomic regions controlling corticosterone levels in rats.

Biological Psychiatry, v. 55, n. 6, p. 634–641, 15 mar. 2004.

RAMOS, A. et al. A multiple-test study of anxiety-related behaviours in six inbred rat strains. **Behavioural Brain Research**, v. 85, n. 1, p. 57–69, abr. 1997.

RAMOS, A. et al. A genetic and multifactorial analysis of anxiety-related behaviours in Lewis and SHR intercrosses. **Behavioural Brain Research**, v. 96, n. 1–2, p. 195–205, 1998.

RAMOS, A. Animal models of anxiety: do I need multiple tests? **Trends in Pharmacological Sciences**, v. 29, n. 10, p. 493–498, out. 2008.

REUL, J. M. H. M. et al. **The brain mineralocorticoid receptor: Greedy for ligand, mysterious in function.** *European Journal of Pharmacology. Anais...Elsevier B.V.*, 29 set. 2000 Disponível em: <<https://research-information.bris.ac.uk/en/publications/the-brain-mineralocorticoid-receptor-greedy-for-ligand-mysterious>>. Acesso em: 21 mar. 2021

REVEST, J. M. et al. Adult hippocampal neurogenesis is involved in anxiety-related behaviors. **Molecular Psychiatry**, v. 14, n. 10, p. 959–967, 3 mar. 2009.

RODGERS, R. J. et al. **Animal models of anxiety: An ethological perspective** *Brazilian Journal of Medical and Biological Research* Associação Brasileira de Divulgação Científica, , 1997. Disponível em:

<[http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0100-](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0100-879X1997000300002&lng=en&nrm=iso&tlng=en)

[879X1997000300002&lng=en&nrm=iso&tlng=en](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0100-879X1997000300002&lng=en&nrm=iso&tlng=en)>. Acesso em: 24 mar. 2021

ROGERS, L. J.; SINK, H. S.; HAMBLEY, J. W. Exploration, fear and maze learning in spontaneously hypertensive and normotensive rats. **Behavioral and Neural Biology**, v. 49, n. 2, p. 222–233, 1988.

RUBINOW, D. R.; SCHMIDT, P. J. **Sex differences and the neurobiology of affective disorders***Neuropsychopharmacology*Nature Publishing Group, , 1 jan. 2019. Disponível em: </pmc/articles/PMC6235863/>. Acesso em: 6 abr. 2021

SABBAN, E. L.; KVETŇANSK, R. **Stress-triggered activation of gene expression in catecholaminergic systems: Dynamics of transcriptional events***Trends in Neurosciences*Trends Neurosci, , 2001. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11164939/>>. Acesso em: 21 mar. 2021

SANDI, C. **Stress, cognitive impairment and cell adhesion molecules***Nature Reviews Neuroscience*Nat Rev Neurosci, , dez. 2004. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15550947/>>. Acesso em: 21 mar. 2021

SANTARELLI, L. et al. Requirement of hippocampal neurogenesis for the behavioral effects of antidepressants. **Science**, v. 301, n. 5634, p. 805–809, 8 ago. 2003.

SCHAAF, M. J. M. et al. Corticosterone regulates expression of BDNF and trkB but not NT-3 and trkC mRNA in the rat hippocampus. **Journal of Neuroscience Research**, v. 48, n. 4, p. 334–341, 15 maio 1997.

SCHNEIDER, A. et al. **Acetyltransferases (HATs) as Targets for Neurological Therapeutics***Neurotherapeutics*Neurotherapeutics, , out. 2013. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24006237/>>. Acesso em: 13 abr. 2021

SCHOLL, J. L. et al. Sex differences in anxiety-like behaviors in rats. **Physiology and Behavior**, v. 211, 1 nov. 2019.

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, p. 52434, 6 fev. 2015.

SHANSKY, R. M. et al. Stress-induced dendritic remodeling in the prefrontal cortex is circuit specific. **Cerebral Cortex**, v. 19, n. 10, p. 2479–2484, out. 2009.

SHANSKY, R. M. et al. Estrogen promotes stress sensitivity in a prefrontal cortex-amygdala pathway. **Cerebral Cortex**, v. 20, n. 11, p. 2560–2567, nov. 2010.

- SILVA, G. J. J. et al. Genetic mapping of a new heart rate QTL on chromosome 8 of spontaneously hypertensive rats. **BMC Medical Genetics**, v. 8, 9 abr. 2007.
- SLATTERY, D. A.; CRYAN, J. F. The ups and downs of modelling mood disorders in rodents. **ILAR Journal**, v. 55, n. 2, p. 297–309, 1 jan. 2014.
- SNYDER, J. S. et al. Adult hippocampal neurogenesis buffers stress responses and depressive behaviour. **Nature**, v. 476, n. 7361, p. 458–462, 25 ago. 2011.
- SRAMEK, J. J.; MURPHY, M. F.; CUTLER, N. R. Sex differences in the psychopharmacological treatment of depression. **Dialogues in Clinical Neuroscience**, v. 18, n. 4, p. 447, 2016.
- STEIMER, T. Animal models of anxiety disorders in rats and mice: Some conceptual issues. **Dialogues in Clinical Neuroscience**, v. 13, n. 4, p. 495–506, 2011.
- STRAWN, J. R.; LEVINE, A. Treatment response biomarkers in anxiety disorders: From neuroimaging to neuronally-derived extracellular vesicles and beyond. **Biomarkers in Neuropsychiatry**, v. 3, p. 100024, dez. 2020.
- STURMAN, O.; GERMAIN, P. L.; BOHACEK, J. Exploratory rearing: a context- and stress-sensitive behavior recorded in the open-field test. **Stress**, v. 21, n. 5, p. 443–452, 3 set. 2018.
- TROLLOPE, A. et al. Molecular and Epigenetic Mechanisms Underlying Cognitive and Adaptive Responses to Stress. **Epigenomes**, v. 1, n. 3, p. 17, 2 nov. 2017.
- TRONCHE, F. et al. Disruption of the glucocorticoid receptor gene in the nervous system results in reduced anxiety. **Nature Genetics**, v. 23, n. 1, p. 99–103, set. 1999.
- VAN PRAAG, H. et al. Functional neurogenesis in the adult hippocampus. **Nature**, v. 415, n. 6875, p. 1030–1034, 28 fev. 2002.
- VENDRUSCOLO, L. F. et al. Genetic influences on behavioral and neuroendocrine responses to predator-odor stress in rats. **Neuroscience Letters**, v. 409, n. 2, p. 89–94, 2006.
- WOLFFE, A. P.; PRUSS, D. **Targeting chromatin disruption: Transcription regulators that acetylate histones** CellCell Press, , 1996. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/8601304/>>. Acesso em: 21 mar. 2021
- WOOD, M. A. et al. Transgenic mice expressing a truncated form of CREB-binding

protein (CBP) exhibit deficits in hippocampal synaptic plasticity and memory storage. **Learning and Memory**, v. 12, n. 2, p. 111–119, mar. 2005.

WOOD, M. A. et al. A transcription factor-binding domain of the coactivator CBP is essential for long-term memory and the expression of specific target genes. **Learning and Memory**, v. 13, n. 5, p. 609–617, 2006.

YALCIN, B.; FLINT, J.; MOTT, R. Using progenitor strain information to identify quantitative trait nucleotides in outbred mice. **Genetics**, v. 171, n. 2, p. 673–681, out. 2005.

YERKES, R. M.; DODSON, J. D. The relation of strength of stimulus to rapidity of habit-formation. **Journal of Comparative Neurology and Psychology**, v. 18, n. 5, p. 459–482, 1 nov. 1908.

YOUNG, J. J. et al. **Is there progress? An overview of selecting biomarker candidates for major depressive disorder** *Frontiers in Psychiatry* Frontiers Media S.A., , 25 abr. 2016. Disponível em: </pmc/articles/PMC4843170/>. Acesso em: 31 mar. 2021

YUN, S. et al. Stimulation of entorhinal cortex-dentate gyrus circuitry is antidepressive. **Nature Medicine**, v. 24, n. 5, p. 658–666, 1 maio 2018.

ZHAO, Z. et al. Hippocampal histone acetylation regulates object recognition and the estradiol-induced enhancement of object recognition. **Journal of Neuroscience**, v. 32, n. 7, p. 2344–2351, 15 fev. 2012.

ANEXO 1 - Aprovação da CEUA**Resultado de Solicitação de Protocolo****Protocolo**

PP00903

Título

Metodologias utilizadas no Laboratório de Genética do Comportamento

Data de Entrada

18/11/2013

Resultado:

Aprovado

Data/Prazo

21/03/2014

Considerações

Ofício nº 136/CEUA/PROPESQ/2014

Do: Presidente da Comissão de Ética no Uso de Animais-CEUA

Ao(à): Prof(a) Dr(a) Geison de Souza Izidio, Departamento de Biologia, Embriologia e Genética – CCB

Prezado(a) Professor(a),

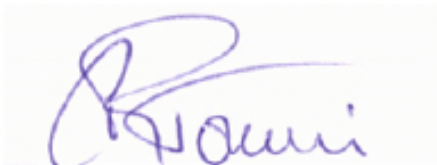
Em relação ao projeto de pesquisa sob sua responsabilidade a CEUA deliberou por:

- APROVAÇÃO para a utilização de 720 ratos (*Rattus norvegicus*) pelo período de 4 anos a partir da data de credenciamento.

Relatório Final previsto para (90 dias após término da vigência do protocolo ou no momento da apresentação de um novo protocolo)

Data 30/06/2018

Data 31/03/2014

Parecer(es):

Prof. Assoc. Carlos Rogério Tonussi, D.Sc.
COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS – PRPE – UFSC
PRESIDENTE