

Eslen Delanogare

**EFEITOS DO ENRIQUECIMENTO AMBIENTAL SOBRE AS
ALTERAÇÕES METABÓLICAS E COMPORTAMENTAIS
INDUZIDAS PELA ADMINISTRAÇÃO CRÔNICA DE
DEXAMETASONA EM CAMUNDONGOS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Neurociências do Centro de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Santa Catarina como requisito à obtenção do título de Mestre em Neurociências.

Área de concentração: Neuropsicobiologia.

Orientador: Prof. Dr. Eduardo Luiz Gasnhar Moreira.

Florianópolis
2019

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

Delanogare, Eslen

EFEITOS DO ENRIQUECIMENTO AMBIENTAL SOBRE AS
ALTERAÇÕES METABÓLICAS E COMPORTAMENTAIS INDUZIDAS
PELA ADMINISTRAÇÃO CRÔNICA DE DEXAMETASONA EM
CAMUNDONGOS / Eslen Delanogare ; orientador,
Eduardo Luiz Gasnhar Moreira, 2019.

142 p.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de
Santa Catarina, Centro de Ciências Biológicas,
Programa de Pós-Graduação em Neurociências,
Florianópolis, 2019.

Inclui referências.

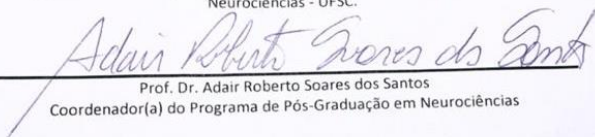
1. Neurociências. 2. Estresse. 3. Depressão. 4.
Enriquecimento Ambiental. 5. Glicocorticoides. I.
Moreira, Eduardo Luiz Gasnhar. II. Universidade
Federal de Santa Catarina. Programa de Pós-Graduação
em Neurociências. III. Título.

"Efeitos do enriquecimento ambiental sobre as alterações metabólicas e comportamentais induzidas pela administração crônica de dexametasona em camundongos"

Por

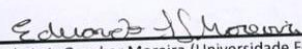
Eslen Delanogare

Dissertação julgada e aprovada em sua forma final pelos membros titulares da Banca Examinadora (008/2019/PGN) do Programa de Pós-Graduação em Neurociências - UFSC.

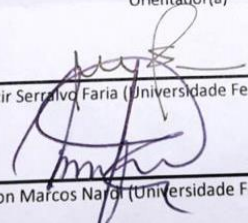


Prof. Dr. Adair Roberto Soares dos Santos
Coordenador(a) do Programa de Pós-Graduação em Neurociências

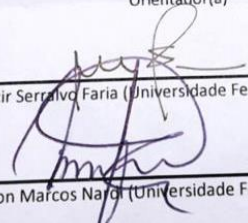
Banca examinadora:



Dr. Eduardo Luiz Gasnhar Moreira (Universidade Federal de Santa Catarina)
Orientador(a)



Dr. Moacir Serralvo Faria (Universidade Federal de Santa Catarina)



Dr. Geisson Marcos Nardi (Universidade Federal de Santa Catarina)

Florianópolis, 18 de março de 2019.

Dedico esse trabalho à minha amada família
que sempre acreditou em mim.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente à minha família, pois sem eles tudo isso não seria possível. Meus pais, que embora não tenham frequentado o mundo acadêmico, são dotados de uma sabedoria ímpar que curso algum um dia conseguiria ensinar. Obrigado por tudo.

Aos colegas de laboratório; Raul, Lê, Adriano, Peter, Izolene, Gi, Sara e Well. Pessoas que sempre estiveram ao meu lado para auxiliar no que fosse preciso e para debater ciência acompanhado de um bom café. Agradeço muito a todos vocês.

Ao Raul, que além de colega de laboratório se tornou um amigo. Muito obrigado por tudo.

Agradeço imensamente ao meu orientador, professor Eduardo, quem abriu as portas do seu laboratório, confiou no meu trabalho, me deu autonomia dentro do mundo acadêmico e, de quebra, sempre foi parceiro para uma cerveja. Meu muito obrigado! Com certeza aprendi muito nesse ano que passou.

A todo o pessoal do LANDI, em especial Bárbara e Scheila, com quem aprendi muito sobre as Neurociências.

Ao professor Adair, que antes de agradecer, devo pedir desculpas pelas canetas que lhe dei no futebol. Agradeço muito pelo sempre presente apoio.

Ao professor Andrei, quem sempre me ajudou com excelentes conselhos que certamente me levaram a ser alguém melhor... Não tenho dúvidas que serás um amigo que levarei para a vida toda. Obrigado por tudo.

Aos demais professores, servidores e técnicos-administrativos da UFSC que auxiliaram direta ou indiretamente minha carreira acadêmica, meu muito obrigado.

Aos animais usados em experimento; meu máximo respeito.

À CAPES, pelo apoio financeiro.

“Eu gostaria de dizer duas coisas, uma intelectual e uma moral. A coisa intelectual que eu gostaria de dizer é a seguinte: quando você estiver estudando algum assunto, ou considerando qualquer filosofia, pergunte-se apenas quais são os fatos e qual é a verdade que os fatos corroboram. Nunca se deixe desviar pelo que você deseja acreditar, ou pelo que você acha que teria efeitos sociais benéficos se fosse acreditado. Mas veja apenas, e unicamente, quais são os fatos. Essa é a coisa intelectual que eu gostaria de dizer. A coisa moral que eu gostaria de dizer é: o amor é sábio, o ódio é tolo. Neste mundo que está cada vez mais estreitamente interligado, temos que aprender a tolerar uns aos outros, temos que aprender a aturar o fato de que algumas pessoas dizem coisas que não gostamos [...].”

Sir Bertrand Arthur William Russell

RESUMO

A depressão é comumente observada como um efeito colateral iatrogênico da administração crônica de corticosteroides. Nesse sentido, a resposta ao estresse mediada pela ativação do eixo Hipotálamo-Pituitário-Adrenal (HPA) tem sido relacionada com a fisiopatologia da depressão e de outros transtornos do humor. A hipótese da disfunção do eixo HPA como etiologia da depressão fundamenta-se em estudos que apontam uma íntima relação entre o comprometimento da retroalimentação inibitória do eixo HPA com a manifestação de quadros de depressão. Em modelos animais, o fármaco dexametasona (corticoide sintético) é uma estratégia frequentemente utilizada para determinar modificações comportamentais induzidas pela alta concentração de corticosterona. O tratamento da depressão é limitado e apresenta diversos efeitos colaterais. Além disso, cerca de 50% dos pacientes não respondem a este tipo de tratamento. Assim sendo, a heterogeneidade da depressão e seu curso extremamente variável torna difícil encontrar estratégias terapêuticas eficazes ao tratamento. Nesse cenário, estratégias não farmacológicas são investigadas como potenciais efeitos benéficos em contextos patológicos. Nesse sentido, o paradigma do enriquecimento ambiental (AE) emerge como potencial estratégia terapêutica. O objetivo do presente estudo foi caracterizar, em camundongos Swiss machos e fêmeas, as alterações metabólicas e comportamentais induzidas pela administração crônica de dexametasona e avaliar o impacto da concomitante exposição dos animais ao enriquecimento ambiental. Foram utilizados um total de 76 camundongos Swiss machos e fêmeas com dois meses de idade ao início dos protocolos. Desse total, 18 machos e 18 fêmeas foram utilizados para padronizar um modelo de administração e outros 40 machos para avaliar os efeitos da concomitante exposição desses animais tratados com dexametasona ao ambiente enriquecido (1 mês). Os animais receberam, diariamente, por 21 dias, solução salina (NaCl 0,9%) ou dexametasona (4 mg/kg). No dia 17 iniciou-se uma bateria de testes comportamentais compostas pelo Labirinto em Cruz Elevado (LCE) (dia 17), Teste de Borrifagem de Sacarose (TBS) (dia 18), Teste de Suspensão pela Cauda (TSC) (dia 19), Teste do Campo Aberto (TCA) (dia 20) e teste de tolerância a glicose (dia 21). No dia 22 os animais foram eutanasiados e o sangue foi coletado por punção cardíaca para análise posterior. O tratamento com dexametasona não apresentou efeitos significativos no comportamento do tipo-ansioso avaliado no

LCE em ambos os sexos. O comportamento do tipo-anedônico, avaliado por meio do TBS, foi observado apenas nos animais machos tratados com dexametasona. Observou-se que o enriquecimento ambiental não foi capaz de reverter tal alteração. O tratamento com dexametasona resultou em comportamento do tipo depressivo, tanto em machos como em fêmeas, avaliados por meio do TSC, sendo que, em machos, o enriquecimento ambiental apresentou efeitos do tipo antidepressivo, possivelmente pela redução da corticosterona observada nos animais expostos a esse ambiente. Ainda, o enriquecimento ambiental demonstrou efeitos sobre o metabolismo dos animais, revertendo: i- a diminuição de triglicérides e ii- o aumento de proteínas totais observada nos machos. Junto, esses dados sugerem que o enriquecimento ambiental apresentou efeitos antidepressivos em modelos de depressão induzidos por corticosteroides, possivelmente associados aos efeitos metabólicos resultantes da exposição dos animais a esse ambiente.

Palavras-chave: Depressão. Estresse. Enriquecimento Ambiental

ABSTRACT

Depression is commonly seen as an iatrogenic side effect of chronic corticosteroid administration. In this sense, the stress response mediated by activation of the Hypothalamic-Pituitary-Adrenal (HPA) axis has been related to the pathophysiology of depression and other mood disorders. The hypothesis of HPA axis dysfunction as the etiology of depression is based on studies that point to an intimate relationship between the impairment of the HPA axis inhibitory feedback and the manifestation of depression. In animal models, the drug dexamethasone (synthetic corticoid) is a strategy frequently used to determine behavioral changes induced by high corticosterone concentration. The treatment of depression is limited and has several side effects. In addition, about 50% of patients do not respond to this type of treatment. Thus, the heterogeneity of depression and its extremely variable course make it difficult to find effective therapeutic strategies for treatment. In this scenario, non-pharmacological strategies are investigated as potential beneficial effects in pathological contexts. In this sense, the paradigm of environmental enrichment (EE) emerges as a potential therapeutic strategy. The objective of the present study was to characterize the metabolic and behavioral changes induced by chronic dexamethasone administration in Swiss male and female and evaluate the impact of concomitant exposure of the animals to environmental enrichment. A total of 76 male and female Swiss mice at two months of age were used at the beginning of the protocols. From this total, 18 males and 18 females were used to standardize one administration model and another 40 males to evaluate the effects of the concomitant exposure of these animals treated with dexamethasone to the enriched environment (1 month). Animals received saline (NaCl 0.9%) or dexamethasone (4 mg / kg) daily for 21 days. On the 17th, a battery of behavioral tests composed by the Elevated Plus Maze (day 17), Splash Test (day 18), Tail Suspension Test (day 19), Open Field Test (day 20) and glucose tolerance test (day 21). On day 22 animals were euthanized and blood was collected by cardiac puncture for further analysis. Dexamethasone treatment did not present significant effects on the anxious-type behavior evaluated in the LCE in both sexes. The anionic-type behavior, evaluated by TBS, was observed only in male animals treated with dexamethasone. It was observed that environmental enrichment was not able to reverse such alteration. The treatment with dexamethasone resulted in depressive behavior in both males and

females, evaluated by TSC. In males, environmental enrichment showed antidepressant effects, possibly due to the reduction of corticosterone observed in animals exposed to its environment. Furthermore, environmental enrichment demonstrated effects on the metabolism of the animals, reversing: i- the decrease of triglycerides and ii- the increase of total proteins observed in males. Together, these data suggest that environmental enrichment has shown antidepressant effects in corticosteroid-induced depression models, possibly associated with metabolic effects resulting from exposure of animals to this environment.

Keywords: Depression. Stress. Environmental Enrichment.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1- Resposta ao estresse por meio da ativação do eixo HPA.....	27
Figura 2- Relação entre capacidade adaptativa e custo adaptativo.....	31
Figura 3- Volume do hipocampo em paciente saudável e com histórico de depressão.	34
Figura 4- Eixo HPA e depressão.	40
Figura 5- Efeitos do enriquecimento ambiental no SNC.....	56
Figura 6- Desenho experimental da padronização do modelo experimental.	64
Figura 7- Desenho experimental da intervenção com Ambiente Enriquecido.	66
Figura 8- Efeitos do tratamento com dexametasona no LCE em camundongos machos e fêmeas.	72
Figura 9- Efeitos do tratamento de dexametasona no Teste de Borrifagem de Sacarose em camundongos machos e fêmeas.	74
Figura 10- Efeito do tratamento com dexametasona no TSC em camundongos machos e fêmeas.	75
Figura 11- Efeitos do tratamento com dexametasona no Teste do Campo Aberto.....	77
Figura 12- Efeitos do tratamento com dexametasona sobre parâmetros metabólicos em camundongos machos e fêmeas.	78
Figura 13- Efeitos da administração de dexametasona sobre parâmetros plasmáticos de camundongos machos e fêmeas.	80
Figura 14- Efeito do enriquecimento ambiental no comportamento do tipo-ansioso em camundongos machos tratados com dexametasona. ...	82
Figura 15- Efeito do enriquecimento ambiental no comportamento do tipo-anedônico em camundongos machos tratados com dexametasona.	83

Figura 16- Efeito do enriquecimento ambiental no comportamento do tipo-depressivo em camundongos machos tratados com dexametasona.	85
Figura 17- Efeito do enriquecimento ambiental em parâmetros de emocionalidade e locomoção em camundongos machos tratados com dexametasona.....	86
Figura 18- Efeito do enriquecimento ambiental em parâmetros metabólicos de camundongos machos tratados com dexametasona.	88
Figura 19- Efeito do enriquecimento ambiental em parâmetros metabólicos de camundongos machos tratados com dexametasona.	90

LISTA DE TABELAS

Tabela 1- Sintomas para diagnóstico do Transtorno Depressivo Maior - DSM-V.....	33
Tabela 2- Estudos pré-clínicos envolvendo administração de corticoides e avaliações metabólicas e/ou comportamentais em roedores.....	47
Tabela 3- Divisão dos grupos experimentais da padronização do modelo experimental.	63
Tabela 4- Divisão dos Grupos Experimentais.....	65

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

CRH – Hormônio Liberador de Corticotrofina
ACTH – Hormônio adrenocorticotrófico
CRHr – Receptor de hormônio liberador de corticotrofina
HPA – Hipotálamo-Pituitária-Adrenal
PKA – Proteína Cinase A
HSL – Lipase Sensível a Hormônios
i.e. – Isto é
DSM-V – Manual Diagnóstico e Estatístico de Transtornos Mentais V
mm³ – Milímetro ao cubo
MAO – Monoamina Oxidase
5HT1A – Receptor de Serotonina
iMAO – Inibidor da monoamina oxidase
ISRS – Inibidor seletivo de recaptção de serotonina
ISRN – Inibidor seletivo de recaptção de noradrenalina
NMDA – N-Metil-D-Aspartato
FDA – Food and drug administration
EUA – Estados Unidos da America
LCR – Líquido cefalorraquidiano
BDNF – Fator neurotrófico derivado do encéfalo
CRHr-1 – Receptor do hormônio liberador de corticotrofina tipo 1
EVCI – Esperança de vida corrigida pela incapacidade
UFSC – Universidade federal de santa catarina
CEUA – Comitê de ética de uso de animais
i.p. – Intraperitoneal
mL – Mililitros
e.g. – por exemplo
mg – Miligrama
Kg- Quilograma
NaCl – Cloreto de sódio
cm – Centímetros
LCE – Labirinto em cruz elevado
TBS – Teste de borrifagem de sacarose
TCA – Teste do campo aberto

dl – Decilitro
nm – Nanômetro
ANOVA – Análise de variância
E.P.M – Erro padrão da média
mg/dL – Miligrama por decilitro
A.P – Ambiente padrão
A.E – Ambiente enriquecido
ug/Kg – Micrograma por quilograma
s.c. – Subcutânea
RNAm – Ácido ribonucleico mensageiro
AMPc – Monofosfato cíclico de adenosina

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	25
1.1 ESTRESSE.....	25
1.2 DEPRESSÃO	32
1.3 ESTRESSE E DEPRESSÃO.....	38
1.4 CORTICOSTERÓIDES E DISFUNÇÕES METABÓLICAS	42
1.5 COMPORTAMENTO DO TIPO DEPRESSIVO EM ROEDORES.....	43
1.6 ENRIQUECIMENTO AMBIENTAL.....	52
2. JUSTIFICATIVA	57
3. HIPÓTESE	59
4. OBJETIVOS	59
4.1 OBJETIVO GERAL:	59
4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS:	59
5. MATERIAL E MÉTODOS	61
5.1 ANIMAIS.....	61
5.2 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL	61
5.2.1 Desenho experimental i- Padronização do protocolo.....	62
5.2.2 Desenho experimental II – Efeito da exposição ao enriquecimento ambiental.....	64
5.2.3 Ambiente Enriquecido.....	66
5.3 TESTES COMPORTAMENTAIS	67
5.3.1 Teste do Labirinto em Cruz Elevado (LCE).....	67
5.3.2 Teste de Borrifagem de Sacarose (TBS).....	68
5.3.3 Teste da Suspensão Pela Cauda (TSC).....	68
5.3.4 Teste do Campo Aberto (TCA).....	70
5.4 ANÁLISES BIOQUÍMICAS	70

5.5 ANÁLISE ESTATÍSTICA	71
6. RESULTADOS	71
6.1 RESULTADOS DA PADRONIZAÇÃO DO MODELO.....	72
6.1.1 Efeito da administração de dexametasona sobre parâmetros de exploração e emocionalidade no Labirinto em Cruz Elevado em camundongos machos e fêmeas.....	72
6.1.2 Efeito da administração de dexametasona sobre parâmetros de emocionalidade no Teste da Borrifagem de Sacarose em camundongos machos e fêmeas.	73
6.1.3 Efeito da administração de dexametasona sobre parâmetros de emocionalidade no Teste da Suspensão Pela Cauda em camundongos machos e fêmeas.....	74
6.1.4 Efeito da administração de dexametasona sobre parâmetros de emocionalidade e locomoção no Teste do Campo Aberto em camundongos machos e fêmeas.....	76
6.1.5 Efeito da administração de dexametasona sobre parâmetros metabólicos em camundongos machos e fêmeas..	77
6.2 RESULTADOS DA INTERVENÇÃO COM O ENRIQUECIMENTO AMBIENTAL EM CAMUNDONGOS SWISS MACHOS EXPOSTOS A ADMINISTRAÇÃO DE DEXAMETASONA.	80
6.2.1 Efeitos da exposição de camundongos machos tratados com dexametasona ao enriquecimento ambiental sobre o comportamento do tipo-ansioso.....	80
6.2.2 Efeitos da exposição de camundongos machos tratados com dexametasona ao enriquecimento ambiental sobre o comportamento do tipo-anedônico.....	82
6.2.3 Efeitos da exposição de camundongos machos tratados com dexametasona ao enriquecimento ambiental sobre o comportamento do tipo-depressivo.....	84
6.2.4 Efeitos da exposição de camundongos machos tratados com dexametasona ao enriquecimento ambiental sobre	

parâmetros de emocionalidade e locomoção no Teste do Campo Aberto.....	85
6.2.5 Efeitos da exposição de camundongos machos tratados com dexametasona ao enriquecimento ambiental sobre parâmetros metabólicos.....	86
7. DISCUSSÃO	91
8. CONCLUSÃO	111
PERSPECTIVAS	112
REFERÊNCIAS	114

1. INTRODUÇÃO

1.1 ESTRESSE

Walter Cannon usou pela primeira vez o conceito de homeostase para explicar a resposta de "luta ou fuga" de um organismo apresentado a um estímulo nocivo (CANNON, 1932). Em 1936, o endocrinologista húngaro-canadense Hans Selye observou que diferentes organismos desencadeavam um mesmo padrão de respostas fisiológicas orquestradas¹ frente a estímulos nocivos², os quais ele denominou de estressores (SELYE, 1936). Uma das características presentes em tais respostas é o aumento da liberação de corticosteroides pelas glândulas suprarrenais; especialmente os glicocorticoides: o cortisol (em humanos) e a corticosterona (em roedores). Depois de liberados, estes, por sua vez, permeiam a membrana plasmática e ligam-se a dois principais receptores: os receptores mineralocorticoides e os receptores glicocorticoides, sendo posteriormente capazes de regular a expressão gênica (DE KLOET; JOËLS; HOLLSBOER, 2005), ambos abundantemente expressos em neurônios de estruturas límbicas (HERMAN et al., 2003), como o hipocampo (PATEL et al., 2001) e em praticamente todas as células do corpo humano (OAKLEY; CIDLOWSKI, 2014). A resposta celular aos glicocorticoides varia de célula pra célula e na própria célula de acordo com o estágio celular. Os receptores mineralocorticoides apresentam alta afinidade pelos corticoides e estão quase sempre ativados em concentrações basais

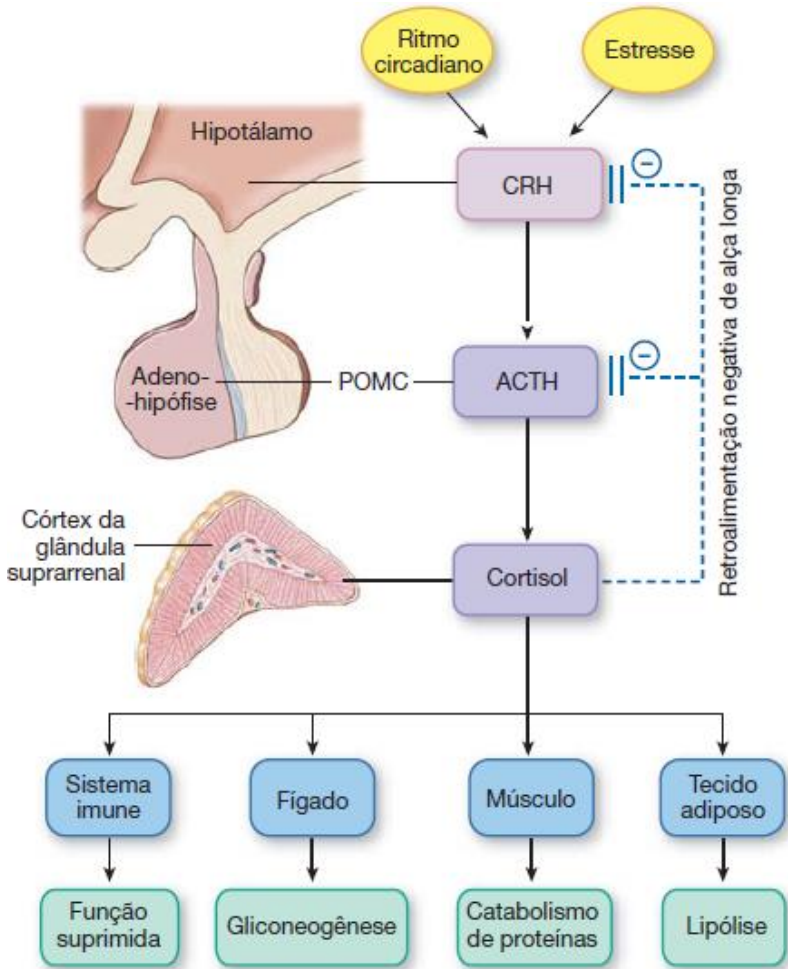
¹ Respostas como maior ativação das glândulas suprarrenais e mudanças no tônus muscular.

² Estímulos como choque elétrico, exposição dos animais ao frio, injúria cirúrgica e intoxicação.

destes hormônios (YE et al., 2008), enquanto os receptores de glicocorticoides são ativados quando concentrações de glicocorticoides estão elevadas, como em situações de estresse (DE KLOET et al., 2005). Em situações tidas como estressantes, os neurônios do núcleo paraventricular do hipotálamo sintetizam e liberam o hormônio liberador de corticotrofina (CRH, do inglês, *corticotropin-releasing hormone*) que, na adeno-hipófise, estimula a liberação do hormônio adrenocorticotrófico (ACTH, do inglês, *adrenocorticotropic hormone*) por meio da ativação de receptores de CRH (CRHr). O ACTH, por sua vez, por meio da corrente sanguínea, atua na glândula suprarrenal, onde estimula a liberação dos glicocorticoides pelo córtex da suprarrenal (DE KLOET; JOËLS; HOLSBOER, 2005). Com o aumento da concentração plasmática dos glicocorticoides, os receptores mineralocorticoides e os receptores de glicocorticóides são ativados no hipotálamo e na adeno-hipófise, inibindo a produção e liberação de CRH e ACTH, respectivamente. Assim, consequentemente, inibindo o eixo Hipotálamo-Adeno-hipófise-Adrenal (HPA)³, por meio de alça de retroalimentação negativa (BELMAKER; AGAM, 2008; KELLER et al., 2016) (Figura 1). Não obstante, o hipocampo também atua nessa alça de retroalimentação, participando da inibição do eixo HPA por meio da ativação de receptores glicocorticoides presentes nesta região cerebral (MCEWEN, 2002).

³ O eixo é convencionalmente chamado de Eixo-Pituitário-Adrenal. Portanto a sigla utilizada no trabalho será Eixo HPA.

Figura 1- Resposta ao estresse por meio da ativação do eixo HPA



Legenda: O eixo HPA inicia-se com o hormônio liberador de corticotrofinas (CRH, do inglês, corticotropin- releasing hormone), que é secretado no sistema porta hipotalâmico-hipofisário e transportado até a adeno-hipófise. O CRH estimula a secreção do hormônio adrenocorticotrófico (ACTH, do inglês, adrenocorticotropic hormone) (ou corticotrofina) da adeno-hipófise (ou pituitária). O ACTH, por sua vez, atua no córtex da glândula suprarrenal para promover a síntese e a liberação de cortisol. O cortisol, então, atua como um sinal de

retroalimentação negativa, inibindo a secreção de ACTH e de CRH. HPA: hipotálamo-pituitário-adrenal; ACTH: hormônio adrenocorticotrófico; CRH: hormônio liberador de corticotrofina. Fonte: SILVERTHORN, 2017.

A resposta ao estresse envolve a atividade combinada de múltiplos sistemas centrais reguladores que interagem para mobilizar energia para o organismo no momento de estresse (MYERS; MCKLVEEN; HERMAN, 2014). Os glicocorticoides biologicamente ativos são sintetizados a partir do colesterol por meio de um processo chamado esteroidogênese, que envolve uma série de enzimas (MILLER; AUCHUS, 2011). O ACTH estimula a glândula adrenal por meio da ativação da Proteína Cinase A (PKA), resultando na regulação não genômica das proteínas esteroidogênicas, incluindo a fosforilação da lipase sensível a hormônios (HSL), uma proteína que aumenta as concentrações intracelulares de colesterol, que ativa uma série de reações enzimáticas que resultará na síntese de glicocorticoides (RAMAMOORTHY; CIDLOWSKI; SERVICES, 2017). Na glândula adrenal, o cortisol/corticosterona é liberado em pulsos determinados pelas concentrações plasmáticas do mesmo, i.e., via alça de feedback inibitório (PARIANTE; LIGHTMAN, 2008) e pelo ritmo circadiano do organismo, haja vista que, fisiologicamente, as concentrações de glicocorticoides são maiores pela manhã e tendem a decair à noite (DE KLOET SARABDJITSINGH, 2008). Tal ritmo de liberação é essencial para que a concentração sanguínea de glicocorticoides seja efetivamente controlada, permitindo que os glicocorticoides exerçam suas funções e auxiliem na regulação de diversos mecanismos fisiológicos do organismo (HERMAN et al., 2003). No fígado, os glicocorticoides estimulam o processo de gliconeogênese, elevando as concentrações

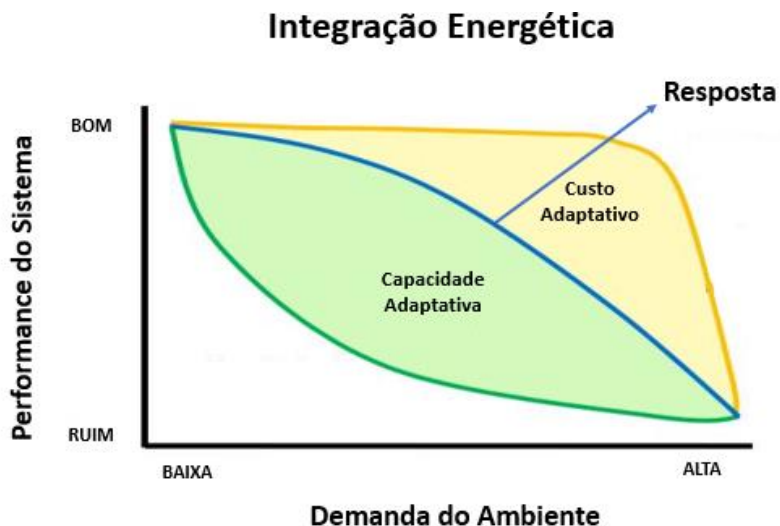
plasmáticas de glicose, que, por sua vez, promove a deposição de glicogênio hepático (LORRAINE; MCKAY 2003). O aumento da gliconeogênese hepática deve-se aos efeitos diretos dos glicocorticoides na expressão hepática de genes que codificam enzimas necessárias para a biossíntese de glicose e glicogênio. A exposição prolongada aos glicocorticoides leva a um estado semelhante ao diabetes⁴ devido ao aumento da glicose plasmática, enquanto as baixas concentrações de glicocorticoides levam à hipoglicemia e à diminuição dos estoques de glicogênio (LORRAINE; MCKAY, 2003). No músculo esquelético, em concentrações fisiológicas, os glicocorticoides desempenham papel necessário para a manutenção do tônus muscular, porém, quando em concentrações elevadas, os mesmos podem levar a anormalidades musculares devido aos efeitos catabólicos no metabolismo proteico (LORRAINE; MCKAY, 2003).

As respostas neuroendócrinas ao estresse promovem mobilização energética para demandas em relação ao estressor, conseqüentemente os glicocorticoides atuarão nas funções celulares, transcrição gênica, mobilização de glicose, catabolismo proteico e, por fim, no comportamento (MYERS et al., 2014). Nesse sentido, as respostas ao estresse (agudo ou crônico) promovem adaptações específicas com base nas necessidades reais ou percebidas de um organismo. Tal custo adaptativo pode ser deletério quando os sistemas efetores, como, por exemplo, a necessidade de mobilização energética, são repetidamente ativados para atender às demandas do organismo em períodos de estresse severo ou prolongado, gerando conseqüências

⁴ Estado caracterizado pelo aumento persistente na concentração da glicemia plasmática.

comportamentais que perpassam da adaptação à patologia, isto é, a necessidade de adaptação se torna maior que a capacidade adaptativa do indivíduo (MYERS et al., 2014) (Figura 2). Nesse sentido, as ações dos glicocorticoides têm sido propostas para seguir uma forma em U invertido, de tal forma que níveis altos ou baixos de glicocorticoides podem prejudicar o desempenho do organismo em gerar adaptação ao estressor (HERMAN et al., 2003; ROY et al., 1999). Isto é, a secreção de glicocorticoide parece ser apropriada ao contexto. Secreções mais altas de glicocorticoides em condições de baixa demanda podem ser prejudiciais e o contrário também é verdadeiro. Dessa forma, portanto, a mesma concentração de glicocorticoides pode ser considerada deletéria ou benéfica, dependendo do contexto. A título de exemplo, camundongos expostos ao labirinto aquático apresentaram melhora no desempenho cognitivo quando tratados com corticosterona e treinados em água morna, porém, por outro lado, a mesma dose de corticosterona não resultou em melhora no desempenho quando os animais foram treinados em água fria, uma vez que esta última é mais estressora e, portanto, demanda mais mobilização energética e consequente necessidade de glicocorticoides (SANDI; LOSCERTALES; GUAZA, 1997). Ou seja, a concentração plasmática de glicocorticoide deve ser específica do contexto estressor (HERMAN et al., 2003; ROY et al., 1999). Assim, as psicopatologias podem surgir quando os custos adaptativos superam a capacidade adaptativa, levando a um "ponto de ruptura" no processo de adaptação (MYERS et al., 2014).

Figura 2- Relação entre capacidade adaptativa e custo adaptativo.



Legenda: A relação entre capacidade adaptativa e custo adaptativo pode ser explicada visualmente pela relação entre o desempenho dos organismos e a demanda ambiental. Sob condições de baixa demanda ambiental, altos níveis de desempenho podem ser alcançados. Com o aumento da demanda, a capacidade adaptativa diminui e o custo adaptativo aumenta. A resposta real do organismo (representada pela linha azul) fica entre esses dois extremos teóricos e é determinada para cada indivíduo em função de sua capacidade adaptativa e custo adaptativo. Em última análise, o custo adaptativo pode ser maior do que a capacidade adaptativa, levando a um ponto de ruptura em que o desempenho do sistema é comprometido e surgem fatores de risco para a patologia. Adaptado de Myers, McKlveen e Herman, 2014.

Nesse sentido, a resposta fisiológica ao estresse, bem como a consequente mobilização de cortisol, tem sugerido que o estresse é um fator de risco crítico para o desenvolvimento de doenças neuropsiquiátricas como a depressão e há evidências de que o início e a duração da depressão estão fortemente ligados ao estresse (COHEN; JANICKI-DEVERTS; MILLER, 2007). Em termos gerais, o estresse

patológico pode ser descrito como um evento que ocorre quando as demandas do ambiente excedem a capacidade adaptativa do sujeito. Nesse sentido, exposições ao estresse crônico são consideradas as mais tóxicas porque têm maior probabilidade de resultar em mudanças permanentes ou a longo prazo nas respostas emocionais, fisiológicas e comportamentais (MCEWEN, 2000).

1.2 DEPRESSÃO

O Transtorno Depressivo Maior é um transtorno psiquiátrico de alta prevalência mundial. Estima-se que nos últimos dez anos o número de pessoas com depressão aumentou 18,4% e, em 2015, haviam cerca de 322 milhões de pessoas convivendo com depressão no mundo (WHO, 2017). Em média 1 a cada 20 pessoas já relataram ter passado por algum episódio depressivo anualmente. Em 2030 estima-se que a depressão seja a principal responsável por morte prematura e pela diminuição da saúde das pessoas (FERRARI et al., 2013).

Na América do Sul a depressão apresenta 16,5% de prevalência (BAXTER et al., 2013). No Brasil, especificamente, em um estudo epidemiológico envolvendo 49 mil brasileiros com mais de 18 anos, estimou-se que 9,7% destes apresentaram algum grau de depressão (BARROS et al., 2017). De modo geral, o Brasil parece apresentar uma prevalência similar à encontrada no mundo, com exceção da região Sul onde essa prevalência é maior (MUNHOZ et al., 2016). A variabilidade dos sintomas evidencia as diferentes áreas encefálicas afetadas pela

depressão. Estudos *pós morte*⁵ e de neuroimagem mostram que a depressão afeta diferentes áreas encefálicas, sendo uma delas o hipocampo (DREVETS, 2001; SHELINE, 2003), resultando em uma redução de seu volume (CAMPBELL; MACQUEEN, 2004) (Figura 3). A Tabela 1 apresenta os critérios diagnósticos para transtorno depressivo maior, segundo o Manual Diagnóstico Estatístico V (DSM-V).

Tabela 1- Sintomas para diagnóstico do Transtorno Depressivo Maior - DSM-V.

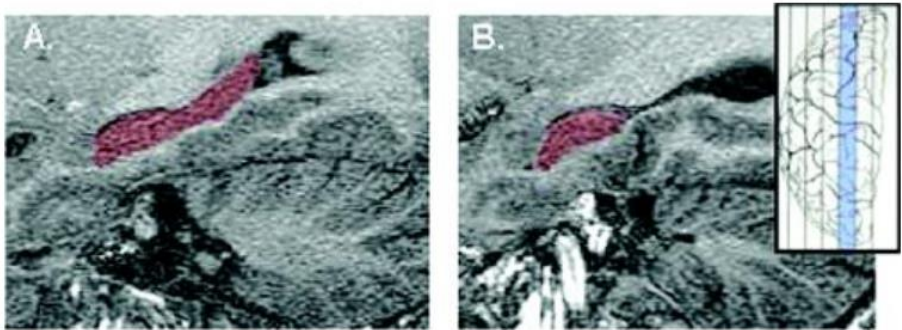
-
1. Humor deprimido na maior parte do dia
 2. Acentuada diminuição do interesse ou prazer em todas ou quase todas as atividades
 3. Perda ou ganho significativo de peso sem estar fazendo dieta (p. ex., uma alteração de mais de 5% do peso corporal em um mês)
 4. Insônia ou hipersonia quase todos os dias
 5. Agitação ou retardo psicomotor quase todos os dias
 6. Fadiga ou perda de energia quase todos os dias
 7. Sentimentos de inutilidade ou culpa excessiva ou inapropriada
 8. Capacidade diminuída para pensar ou se concentrar, ou indecisão, quase todos os dias
 9. Pensamentos recorrentes de morte (não somente medo de morrer), ideação suicida recorrente sem um plano específico, uma tentativa de suicídio ou plano específico para cometer suicídio.
-

Legenda: Para o diagnóstico do Transtorno Depressivo Maior, o V Manual Diagnóstico e Estatístico de Transtornos Mentais (DSM-V, 2013) estabelece que cinco ou mais dos sintomas citados na Tabela 1 devem estar presentes durante o período de pelo menos duas semanas, sendo que pelo menos um dos sintomas deve ser (1) humor deprimido

⁵ Estudos que envolvem análises neuropatológica após a morte do paciente.

ou (2) perda de interesse ou prazer. Os sintomas devem causar sofrimento significativo e não podem ser atribuíveis ao uso de substâncias ou qualquer outra condição médica.

Figura 3- Volume do hipocampo em paciente saudável e com histórico de depressão.



Legenda: Imagens espectroscópicas de ressonância magnética do hipocampo esquerdo em um indivíduo controle saudável e em um paciente com depressão recorrente. A: visão sagital do hipocampo esquerdo, destacado em vermelho, de um indivíduo controle saudável, cujo volume mediu 3295 mm^3 . B: visão do hipocampo esquerdo de um paciente com longa história de depressão, cujo volume mediu 2015 mm^3 . Os sujeitos (controle e depressivo) possuíam a mesma idade e sexo. Fonte: Campbell & Macqueen, 2004.

Algumas hipóteses são postuladas como principais candidatas para explicar a etiologia da depressão. Há, por exemplo, a hipótese genética da depressão, onde alguns estudos têm demonstrado que paciente com depressão apresentam características genéticas semelhantes (SULLIVAN; NEALE; KENDLER, 2000). Recentemente um estudo ampliou para 44 o catálogo de variantes genéticas envolvidas na depressão, sugerindo 30 novas variantes que até o momento eram completamente desconhecidas (WRAY et al., 2018). Outros candidatos

a agentes fisiopatológicos na depressão vão desde alterações em sistemas de neurotransmissão envolvendo os neurônios glutamatergicos (HASLER et al., 2007) e gabaérgicos (SANACORA; TRECCANI; POPOLI, 2012) até alterações no ciclo circadiano (BUNNEY; BUNNEY, 2000), dentre outras.

Uma das hipóteses mais bem descritas é a hipótese monoaminérgica. As primeiras evidências das aparentes causalidades entre perturbações nos níveis de monoaminas e o aparecimento de sintomas depressivos advém da década de 1950, onde observou-se que pacientes que utilizavam reserpina para o tratamento de hipertensão começaram a apresentar sintomas de depressão. Posteriormente constatou-se que este fármaco apresenta como mecanismo de ação o bloqueio do transportador vesicular de monoaminas, resultando em menor liberação das mesmas (FREIS, 1954; NEMEROFF, 1998). Corroborando isso, observou-se que pacientes com tuberculose que utilizavam iproniazida como fármaco para o tratamento apresentavam exaltação do humor e aumento de energia. Logo constatou-se que este fármaco apresenta como mecanismo de ação a inibição da monoamina oxidase, enzima que degrada as monoaminas (DEVERTEUIL; LEHMANN, 1958) permitindo o aumento de monoaminas na fenda sináptica, resultando em maior ação das mesmas. As principais monoaminas são as catecolaminas (adrenalina, noradrenalina e dopamina) e as indolaminas (serotonina) (NG et al., 2015). Perturbações nos níveis de monoaminas no SNC parecem estar diretamente ligadas com a manifestação de desordens do humor e drogas inibidoras da monoamina oxidase resultam em melhora dos sintomas de pacientes com depressão (CIPRIANI et al., 2011; NG et al., 2015). Com base na

seletividade do substrato e na sensibilidade do inibidor, duas formas de MAO foram propostas e designadas por MAO A e B (SHIH et al., 1999). A MAO A tem maior afinidade pelos substratos serotonina, noradrenalina e dopamina enquanto que a MAO B possui maior afinidade por feniletilamina e benzilamina e ambos são encontrados em todo o encéfalo (SHIH et al., 1999).

O tratamento da depressão envolve, principalmente, psicoterapia associada ao uso de fármacos específicos. Diversos estudos demonstraram o envolvimento de receptores serotoninérgicos 5HT_{1A} (HENSLER, 2002), receptores adrenérgicos α_1 , α_2 e β (WONG; LICINIO, 2001) e receptores de dopamina (DAILLY et al., 2004) no mecanismo de ação de diferentes drogas antidepressivas. Existem várias classes de antidepressivos, como os inibidores da monoamina oxidase (iMAO), os inibidores seletivos da recaptação de serotonina (ISRS) e de noradrenalina (ISRN) ou de recaptação dual (noradrenalina/serotonina), os antidepressivos tricíclicos, além dos antidepressivos atípicos (MORILAK; FRAZER, 2004). Vale ressaltar que tais antidepressivos supracitados proporcionam a remissão dos sintomas após 3-5 semanas de uso, o que sugere que a modulação dos níveis de tais moléculas não é inteiramente responsável pela remissão dos sintomas (NESTLER et al., 2002). Além disso, cerca de 50% dos pacientes não respondem a este tipo de tratamento (BERTON; NESTLER, 2006). Assim sendo, a heterogeneidade da depressão e seu curso extremamente variável torna difícil encontrar estratégias terapêuticas eficazes ao tratamento (BELMAKER; AGAM, 2008), o que resulta em alta morbimortalidade e expressivo custo para a saúde mundial (MURRAY et al., 2012). Tais achados indicam a necessidade de desenvolver novas estratégias

terapêuticas para o tratamento da depressão. Além dos sistemas acima citados, evidências de estudos *post mortem* e *in vivo* indicam que o sistema glutamatérgico esteja envolvido na fisiopatologia da depressão, especialmente o receptor de glutamato N-Metil-D-Aspartato (NMDA) (AUER et al., 2000; HASHIMOTO et al., 2009). Estudos iniciais demonstraram que antidepressivos típicos alteraram a afinidade do sítio de glicina do receptor NMDA, sugerindo a possibilidade que a diminuição da função do receptor NMDA contribui para uma resposta antidepressiva. A cetamina, um antagonista do receptor NMDA de alta afinidade e não competitivo, foi inicialmente aprovado pela *Food and Drug Administration* (FDA) como um agente anestésico e é usado até hoje para tal fim. No entanto, dois pequenos estudos demonstraram potenciais efeitos antidepressivos da cetamina. Esta hipótese foi testada diretamente primeiro por Krystal, Berman, Charney e colegas em Yale quando eles investigaram uma dose única subanestésica (0,5 mg/kg, infusão intravenosa ao longo de 40 minutos) de cetamina e descobriram que os pacientes começaram a relatar melhora dos sintomas depressivos em questão de poucas horas (BERMAN et al., 2000). Esses achados foram confirmados por um estudo duplo-cego controlado por placebo (ZARATE et al., 2006). Alguns limitantes são encontrados na eventual terapêutica com cetamina para a depressão: seu efeito dissociativo pode resultar em abuso e a administração é de difícil execução, pois sendo intravenosa precisa ser realizada em clínica ou hospitais. Para resolver este problema, a Johnson & Johnson está desenvolvendo uma aplicação nasal do estereoisômero de (S) -cetamina (esketamina), que recebeu classificação de terapia inovadora da FDA. De fato, os potenciais efeitos antidepressivos da esketamina intranasal parecem promissores. O estudo

de Lapidus e cols demonstrou que os pacientes com Transtorno Depressivo Maior mostraram significativa melhora 24 horas após o tratamento com esketamina intranasal, mostrando o efeito antidepressivo rápido da droga, além de não terem sido observados efeitos adversos graves (LAPIDUS et al., 2014). Em fevereiro de 2019 o Comitê Consultivo da FDA recomendou a aprovação do Spray CIII SPRAVATO (esketamine) para adultos com depressão resistente aos tratamentos disponíveis.⁶

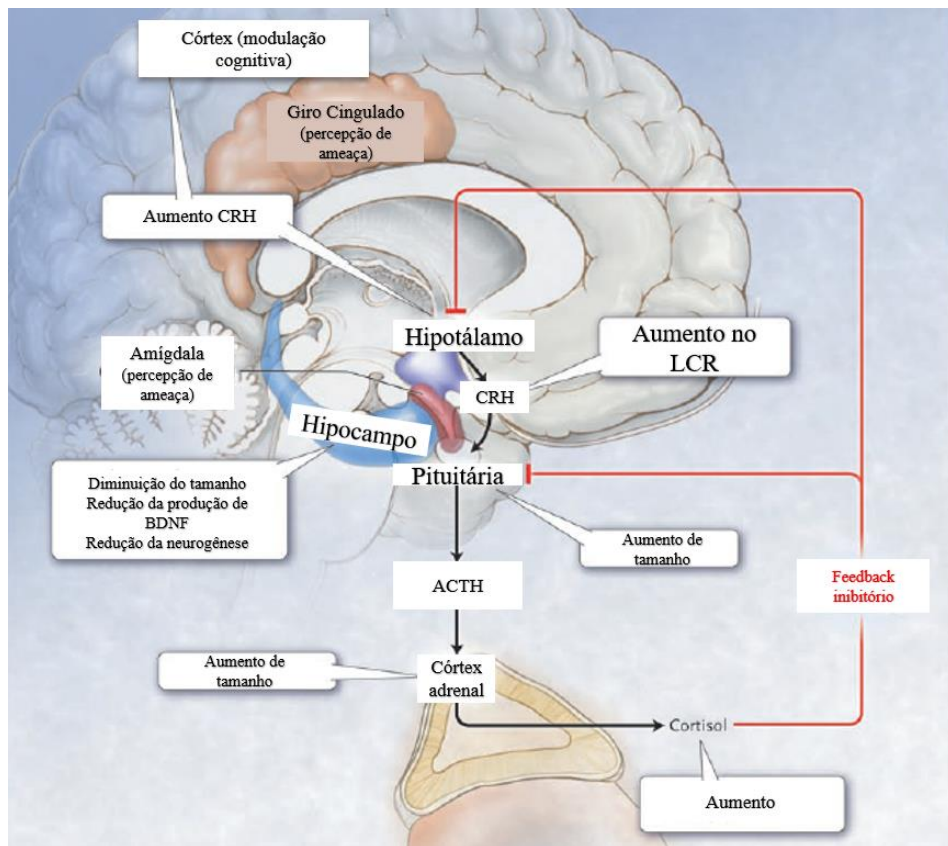
1.3 ESTRESSE E DEPRESSÃO

A depressão é comumente observada como um efeito colateral iatrogênico da administração crônica de corticosteroides (KRISHNAN; NESTLER, 2011). Nesse sentido, a resposta ao estresse mediada pela ativação do eixo HPA tem sido relacionada com a fisiopatologia da depressão e de outros transtornos do humor (KELLER et al., 2016). A hipótese da disfunção do eixo HPA como etiologia da depressão fundamenta-se em estudos que apontam uma íntima relação entre o comprometimento da retroalimentação inibitória do eixo HPA com a manifestação de quadros de depressão (BELMAKER; AGAM, 2008; DE KLOET; JOËLS; HOLSBOER, 2005). Por muito tempo sabe-se que pacientes depressivos possuem elevados níveis de glicocorticoides (cortisol) circulantes. Em 1957, Board e colaboradores relataram que o cortisol plasmático de pacientes depressivos é elevado se comparado a pacientes saudáveis (BOARD et al., 1957). Porém esse evento era

⁶ <https://www.jnj.com/fda-advisory-committee-recommends-approval-of-spravatm-esketamine-nasal-spray-ciii-for-adults-with-treatment-resistant-depression>

considerado um epifenômeno, onde o cortisol elevado seria devido a condição estressante que a depressão envolve (HOLSBOER, 2000). No entanto, Gibbons observou que o cortisol era especialmente elevado durante o estado depressivo (GIBBONS, 1964). De fato, o hipercortisolismo parece estar relacionado com o desenvolvimento de atrofia em regiões encefálicas importantes na regulação do humor (SAPOLSKY, 2000; 1996) e observa-se significativa diminuição no tamanho do hipocampo de pacientes que com transtorno depressivo maior (SHELIN et al., 1996; CAMPBELL; MACQUEEN, 2004).

Figura 4- Eixo HPA e depressão.



Legenda: A hipótese do eixo HPA da depressão postula que as anormalidades na resposta do cortisol ao estresse podem estar por trás da depressão. As setas pretas mostram que, em resposta ao estresse, que é percebido pelo córtex e pela amígdala e transmitido ao hipotálamo, o CRH é liberado, induzindo a glândula pituitária anterior a secretar o ACTH na corrente sanguínea. O ACTH estimula o córtex supra-renal a secretar o cortisol, o hormônio glicocorticóide. As linhas vermelhas mostram que o cortisol, por sua vez, induz a inibição do feedback no hipotálamo e na hipófise, suprimindo a produção de CRH e ACTH, respectivamente. Os achados em pacientes com depressão que sustentam a hipótese da disfunção do eixo HPA incluem: níveis de cortisol às vezes aumentam em depressão grave e tamanho da hipófise anterior e do

córtex adrenal é aumentado. O tamanho do hipocampo e o número de neurônios e glia estão diminuídos, possivelmente refletindo a redução da neurogênese devido a níveis elevados de cortisol ou devido à redução fator neurotrófico derivado do encéfalo (BDNF, *do inglês Brain Derived Neurotrophic Factor*). HPA: eixo Hipotálamo-Pituitário-Adrenal; CRH: hormônio liberador de corticotrofina; ACTH: hormônio adrenocorticotrófico; LCR: líquido cefalorraquidiano. Adaptado de Belmaker e Agam, 2008

A título de exemplo, o teste aprimorado por Heuser e colaboradores (1994), capaz de verificar a capacidade de retroalimentação inibitória do eixo HPA, é usado para monitoramento de doenças psiquiátricas. De fato, pacientes com depressão parecem possuir uma disfunção no mecanismo de retroalimentação inibitória do eixo HPA, ocasionando hipercortisolemia (DE KLOET; JOËLS; HOLSBOER, 2005). Ainda, a regulação da retroalimentação inibitória emerge como pré-requisito para melhora dos quadros depressivos, ao mesmo tempo que seu comprometimento enuncia prognóstico desfavorável e aumento de recidivas nesses pacientes (ZOBEL et al., 2001). Esforços já foram realizados na tentativa de amenizar os quadros depressivos com base na modulação hormonal relacionada aos glicocorticoides. Um ensaio clínico aberto demonstrou que um antagonista não peptídico do receptor (CRHr-1) reduziu os escores de depressão e ansiedade em pacientes com depressão, sem interferência do eixo HPA (ZOBEL et al., 2000). Porém, nenhum estudo controlado verificou esses achados. A falha em obter uma prova de conceito clara do mecanismo antagonista do CRHr-1 como ansiolítico ou antidepressivo em humanos, apesar de décadas de pesquisa, é uma grande decepção e frustração no campo, sugerindo a necessidade de avanços na área.

1.4 CORTICOSTERÓIDES E DISFUNÇÕES METABÓLICAS

Desde a década de 50 as drogas baseadas em corticosteroides foram introduzidas como estratégia terapêutica para o tratamento de doenças reumáticas e inflamatórias. Os corticosteroides sistêmicos (orais ou parenterais) (por exemplo, prednisona, metilprednisolona, dexametasona) possuem potentes propriedades anti-inflamatórias, imunomoduladoras e antineoplásicas e são essenciais para o tratamento de várias doenças, incluindo doenças autoimunes, reações alérgicas, exacerbações da asma, doenças crônicas e doença pulmonar obstrutiva (RICE et al., 2017). Desde a introdução das drogas com base em glicocorticoides ocorreu, notou-se a presença de significativos efeitos colaterais advindos de seu uso, especialmente dada a capacidade dos glicocorticoides de contrabalancear a ação da insulina e elevar os níveis de açúcar no sangue (RAFACHO et al., 2014). Eventos adversos bem conhecidos associados ao uso sistêmico de corticosteroides incluem osteoporose, doença cardiovascular, comprometimento da resposta imune e cicatrização de feridas, alterações no metabolismo glicêmico e lipídico e distúrbios psiquiátricos (LIU et al., 2013). A título de exemplo, a hipercostisolemia gerada pela Síndrome de Cushing, em geral devido a um tumor na pituitária, levam os pacientes a desenvolver, concomitantemente, disfunções metabólicas como obesidade, intolerância à glicose e resistência à insulina, aumento nas concentrações plasmáticas de colesterol, além de depressão (NEWELL-PRICE et al., 2006). Nestes casos, os glicocorticoides atuam como

hormônios diabetogênicos, uma vez que promovem aumento da produção hepática de glicose e diminuição da captação periférica em tecidos musculares e adiposos, por exemplo (SAINI, 2010). Ainda, observa-se perda muscular associada ao catabolismo proteico (SAVARY et al., 1998), alteração do perfil lipídico, (PECKETT; WRIGHT; RIDDELL, 2011) aumento nas concentrações plasmáticas de glicose e insulina (BARBERA et al., 2001) e aumento nas concentrações plasmática de proteínas totais, resultado do aumento da proteólise (SANTOS; RAFACHO; BOSQUEIRO, 2007). O aumento da insulina plasmática pode ser explicado parcialmente como resposta adaptativa das células beta-pancreáticas a eventos periféricos como a resistência à insulina desenvolvida na presença de concentrações elevadas de glicocorticóides (SANTOS; RAFACHO; BOSQUEIRO, 2007). A esse respeito, complicações metabólicas são frequentemente observadas em terapias que envolvem a administração de glicocorticoides em altas doses, o que resulta na desbalanço na homeostase da glicose, causando resistência à insulina e, em alguns casos, diabetes tipo 2 (BIGHETTI et al., 2014) e complicações psiquiátricas (NEWELL-PRICE et al., 2006).

1.5 COMPORTAMENTO DO TIPO DEPRESSIVO EM ROEDORES

Para avaliar a utilidade dos modelos animais em pesquisa foram propostos três tipos de critérios de validade: validade de face (ou aparente), validade de construto e validade preditiva. A validade de face (ou aparente) diz respeito ao quão próximo o modelo animal pode chegar na mimetização dos sintomas de uma condição clínica; a

validade de construto diz respeito ao quão bem o modelo consegue mimetizar as alterações fisiopatológicas da condição clínica e, por fim, a validade preditiva consiste na capacidade do teste em prever algum aspecto clínico de interesse do pesquisador, i.e., a partir dos dados obtidos no modelo, deve ser capaz de prever resultados clínicos. A abordagem da validade preditiva mais utilizada é a capacidade do modelo em detectar drogas potencialmente úteis na clínica (também chamado de isomorfismo farmacológico), isto é, modelo é capaz de responder à droga referência na clínica e não responder às demais drogas (ANDREATINI et al., In: ALMEIDA, 2006).

Em modelos animais, o fármaco dexametasona⁷ (corticoide sintético) e administração de corticosterona são estratégias frequentemente utilizadas para determinar modificações comportamentais induzidas pela alta concentração de corticosterona (SKUPIO et al., 2015; SIGWALT et al., 2011). De fato, a administração crônica (SKUPIO ET AL., 2015) e aguda (WRÓBEL et al., 2014) de dexametasona em camundongos resulta em comportamento do tipo depressivo, e.g., anedonia, sendo esta condição revertida pela administração de antidepressivos (KRISHNAN; NESTLER, 2011). Em roedores, os receptores mineralocorticoides possuem alta afinidade por corticosterona endógena, enquanto que os receptores de glicocorticoides possuem alta afinidade com corticosterona sintética, como a dexametasona (SUTANO; DE KLOET, 1987). A Tabela 2 demonstra a relação entre a dosagem do corticoide (sintético ou natural) e a duração

⁷ A dexametasona é um glicocorticoide sintético. Sua meia-vida plasmática é de 3 a 4,5 horas e a meia-vida tecidual (biológica) é de 36 a 54 horas. (Fonte: EMS farmacêutica)

do tratamento em diferentes estudos em roedores, reportando os efeitos metabólicos e comportamentais encontrados em cada estudo.

Tabela 2- Estudos pré-clínicos envolvendo administração de corticoides e avaliações metabólicas e/ou comportamentais em roedores.

AVALIAÇÕES COMPORTAMENTAIS								
Espécie/ Linhagem/ Sexo	Desenho Experimental I	TESTES COMPORTAMENTAIS					Peso*	Referência
		Suspensão pela Cauda*	Splash Teste*	Nado Forçado*	Preferência Sacarose*	Locomoção o Campo Aberto*		
Camundongos Swiss Machos	4, 16 ou 64 ug/kg em uma dose única ou 4 ou 16 ug/kg por 14 dias: Dexametasona (s.c)	Não avaliado (N/A)	N/A	Maior imobilidade na dose de 16 ug/kg por 14 dias e na dose única de 64 ug/kg	N/A	Sem diferença	N/A	Wróbel et al (2014)
Camundongos C57BL/6J Machos	4 mg/kg/dia por 21 dias Dexametasona (i.p)	N/A	N/A	Maior imobilidade	Menor preferência a Sacarina**	Sem diferença	Perdeu peso	Skupio et al (2015)

Camundongos C57BL/6 – Fêmeas e Camundongos Swiss-Fêmeas	20 mg/kg/dia por 21 dias Corticosterona (o.g.)	Maior imobilidade	Menor grooming	N/A	N/A	Sem diferença	N/A	Freitas et al (2016)
Camundongos Swiss Fêmeas	20 mg/kg/dia por 21 dias Corticosterona (o.g.)	Maior imobilidade	Menor grooming Maior Latência	N/A	N/A	Sem diferença	Não alterou	Rosa et al (2014)
Camundongos Swiss-Fêmeas	20 mg/kg/dia por 7, 14 e 21 dias Corticosterona (o.g.)	Maior imobilidade e apenas após 21 dias.	N/A	N/A	N/A	Sem diferença	N/A	Pazini et al (2016)
Camundongos C57BL/6 Machos	20 mg/kg/dia por 7, 21 e 35 dias Corticosterona (s.c)	Maior imobilidade e após 21 e 35 dias.	N/A	Maior imobilidade após de 21 e 35 dias.	N/A	N/A	Perda de peso nos 3 tempos	Zhao et al (2008)
Camundongos Swiss Machos	40 mg/kg/dia por 21 dias Corticosterona (s.c)	Maior imobilidade	N/A	Maior imobilidade	Menor preferência a sacarose	N/A	N/A	Ali et al (2015)

Ratos Wistar Machos	1.5 mg/kg/dia-- 21 dias sc Dexametasona (s.c)	N/A	N/A	Maior imobilidade	Menor preferência a sacarose	N/A	Perdeu peso	Sigwalt et al (2011)
METABÓLICOS								
Espécie/ Linhagem/ Sexo	Desenho Experimental	Níveis de Glicose*	Níveis Insulina*	Níveis Triglicerídeos *	Níveis Corticoesterona *	Peso*	Referência	
Camundongos ICR Machos	40 mg/kg/dia por 21 dias Corticoesterona (s.c)	Não alterou	Aumento	Aumentou	Aumentou	Perdeu peso	Shen et al (2016)	
Ratos Wistar Machos	0,1 mg/kg/dia por 10 dias (i.p) Dexametasona	Não alterou	Aumento	N/A	N/A	Perdeu peso	Bighetti et al (2014)	

Camundongos ICR Machos	40 mg/kg/dia por 21 dias Corticosterona (s.c)	Não alterou	Aumentou	Aumentou	Aumentou	Perdeu peso	Li et al (2016)
-------------------------------	--	-------------	----------	----------	----------	-------------	-----------------

*Dados estatisticamente significantes

Nesse sentido, acreditamos que o modelo de comportamento depressivo induzido pela administração de dexametasona satisfaz parcialmente os critérios de validade, uma vez que alguns sintomas vistos na clínica são mimetizados, como, por exemplo, anedonia (FREITAS et al., 2016). Não obstante, algumas alterações fisiológicas vistas na clínica são observadas nesse modelo. De acordo com a hipótese da disfunção do eixo HPA é possível supor validade parcial de construto e, por fim, drogas antidepressivas são capazes de reverter alguns sintomas, como, por exemplo, o tempo de imobilidade ou tempo de autolimpeza (ALI et al., 2015), sugerindo validade preditiva parcialmente respeitada.

No contexto do Transtorno Depressivo Maior, o número de opções de tratamento farmacológico é expressivo, no entanto todas apresentam limitações significativas. De acordo com Gumnick e Nemeroff (2000) um antidepressivo ideal deveria ter alta eficácia, agir rapidamente, ser seguro, simples de administrar e não apresentar efeitos colaterais importantes. Vê-se que, apesar da grande quantidade de drogas disponíveis, ainda não existe um antidepressivo que cumpra tais requisitos. Além do mais, nem todos os pacientes se beneficiam dos medicamentos existentes. Esses fatos têm justificado a realização de um número considerável de estudos com o intuito de desenvolver novas drogas antidepressivas que sejam eficazes e que não apresentem efeitos colaterais importantes.

Nos últimos três séculos, tem havido vários relatos e afirmações sobre os efeitos positivos da manipulação e conseqüente estimulação ambiental na função encefálica. O encéfalo dos mamíferos é constituído por programas genéticos e epigenéticos complexos que asseguram que a

maioria das células e áreas estruturais estejam definidas no nascimento. No entanto, a estimulação sensorial, cognitiva e motora, por meio da interação com o ambiente desde o nascimento até a velhice, tem um papel fundamental no refinamento do circuito neuronal necessário para a função encefálica normal (NITHIANANTHARAJAH; HANNAN, 2006). Modelos animais têm se mostrado cruciais na identificação de efeitos da manipulação do ambiente sobre parâmetros específicos de um organismo. Esses achados têm implicações nas terapias clínicas e abordagens relacionadas, constituindo uma ferramenta importante que permite dissecar a causa e o efeito de determinadas patologias, podendo elucidar potenciais alvos terapêuticos às mesmas.

1.6 ENRIQUECIMENTO AMBIENTAL

Durante o período vitoriano, o debate “*nature vs nurture*” ascendeu, defendido por Sir Francis Galton, que se inspirou nas obras de seu primo Charles Darwin. A questão central do debate era saber se os traços expressos de uma pessoa são produtos da hereditariedade (ou seja, genéticos) ou de suas próprias experiências (adquiridos). Galton, reforçado pelas teorias de Darwin sobre a heritabilidade, defendia o lado da “natureza”. O lado oposto do debate foi melhor definido séculos antes pelo termo “*tabula rasa*” emprestado de John Locke. O lado “*nurture*” do argumento foi reforçado no início dos anos 1900 pelas teorias de John Watson sobre o behaviorismo. À medida que a ciência evoluiu (particularmente o advento da genética), o debate “*nature vs nurture*” evoluiu para um debate “genes versus ambiente”, respectivamente. Por fim, os cientistas perceberam que os dois argumentos estavam corretos -

que o fenótipo expresso de uma pessoa era devido a uma interação de genes com o meio ambiente. Assim, nasceu a Teoria da Interação Gene/Ambiente. Em um sentido básico, o ambiente controla (até certo ponto) como os genes são expressos. Em animais, os estudos sobre o efeito do ambiente tiveram início com Rosenzweig, Renner, Bennett, Diamond e colaboradores, quando esse grupo usou o paradigma do enriquecimento ambiental para mostrar de forma convincente que o encéfalo adulto exibe plasticidade e que, assim como os músculos, os encéfalos ficam mais fortes com maior uso (DIAMOND 2001; RENNER; ROSENZWEIG, 1987; ROSENZWEIG; BENNETT, 1996).

O enriquecimento ambiental consiste em uma ferramenta experimental na qual os animais são expostos a um ambiente que fornece uma variedade de estímulos cognitivos, sensoriais e motores (VAN PRAAG; KEMPERMANN; GAGE, 2000). Primeiramente descrito, na esfera neurocientífica, pelo psicólogo canadense Donald Olding Hebb, no final da década de 1940 (HEBB, 1947), esse paradigma possibilita avaliar os efeitos da promoção de diversos tipos de estímulos diferentes sobre parâmetros específicos desejados. Muitos estudos têm mostrado que a exposição ao ambiente enriquecido promove benefícios fisiológicos, morfológicos, bem como alterações na plasticidade neuronal incluindo: aumento da arborização dendrítica, gliogênese, neurogênese, e modificações na expressão de genes ligados à plasticidade neuronal (VAN PRAAG; KEMPERMANN; GAGE, 2000). Em decorrência disso, a exposição ao ambiente enriquecido parece aumentar a expressão de BDNF (VAN PRAAG; KEMPERMANN; GAGE, 2000), fator que aparece diminuído em modelos animais com comportamento do tipo depressivo (O'KEEFE et

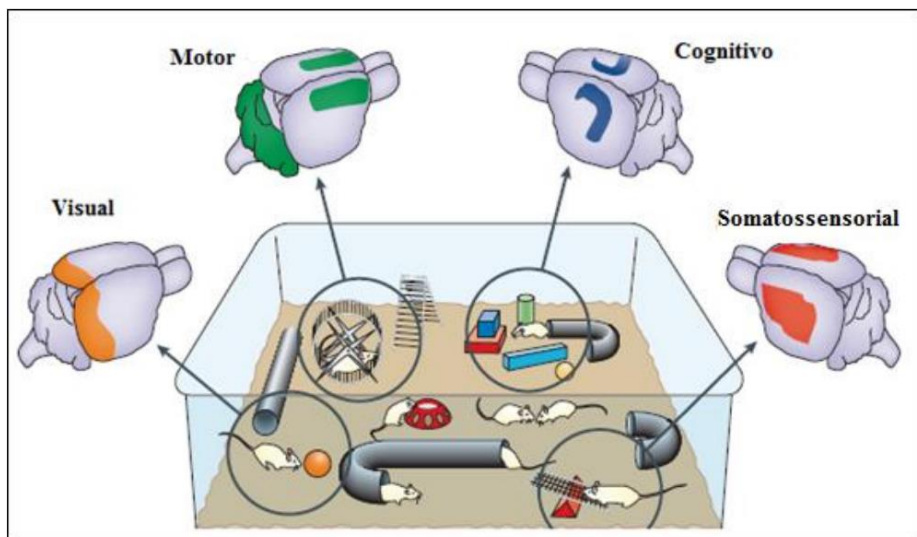
al., 2014). O enriquecimento ambiental atenua o estresse (LARSSON; WINBLAD; MOHAMMED, 2002), e comportamentos do tipo ansioso (FERNÁNDEZ TERUEL et al., 2002) e do tipo depressivo (BRENES; FONARGUERA, 2008), o que é atribuído ao oferecimento de exercício voluntário por meio de roda de correr, uma vez que o exercício físico possui efetivos efeitos ansiolíticos e antidepressivos (VAN PRAAG; KEMPERMANN; GAGE, 2000). Juntos, esses efeitos atenuam danos ao encéfalo (WILL et al., 2004), diminuindo a insurgência de doenças neurodegenerativas e déficits cognitivos (NITHIANANTHARAJAH; HANNAN, 2006). O paradigma do enriquecimento ambiental tem mostrado resultados divergentes em parâmetros de concentração de corticosterona em modelos animais de estresse crônico imprevisível (SIMPSON; KELLY, 2011). A concentração de corticosterona induzida por estresse ora se apresenta aumentada (MONCEK et al., 2004), ora diminuída (PENA et al., 2009). O que pode explicar parcialmente a diferença de efeito do enriquecimento ambiental sobre a concentração de corticosterona é a hipótese da Inoculação ao Estresse (CROFTON; ZHANG; GREEN, 2014).

O paradigma de enriquecimento ambiental é um modelo animal pré-clínico, não farmacológico e não-cirúrgico, útil para estudar várias condições psiquiátricas e neurológicas. A questão principal é como o enriquecimento ambiental pode produzir tais diferenças individuais robustas em uma ampla gama de comportamentos associados à dependência, depressão e ansiedade e efeitos benéficos, mesmo para modelos animais de doenças neurodegenerativas. Crofton, Zhang e Green (2014) debatem em um artigo de revisão que roedores

enriquecidos sofrem inoculação ao estresse⁸. Em suma, os autores sustentam que o estresse crônico leve de viver em um ambiente complexo e interagir de forma não agressiva com outros animais inocula os roedores contra estressores subsequentes, isto é, caracteriza-se pelo desenvolvimento de resistência a futuros eventos estressantes. Ao contrário de uma vacina, no entanto, a inoculação ao estresse não protege apenas contra uma única doença, mas permite que o animal em geral consiga lidar com uma variedade de estressores durante a vida. Por exemplo, indivíduos que enfrentaram com sucesso alguns eventos adversos na adolescência têm, em geral, melhor saúde mental e são mais capazes de lidar com doenças sérias, perda do cônjuge ou um acidente grave quando adultos (KHOSHABA; MADDI, 1999; LYONS et al., 2009; SEERY et al., 2013). Nesse sentido, a variação da concentração de corticosterona plasmática vista em animais expostos ao enriquecimento ambiental é compreensível (CROFTON; ZHANG; GREEN, 2014).

⁸ Inoculação é o termo usado para caracterizar o mecanismo de ação de uma vacina; a exposição de um indivíduo a uma versão não prejudicial de uma doença tem como fim desenvolver nesse indivíduo uma imunidade a essa doença no futuro.

Figura 5- Efeitos do enriquecimento ambiental no SNC.



Legenda: Ambiente enriquecido e os efeitos da estimulação visual, somatossensorial, motora e cognitiva em diferentes áreas do encéfalo.
 Fonte: Adaptado de Nithianantharajah e Hannan (2006).

Além disso, a variabilidade dos resultados pode advir das diversas formas interventivas com enriquecimento ambiental. O enriquecimento ambiental contém três componentes básicos: novidade, exercício físico e contato social. Em uma revisão, Simpson e Kelly (2011) comentam que os protocolos de enriquecimento ambiental empregados na literatura podem variar em várias frentes, dentre elas: (1) o tamanho das gaiolas enriquecidas e o número de animais que elas abrigam; (2) os tipos de objetos de enriquecimento usados; (3) idade dos animais no início do enriquecimento ambiental; (4) a duração do alojamento; (5) os tipos de controles empregados; (6) a linhagem de roedor usada e (7) o sexo do roedor usado. Tal diversidade torna difícil padronizar uma intervenção com o enriquecimento ambiental em

laboratório, dificultando a reprodutibilidade de dados (SIMPSON; KELLY, 2011).

2. JUSTIFICATIVA

Atualmente os principais transtornos mentais são responsáveis por aproximadamente 32,4% dos Anos Vividos com Incapacidade e 13% da Esperança de Vida Corrigida pela Incapacidade (EVCI) no mundo, números que se assemelham às doenças cardiovasculares e superam o câncer (VIGO; THORNICROFT; ATUN, 2016). O aumento na prevalência da depressão e a baixa responsividade dos pacientes aos fármacos convencionais a torna um dos transtornos mais maléficos na atualidade (BERTON; NESTLER, 2006; BELMAKER; AGAM, 2008). A título de exemplo, o número total de pessoas convivendo com depressão aumentou 18,4% de 2005 a 2015 (VOS et al., 2016) e estima-se que 322 milhões de pessoas conviviam com a depressão em 2017, gerando um custo de aproximadamente 1 trilhão de dólares por ano (World Health Organization, 2017). Não obstante, os transtornos de estresse são um problema crítico de saúde pública com resultados potencialmente prejudiciais que têm um impacto significativo sobre aqueles que vivem com esses transtornos, o sistema de saúde e a sociedade (GRADUS, 2017). Isso, somado ao fato de que poucos fármacos neuropsiquiátricos obtiveram aprovação se comparados a outras áreas (HYMAN, 2013), faz com que novas estratégias terapêuticas sejam testadas. Por exemplo, estudos epidemiológicos sobre distúrbios neurológicos e psiquiátricos, incluindo estudos envolvendo gêmeos monozigóticos, demonstraram e evidenciaram pistas

importantes sobre a relevante contribuição de fatores ambientais no desenvolvimento de patologias (MAYEUX, 2003). Com isso em mente, o presente trabalho se propôs, primeiramente, em padronizar um modelo de administração crônica de dexametasona em camundongos machos e fêmeas, visto a diferença epidemiológica da prevalência de depressão em ambos os gêneros em humanos, com a observação de alterações metabólicas e comportamentais, i.e, comportamento do tipo depressivo e ansioso decorrentes dessas administrações. Posteriormente, verificou-se os efeitos protetores da concomitante exposição dos animais ao paradigma do enriquecimento ambiental como forma de estratégia terapêutica não farmacológica.

3. HIPÓTESE

A hipótese do presente trabalho é de que o enriquecimento ambiental é capaz de atenuar os prejuízos metabólicos e comportamentais induzidos pela administração crônica de dexametasona em camundongos.

4. OBJETIVOS

4.1 OBJETIVO GERAL:

Caracterizar, em camundongos Swiss machos e fêmeas, as alterações metabólicas, comportamentais e neuroquímicas induzidas pela administração crônica de dexametasona e avaliar o impacto da concomitante exposição dos animais ao enriquecimento ambiental.

4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS:

Avaliação de parâmetros metabólicos:

- a) Acompanhamento diário das alterações da massa corporal;
- b) Avaliação da ação da insulina, por meio do teste de tolerância à glicose;
- c) Mensuração dos níveis plasmáticos de triacilgliceróis, colesterol, proteínas totais e corticosterona de jejum.

Avaliação de parâmetros comportamentais:

- a) Comportamento exploratório e emocional no Labirinto em Cruz Elevado;

- b) Avaliação de autocuidado e comportamento motivacional no Teste de Borrifagem de Sacarose;
- c) Avaliação do comportamento do tipo depressivo no Teste de Suspensão Pela Cauda;
- d) Locomoção e comportamento emocional no Teste do Campo Aberto;

5. MATERIAL E MÉTODOS

5.1 ANIMAIS

Foram utilizados um total de 76 camundongos Swiss machos e fêmeas com dois meses de idade ao início dos protocolos, provenientes do Biotério Central da Universidade Federal de Santa Catarina. Desse total, 36 foram utilizados para padronizar um modelo de administração e outros 40 para avaliar os efeitos da concomitante exposição desses animais tratados com dexametasona ao ambiente enriquecido. Inicialmente os animais foram alojados em gaiolas coletivas com 10 animais cada, mantidos em um ambiente de temperatura controlada entre 22 a 24 graus, de acordo recomendações do Guia Brasileiro de Criação e Utilização de Animais para Atividades de Ensino e Pesquisa Científica do CONCEA (Resolução Normativa 13, 2013). Todos os animais tiveram livre acesso à água e comida. O ciclo de luminosidade claro/escuro foi de 12h, iniciando o ciclo claro às 6h da manhã. Todos os procedimentos utilizados no presente estudo foram previamente submetidos e aprovados pelo Comitê de Ética para o uso de Animais (CEUA/UFSC), de acordo com a Lei Federal 11.794 de 2008, sob o número 5497310718.

5.2 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL

Em todos os delineamentos experimentais, onde constar a administração de fármacos e/ou drogas por meio da via intraperitoneal (i.p.), um volume de administração de 0,1 mL por 10 gramas de peso corporal dos animais foi respeitado. Ressalta-se que os delineamentos experimentais aqui propostos não envolveram procedimentos cirúrgicos e apresentam baixo grau de invasividade. Os animais foram monitorados

em suas gaiolas-moradia diariamente e, na presença de sinais clínicos indicativos de dor ou estresse (e.g., ambulação prejudicada não permitindo aos animais acesso à comida e água; excessiva perda de peso; prolongada dificuldade de se manter na posição vertical, dentre outros sinais indicativos de um estado moribundo), os animais foram imediatamente excluídos do estudo sendo realizada a eutanásia destes (*humane endpoint*), de acordo com Stokes (2002). Neste caso, os animais foram eutanasiados por meio de administração de dose excessiva de uma mistura dos anestésicos cetamina (150 mg/kg; i.p.) e xilazina (30 mg/kg; i.p.). A análise dos parâmetros de eutanásia humanitária teve como base o documento ENV/JM/MONO(2000)7 da OECD “*GUIDANCE DOCUMENT ON THE RECOGNITION, ASSESSMENT, AND USE OF CLINICAL SIGNS AS HUMANE ENDPOINTS FOR EXPERIMENTAL ANIMALS USED IN SAFETY EVALUATION*”.

5.2.1 Desenho experimental i- Padronização do protocolo

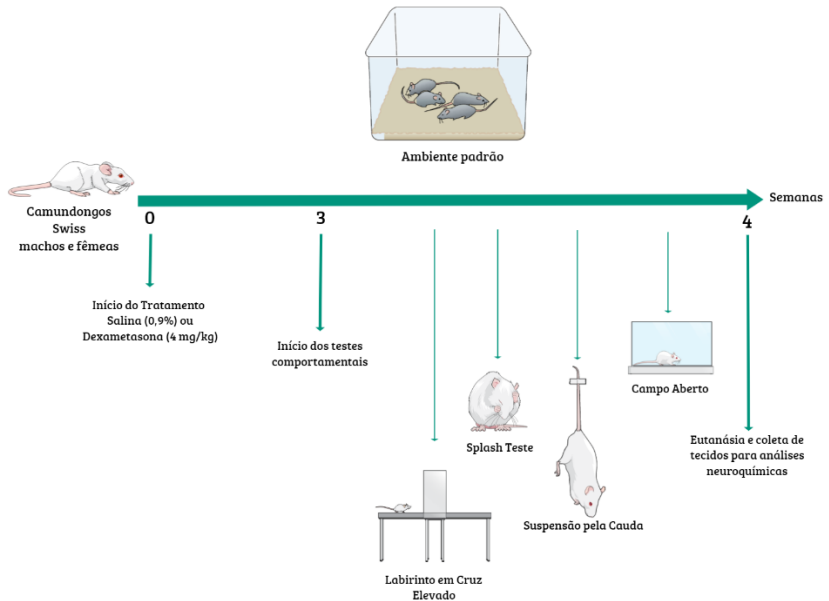
Camundongos adultos machos e fêmeas da linhagem *Swiss*, com dois meses de idade ao início dos experimentos, foram divididos em 4 grupos experimentais, conforme a Tabela 3. Os animais receberam, diariamente, por 21 dias, solução salina (NaCl 0,9%) ou dexametasona (4 mg/kg), conforme Skupio e colaboradores (2015), por meio da via i.p. Ao dia 17, ainda sobre influência dos tratamentos acima mencionados, os animais foram submetidos a uma bateria de testes comportamentais, composta pelos testes do labirinto em cruz elevado (dia 17), teste da borrifagem de sacarose (dia 18), teste da suspensão pela cauda (dia 19), e teste do campo aberto (dia 20). Um dia após o último teste

comportamental, os animais, em jejum calórico de seis horas, foram submetidos ao Teste de Tolerância a Glicose (dia 21). Um dia depois, os animais, em jejum calórico de seis horas, foram anestesiados com uma mistura de cetamina (80 mg/kg; i.p.) e xilazina (10 mg/kg; i.p.) e o sangue foi coletado por punção cardíaca para a determinação das concentrações plasmáticas de triacilgliceróis, colesterol e proteínas totais (Figura 6).

Tabela 3- Divisão dos grupos experimentais da padronização do modelo experimental.

Grupo	Gênero	Tratamento	Número de Animais
I	Macho	Salina	09
II	Macho	Dexametasona	09
III	Fêmea	Salina	09
IV	Fêmea	Dexametasona	09

Figura 6- Desenho experimental da padronização do modelo experimental.



Legenda: Os animais com dois meses de idade ao início dos experimentos receberam, por via intraperitoneal (i.p.), por 21 dias, dexametasona na concentração de 4 mg/kg no início da manhã (8:00 am). No dia 17 iniciou-se uma bateria de testes comportamentais compostas pelo teste do Labirinto em Cruz Elevado (dia 17), Teste de Borrifagem de Sacarose (dia 18), Teste de Suspensão pela Cauda (dia 19), teste do Campo Aberto (dia 20) e teste de tolerância a glicose (dia 21). No dia 22 os animais foram eutanasiados e o sangue foi coletado por punção cardíaca para posterior análise.

5.2.2 Desenho experimental II – Efeito da exposição ao enriquecimento ambiental

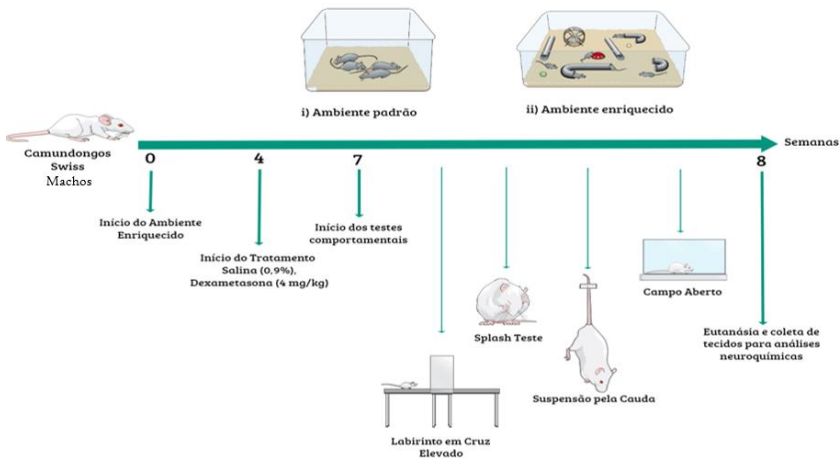
Camundongos adultos machos da linhagem *Swiss*, com dois meses de idade ao início dos experimentos, foram divididos em 4 grupos experimentais, conforme a Tabela 4. Os animais foram alojados em dois

ambientes diferentes: i- Ambiente Padrão ou ii- Ambiente Enriquecido por quatro semanas. Findando esse período, os animais receberam, diariamente, por 21 dias, permanecendo nos respectivos ambientes, solução salina (NaCl 0,9%) ou dexametasona (4 mg/kg) por meio da via i.p. Ao dia 17 do tratamento com dexametasona, ainda em seus respectivos ambientes e sob influência dos tratamentos, os animais foram submetidos à uma bateria de testes comportamentais, composta pelos testes do labirinto em cruz elevado (dia 17), teste da borrifagem de sacarose (dia 18), teste da suspensão pela cauda (dia 19), e teste do campo aberto (dia 20). Um dia após o último teste comportamental, os animais, em jejum calórico de seis horas, foram submetidos ao Teste de Tolerância a Glicose (dia 21). Um dia depois, os animais, em jejum calórico de seis horas, foram anestesiados com uma mistura de cetamina (80 mg/kg; i.p.) e xilazina (10 mg/kg; i.p.) e o sangue foi coletado por punção cardíaca para a determinação das concentrações plasmáticas de triacilgliceróis, colesterol, proteínas totais e corticosterona em jejum (Figura 7).

Tabela 4- Divisão dos Grupos Experimentais.

Grupo	Gênero	Tratamento	Ambiente	Número de Animais
I	Macho	Salina	Padrão	10
II	Macho	Dexametasona	Padrão	10
IV	Macho	Salina	Enriquecido	10
V	Macho	Dexametasona	Enriquecido	10

Figura 7- Desenho experimental da intervenção com Ambiente Enriquecido.



Legenda: Os animais com dois meses de idade ao início dos experimentos foram expostos, na semana 0, ao Ambiente Padrão ou ao Ambiente Enriquecido. Após quadro semanas de exposição, os animais receberam, por via i.p, por 21 dias, dexametasona na concentração de 4 mg/kg no início da manhã ou salina na concentração de 0,9%. No dia 17 iniciou-se uma bateria de testes comportamentais compostas pelo teste do Labirinto em Cruz Elevado (dia 17), Teste de Borrifagem de Sacarose (dia 18), Teste de Suspensão pela Cauda (dia 19), teste do Campo Aberto (dia 20) e teste de tolerância a glicose (dia 21). No dia 22 os animais foram eutanasiados e o sangue foi coletado por punção cardíaca para posterior análise.

5.2.3 Ambiente Enriquecido

O ambiente enriquecido consistiu de uma gaiola plástica maior que o ambiente padrão (45 cm x 30 cm x 13 cm), contendo uma variedade de estímulos sensoriais, como, por exemplo: uma roda de correr, um túnel contorcido, escadas, chocalhos e brinquedos com bolas de diversas cores e texturas. Estes objetos foram lavados e suas posições e conformações foram trocadas de lugar mudando a configuração

espacial do ambiente enriquecido e a composição dos objetos duas vezes por semana.

5.3 TESTES COMPORTAMENTAIS

5.3.1 Teste do Labirinto em Cruz Elevado (LCE)

Relevância do modelo: Este modelo baseia-se no conhecimento de que roedores evitam locais abertos e elevados. Quando neles confinados, mostram sinais de medo – congelamento, defecação e micção – e aumento da concentração plasmática de corticosterona. O roedor explora ambos os braços, abertos e fechados, mas tipicamente entrará com maior frequência e permanecerá por mais tempo nos braços fechados. Uma maior intensidade de “ansiedade” equivale a menor preferência por braços abertos. Este teste representa um importante instrumento de pesquisa na área experimental para estudos de comportamentos relacionados à ansiedade, em especial na análise do efeito farmacológico de novas drogas (LISTER, 1987).

Protocolo Experimental: O aparato para camundongos, feito de acrílico transparente, consiste de dois braços abertos (18 x 6 cm), opostos a dois braços fechados (18 x 6 x 6 cm), elevados 60 cm acima do chão. A área de junção dos quatro braços (plataforma central) mede 6 x 6 cm. Cada animal foi individualmente colocado na plataforma central de frente para o um braço fechado e foram observados durante um período de 5 min. Foram analisados os seguintes parâmetros: o número de entradas nos braços abertos e nos braços fechados, o tempo de permanência nos braços abertos e nos braços fechados (foi considerada uma entrada quando as quatro patas do animal estiverem no interior do

braço). Estes dados foram utilizados para calcular a porcentagem de entradas nos braços abertos [%EA= entradas nos braços abertos / (entrada nos braços abertos + entradas nos braços fechados)]; porcentagem de permanência nos braços abertos [%TA: tempo nos braços abertos / (tempo nos braços abertos + tempo nos braços fechados)]. Além disso, foi utilizado o número total de entradas nos braços fechados como uma medida de locomoção.

5.3.2 Teste de Borrifagem de Sacarose (TBS)

Relevância do modelo: Este teste seguiu o protocolo descrito por Isingrini et al., (2010), com modificações.

Protocolo experimental: Trata-se de borrifar 1mL de solução contendo 10% de sacarose no dorso do animal, que esteve disposto, individualmente, em uma caixa acrílica (30 x 30 x 20 cm). Devido à sua viscosidade, a solução de sacarose suja o pelo do animal, induzindo um comportamento de autolimpeza (*grooming*) do mesmo. Depois de aplicar a solução de sacarose, a frequência (duração) e a latência para o início do comportamento de autolimpeza foram observadas por 5 min. O aparato foi limpo com uma solução de etanol 20% entre os testes, afim de eliminar pistas olfativas aos animais.

5.3.3 Teste da Suspensão Pela Cauda (TSC)

Relevância do modelo: O diagnóstico clínico da depressão requer a presença de diversos sintomas centrais (e.g., humor deprimido, prazer diminuído) normalmente acompanhados de sintomas variados como irritabilidade, mudanças de peso, distúrbios no sono, sentimento de culpa, baixa concentração, pensamentos de morte, suicídio, etc. De

modo claro, não é possível reproduzir em animais todos os sintomas observados clinicamente. Neste sentido, medidas relacionadas à resignação (comumente denominado “desamparo aprendido”) são utilizadas como o principal parâmetro comportamental nos testes de *screening* de atividade antidepressiva em camundongos, como o teste da suspensão pela cauda. O teste da suspensão pela cauda foi desenvolvido por Steru e colaboradores (1985) baseado na premissa que um animal submetido a uma situação estressante e inescapável apresenta dois tipos de comportamentos alternados, a agitação, característica da tentativa de escape da situação de estresse, e a imobilidade. Este padrão de comportamento também pode ser chamado de “*searching-behavior*”, caracterizado pela alternância de intensa atividade motora e gasto de energia com a imobilidade (STERU et al., 1985). Neste sentido, fármacos antidepressivos comumente utilizados na clínica são capazes de reduzir o tempo de imobilidade de animais submetidos ao teste da suspensão pela cauda (STERU et al., 1985; CRYAN; MOMBÉREAU; VASSOUT, 2005).

Protocolo experimental: Os animais foram colocados em uma sala onde foram suspensos à 30 cm acima do chão por meio de uma fita adesiva presa na ponta da cauda e em uma superfície plana. É importante ressaltar que os animais não tiveram acesso a nenhuma parede ou compartimento que pudesse favorecer a subida. O teste foi registrado, com o auxílio de uma câmera de vídeo, durante um período de 6 min. O tempo de imobilidade foi analisado de forma que foram considerados imóveis os animais que não apresentaram movimentos ativos ou qualquer movimento corporal. Foram observados o tempo para a primeira imobilidade (latência) e o tempo total de imobilidade.

5.3.4 Teste do Campo Aberto (TCA)

Relevância do modelo: Este modelo é empregado para avaliar a atividade exploratória dos animais. A tendência natural do animal em um ambiente novo é a de explorá-lo, apesar do estresse e do conflito provocado pelo ambiente novo (PRUT E BELZUNG, 2003). Esse parâmetro comportamental permite uma mensuração do nível de excitabilidade do sistema nervoso central e, assim, a avaliação da atividade locomotora espontânea de roedores tem sido utilizada para analisar o putativo efeito de drogas sobre o sistema nervoso central, sendo que agentes que suprimem a atividade locomotora podem/devem apresentar ação/propriedades sedativas e agentes que aumentam a atividade locomotora podem/devem apresentar propriedades estimulantes (ARCHER, 1973). Por exemplo, a atividade exploratória de roedores é influenciada por neurolépticos (e.g., haloperidol) ou benzodiazepínicos, que agem como sedativos.

Protocolo Experimental: Neste paradigma permite-se aos animais livre exploração por uma caixa de 50 cm x 50 cm x 40 cm de volume. O tempo de exploração foi de 5 minutos por animal. Foram avaliados os seguintes parâmetros comportamentais: % de cruzamentos no centro, número total de cruzamentos e tempo no centro (PRUT; BELZUNG, 2003).

5.4 ANÁLISES BIOQUÍMICAS

Determinação de lipídeos plasmáticos e glicose: a quantificação do colesterol total (CT), triglicerídeos e proteínas totais no plasma dos

camundongos foi realizada utilizando reagentes comerciais (Gold Analisa, Belo Horizonte, MG, Brasil), seguindo as especificações do fabricante. Os resultados são expressos em mg/dl. A dosagem de corticosterona foi feita utilizando o kit de Ensaio de imunoabsorção enzimática (ELISA). O teste foi terceirizado com o laboratório Citovet-Laboratório Veterinário, localizado em Florianópolis, SC, Brasil. A absorbância foi medida em $k = 450$ nm usando um espectrofotômetro. A concentração de CORT foi então calculada a partir da curva padrão apropriada e expressa em ng/mL de soro. Os ensaios de tolerância à glicose foram efetuados por aplicações via i.p. de glicose na concentração de 2g/kg de peso corporal. A concentração de glicose no sangue periférico foi aferida com glicosímetro (Accu-Chek Performa®) antes da aplicação i.p. (basal) e nos tempos 15, 30, 60 e 120min após a aplicação.

5.5 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os resultados são apresentados como a média + erro padrão da média (EPM). As diferenças estatísticas entre os grupos experimentais dos ensaios da padronização foram detectadas com Teste “t” de student não pareado, comparando os efeitos do tratamento com dexametasona separadamente para cada sexo. Para comparar dois ou mais grupos, juntamente com demais variáveis (ambiente e tratamento), ANOVA de duas vias, seguida pelo pós-teste de “Newman Keuls” foi utilizado. Valores de P menores que 0,05 (*P < 0,05) foram considerados como indicativos de significância.

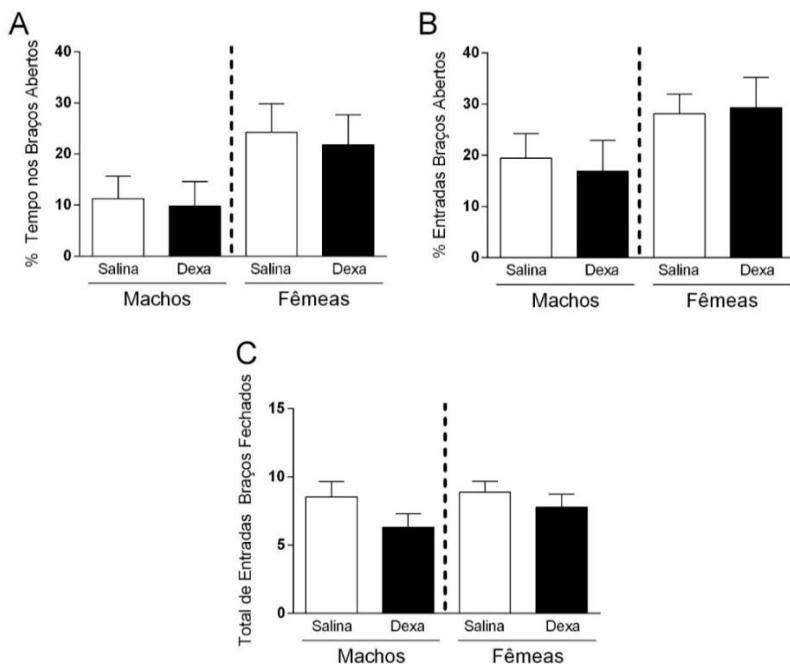
6. RESULTADOS

6.1 RESULTADOS DA PADRONIZAÇÃO DO MODELO

6.1.1 Efeito da administração de dexametasona sobre parâmetros de exploração e emocionalidade no Labirinto em Cruz Elevado em camundongos machos e fêmeas.

Para avaliar os efeitos da administração de dexametasona em parâmetros de comportamento exploratório e emocional, os camundongos foram tratados, por 17 dias, com dexametasona (4mg/kg) ou NaCl (0,9%), e submetidos ao LCE, e os parâmetros analisados foram: % tempo braço aberto, % entradas braço aberto e total de entradas nos braços fechados. O teste t não mostrou diferenças significativas em nenhum dos parâmetros analisados (**Fig. 8**). Tais dados indicam que, no paradigma do LCE, a administração de dexametasona não resultou em diferenças significativas nos parâmetros analisados tanto em machos como em fêmeas.

Figura 8- Efeitos do tratamento com dexametasona no LCE em camundongos machos e fêmeas.



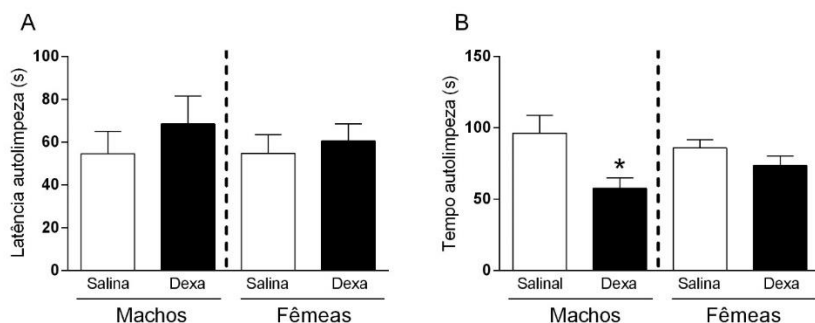
Legenda: Efeitos da administração de dexametasona (4 mg/kg, i.p.) ou salina (NaCl 0, 9% i.p.) sobre parâmetros de comportamento do tipo-ansioso. Os dados são apresentados como média + E.P.M. (n= 9 animais) e os resultados foram analisados com teste t simples para cada sexo.

6.1.2 Efeito da administração de dexametasona sobre parâmetros de emocionalidade no Teste da Borrifagem de Sacarose em camundongos machos e fêmeas.

Para avaliar os efeitos da administração de dexametasona no comportamento do tipo-anedônico, os camundongos foram tratados, por 18 dias, com dexametasona (4mg/kg) ou NaCl (0,9%) e foram submetidos ao TBS, e os parâmetros analisados foram: latência para a

primeira autolimpeza e tempo de autolimpeza. O teste t identificou efeito significativo do tratamento no tempo de autolimpeza dos machos [$t=2,699$ $df=16$, $P < 0,05$] (**Fig. 9 B**). Esses dados indicam que a dexametasona aumentou o comportamento do tipo-anedônico nos machos tratados com dexametasona, visto o aumento no tempo de autolimpeza desses animais. Nenhum outro parâmetro analisado apresentou alteração.

Figura 9- Efeitos do tratamento de dexametasona no Teste de Borrifagem de Sacarose em camundongos machos e fêmeas.



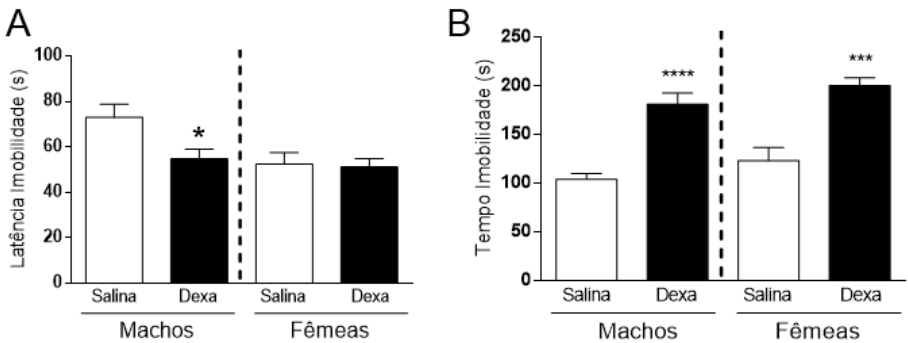
Legenda: Efeitos da administração de dexametasona (4 mg/kg, i.p) ou salina (NaCl 0, 9% i.p.). Os dados são apresentados como média + E.P.M. (n= 9 animais) e os resultados foram analisados com teste t simples para cada sexo. * $p < 0,05$ comparados com o mesmo sexo.

6.1.3 Efeito da administração de dexametasona sobre parâmetros de emocionalidade no Teste da Suspensão Pela Cauda em camundongos machos e fêmeas.

Para avaliar os efeitos da administração de dexametasona no comportamento do tipo-depressivo, os camundongos foram tratados, por 19 dias, com dexametasona (4mg/kg) ou NaCl (0,9%) e foram submetidos ao TSC, e os parâmetros analisados foram: latência para

imobilidade e tempo de imobilidade. O teste t identificou efeito significativo do tratamento na latência para imobilidade [$t=2,538$ $df=16$, $P<0,05$] (**Fig. 10 A**) e tempo de imobilidade [$t=5,984$ $df=16$, $P<0,0001$] (**Fig. 10 B**) nos machos e efeito significativo no tempo de imobilidade das fêmeas [$t=4,831$ $df=15$, $P=0,0002$] (**Fig. 10 B**). Esses resultados indicam que o tratamento com dexametasona resultou na manifestação de comportamento do tipo-depressivo em camundongos machos e fêmeas, porém, nos machos, a latência para imobilidade foi significativamente menor quando comparado ao seu controle, o que não se viu nas fêmeas.

Figura 10- Efeito do tratamento com dexametasona no TSC em camundongos machos e fêmeas.

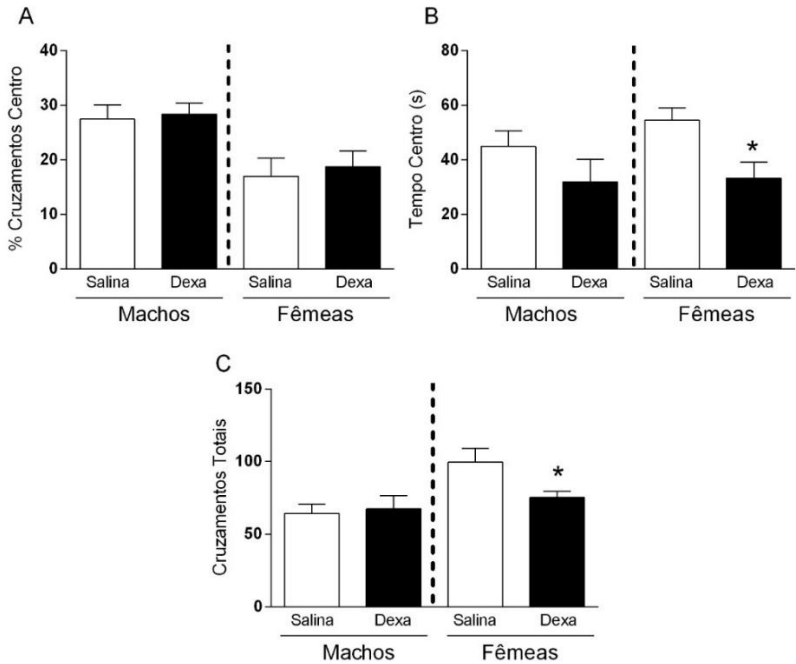


Legenda: Efeitos da administração de dexametasona (4 mg/kg, i.p.) ou salina (NaCl 0, 9% i.p.). Os dados são apresentados como média + E.P.M. (n= 8-9 animais) e os resultados foram analisados com teste t simples para cada sexo. * $p<0,05$; *** $p=0,0002$; **** $p<0,0001$. Todos os grupos foram comparados com seu mesmo sexo.

6.1.4 Efeito da administração de dexametasona sobre parâmetros de emocionalidade e locomoção no Teste do Campo Aberto em camundongos machos e fêmeas.

Para avaliar os efeitos da administração de dexametasona sobre parâmetros de emocionalidade e locomoção, os camundongos foram tratados, por 20 dias, com dexametasona (4mg/kg) ou NaCl (0,9%) e foram submetidos ao TCA e os parâmetros analisados foram: porcentagem de cruzamentos no centro, tempo no centro e cruzamentos totais. O teste t identificou efeito significativo do tratamento no tempo no centro [$t=2,946$ $df=15$, $P < 0,05$] (**Fig. 11 B**) e nos cruzamentos totais [$t=2,215$ $df=15$, $P < 0,05$] (**Fig. 11 C**) das fêmeas. Frente aos resultados, percebe-se que o tratamento com dexametasona alterou o tempo no centro nas fêmeas tratadas com dexametasona, que pode ser interpretado como comportamento do tipo-ansioso, bem como observa-se diminuição nos cruzamentos totais nesses mesmos animais, indicando hipolocomoção.

Figura 11- Efeitos do tratamento com dexametasona no Teste do Campo Aberto.



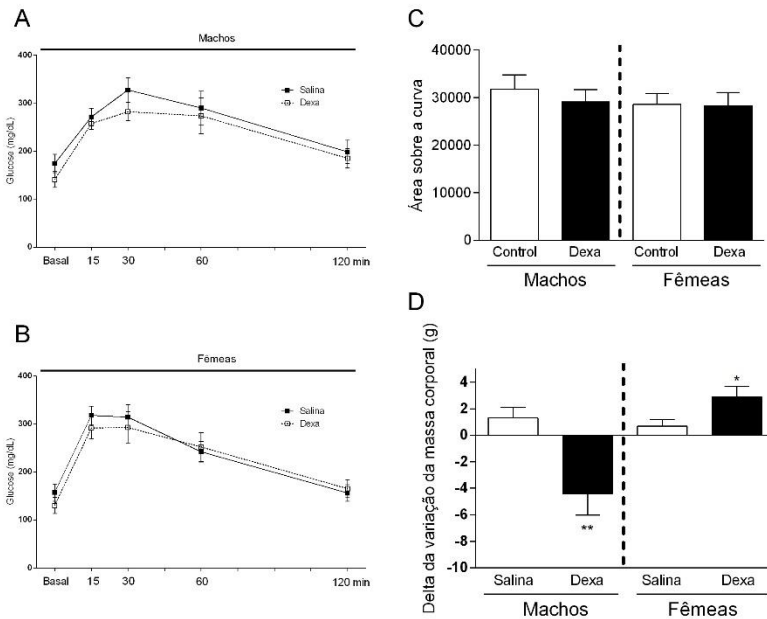
Legenda: Efeitos da administração de dexametasona (4 mg/kg, i.p) ou salina (NaCl 0, 9% i.p.). Os dados são apresentados como média + E.P.M. (n= 8-9 animais) e os resultados foram analisados com teste t simples para cada sexo. * $p < 0,05$ comparados com seu mesmo sexo.

6.1.5 Efeito da administração de dexametasona sobre parâmetros metabólicos em camundongos machos e fêmeas.

Para avaliar os efeitos da administração de dexametasona sobre parâmetros metabólicos, os camundongos foram tratados, por 21 dias, com dexametasona (4mg/kg) ou NaCl (0,9%) e foram submetidos, após seis horas de jejum calórico, ao Teste da Tolerância à Glicose. Os

resultados estatísticos não demonstraram diferenças significativas na análise de ponto a ponto nem na área sobre a curva (**Fig. 12 C**). Observou-se significativa perda de peso nos machos [$t=3,151$ $df=18$, $P=0,005$] e ganho de peso nas fêmeas [$t=2,400$ $df=17$, $P< 0,05$] (**Fig. 12 D**).

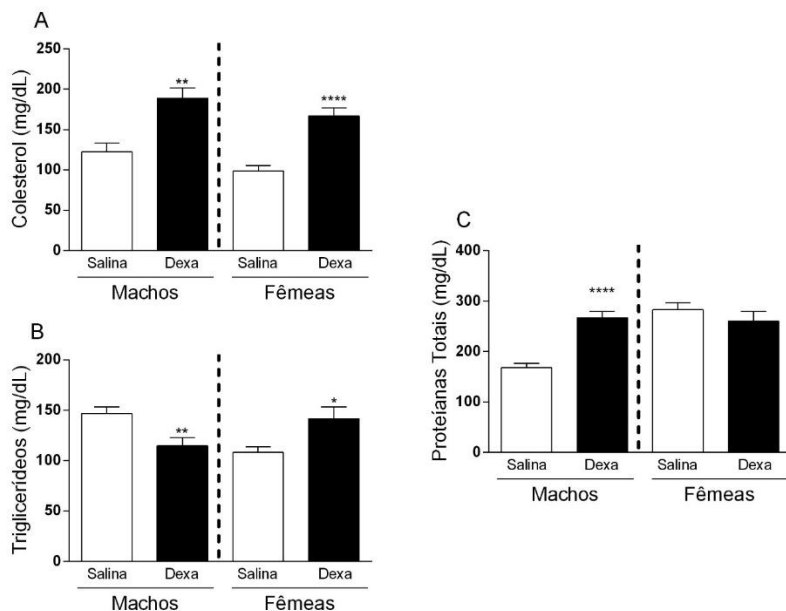
Figura 12- Efeitos do tratamento com dexametasona sobre parâmetros metabólicos em camundongos machos e fêmeas.



Legenda: Efeitos da administração de dexametasona (4 mg/kg, i.p) ou salina (NaCl 0, 9% i.p.) sobre parâmetros relacionados à glicose. Os dados são apresentados como média + E.P.M. (n= 8-9 animais) e os resultados foram analisados com teste t simples para cada sexo. * $p<0,05$ e ** $p=0,005$, comparados com mesmo sexo.

No dia 22, os animais, em jejum calórico de seis horas, foram anestesiados e tiveram o sangue coletado por punção cardíaca para análise dos níveis de triglicerídeos, colesterol e proteínas totais. Os resultados mostram aumentos significativos nas concentrações de colesterol plasmático nos machos [$t=3,946$ $df=16$, $P= 0,0012$] e nas fêmeas [$t=5,571$ $df=16$, $P< 0,0001$] (**Fig. 13 A**) tratados com dexametasona. Quanto as concentrações de triglicerídeos, observou-se uma diminuição significativa nos machos tratados com dexametasona [$t=2,986$ $df=16$, $P= 0,0087$] e um aumento significativo nas fêmeas tratadas com dexametasona [$t=2,543$ $df=16$, $P= 0,0217$] (**Fig. 13 B**). As concentrações plasmáticas de proteínas totais sofreram alterações apenas nos machos tratados com dexametasona, onde observou-se aumento nas concentrações [$t=6,359$ $df=16$, $P<0,0001$] (**Fig. 13 C**).

Figura 13- Efeitos da administração de dexametasona sobre parâmetros plasmáticos de camundongos machos e fêmeas.



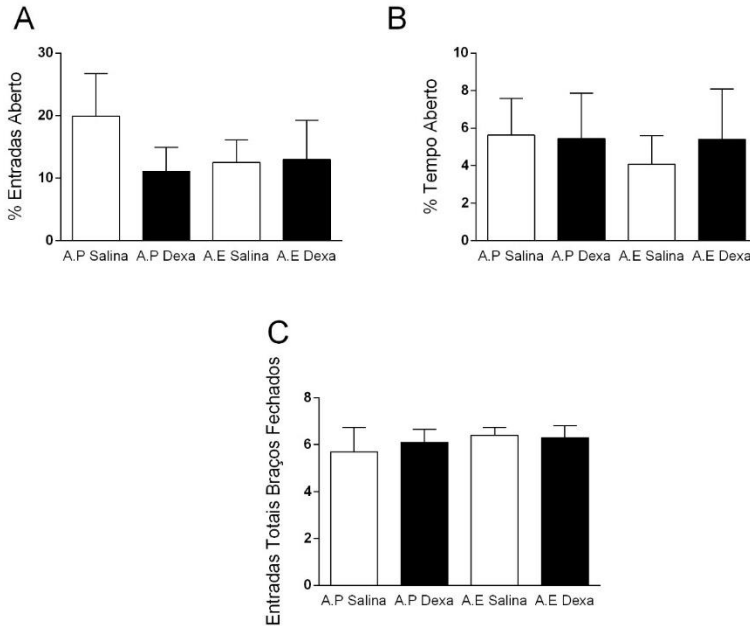
Legenda: Efeitos da administração de dexametasona (4 mg/kg, i.p) ou salina (NaCl 0, 9% i.p.) em concentrações plasmáticas de colesterol (A), triglicerídeos (B) e proteínas totais (C). Os dados são apresentados como média + E.P.M. (n= 8-9 animais) e os resultados foram analisados com teste t simples para cada sexo. * $p < 0,05$; ** $p < 0,0015$; **** $p < 0,0001$. Todos os grupos foram comparados com seu mesmo sexo.

6.2 RESULTADOS DA INTERVENÇÃO COM O ENRIQUECIMENTO AMBIENTAL EM CAMUNDONGOS SWISS MACHOS EXPOSTOS A ADMINISTRAÇÃO DE DEXAMETASONA.

6.2.1 Efeitos da exposição de camundongos machos tratados com dexametasona ao enriquecimento ambiental sobre o comportamento do tipo-ansioso.

Para avaliar os efeitos da exposição ao enriquecimento ambiental em parâmetros de comportamento exploratório e emocional, os camundongos foram expostos previamente a dois diferentes ambientes: ambiente padrão ou ambiente enriquecido e, após quatro semanas, foram tratados, por 17 dias, com dexametasona (4mg/kg) ou NaCl (0,9%) e foram testados no LCE e os parâmetros analisados foram: % tempo braço aberto, % entradas braço aberto e total de entradas nos braços fechados. A ANOVA de duas vias não mostrou significância para nenhum fator em nenhum dos parâmetros analisados (**Fig 14**).

Figura 14- Efeito do enriquecimento ambiental no comportamento do tipo-ansioso em camundongos machos tratados com dexametasona.



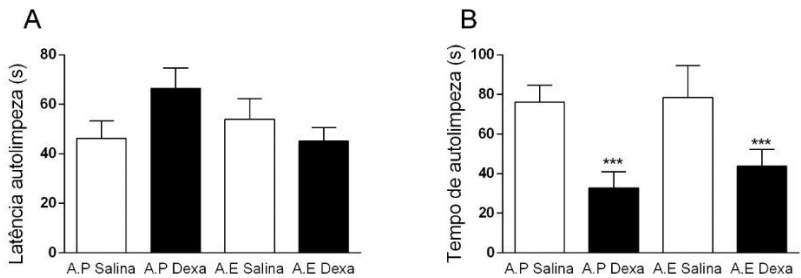
Legenda: Efeitos da administração de dexametasona (4 mg/kg, i.p) ou salina (NaCl 0,9% i.p.) em parâmetros de emocionalidade analisados no LCE. Os dados são apresentados como média + E.P.M. (n= 10 animais) e os resultados foram analisados via ANOVA de duas vias. A.P: ambiente padrão; A.E: ambiente enriquecido.

6.2.2 Efeitos da exposição de camundongos machos tratados com dexametasona ao enriquecimento ambiental sobre o comportamento do tipo-anedônico.

Para avaliar os efeitos da exposição ao enriquecimento ambiental sobre parâmetros de comportamento do tipo-anedônico, os camundongos foram expostos previamente a dois diferentes ambientes: ambiente padrão ou ambiente enriquecido e, após quatro semanas, foram

tratados, por 18 dias, com dexametasona (4mg/kg) ou NaCl (0,9%) e foram testados no Teste de Borrafigem de Sacarose e os parâmetros analisados foram: latência para primeira autolimpeza e tempo de autolimpeza. A ANOVA de duas vias revelou efeito significativo do fator tratamento [$F(1, 36)=12,878, P=,00098$], no entanto, a interação dos fatores não se mostrou significativa (**Fig. 15 B**). Análises *post hoc* subsequentes identificaram menor tempo de autolimpeza nos animais tratados com dexametasona no ambiente padrão e no ambiente enriquecido ($P < 0,05$). Tais dados indicam que o tratamento com dexametasona resultou em comportamento do tipo-anedônico e o enriquecimento ambiental não foi capaz de reverter tais alterações.

Figura 15- Efeito do enriquecimento ambiental no comportamento do tipo-anedônico em camundongos machos tratados com dexametasona.

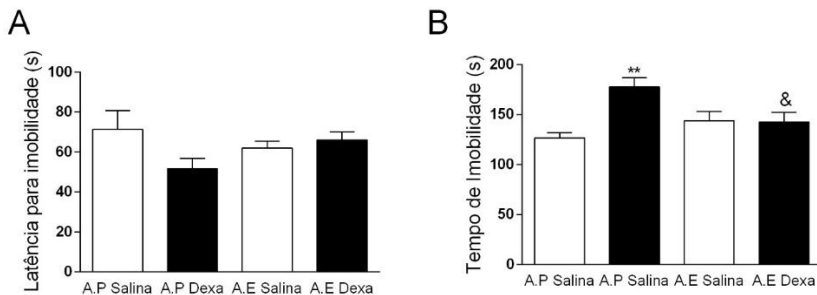


Legenda: Efeitos da administração de dexametasona (4 mg/kg, i.p) ou salina (NaCl 0, 9% i.p.) em parâmetros de emocionalidade analisados no Teste de Borrafigem de Sacarose. Os dados são apresentados como média + E.P.M. (n= 10 animais) e os resultados foram analisados via ANOVA de duas vias com *post hoc* Newman Keuls. *** $p < 0,001$ comparado com o grupo salina de mesmo ambiente. A.P: ambiente padrão; A.E: ambiente enriquecido.

6.2.3 Efeitos da exposição de camundongos machos tratados com dexametasona ao enriquecimento ambiental sobre o comportamento do tipo-depressivo.

Para avaliar os efeitos da exposição ao enriquecimento ambiental sobre parâmetros de comportamento do tipo-depressivo, os camundongos foram expostos previamente a dois diferentes ambientes: ambiente padrão ou ambiente enriquecido e, após quatro semanas, foram tratados, por 19 dias, com dexametasona (4mg/kg) ou NaCl (0,9%) e foram submetidos ao TSC e os parâmetros analisados foram: latência para primeira imobilidade e tempo de imobilidade. A ANOVA de duas vias revelou efeito significativo do fator tratamento no tempo de imobilidade dos animais [$F(1, 36)=8,5898, p=,00584$] e a interação entre os fatores se mostrou significativa [$F(1, 36)=8,5898, p=,00584$] (**Fig. 16 B**). Análises *post hoc* identificaram maior imobilidade nos animais submetidos ao ambiente padrão e ao tratamento com dexametasona quando comparados com os animais ambiente padrão tratados com salina ($P < 0,0008$). Ainda, as análises *post hoc* identificaram menor imobilidade nos animais submetidos ao tratamento de dexametasona expostos ao ambiente enriquecido se comparado aos animais tratados com dexametasona expostos ao ambiente padrão ($P < 0,05$). Esses dados sugerem que o ambiente enriquecido foi capaz de prevenir o comportamento do tipo-depressivo induzido pelo tratamento com dexametasona em camundongos machos.

Figura 16- Efeito do enriquecimento ambiental no comportamento do tipo-depressivo em camundongos machos tratados com dexametasona.



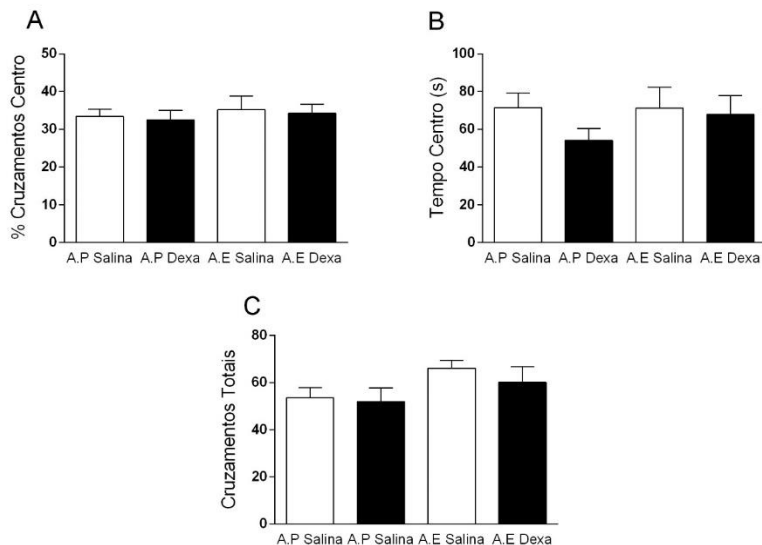
Legenda: Efeitos da administração de dexametasona (4 mg/kg, i.p) ou salina (NaCl 0,9% i.p.) em parâmetros de emocionalidade analisados no TSC. Os dados são apresentados como média + E.P.M. (n= 10 animais) e os resultados foram analisados via ANOVA de duas vias com *post hoc* Newman Keuls. ** $p < 0,05$ comparado com o grupo AP salina. & $p < 0,05$ comparado com o grupo A.P Dexa. A.P: ambiente padrão; A.E: ambiente enriquecido.

6.2.4 Efeitos da exposição de camundongos machos tratados com dexametasona ao enriquecimento ambiental sobre parâmetros de emocionalidade e locomoção no Teste do Campo Aberto.

Para avaliar os efeitos da exposição ao enriquecimento ambiental sobre parâmetros de emocionalidade e locomoção, os camundongos foram expostos previamente a dois diferentes ambientes: ambiente padrão ou ambiente enriquecido e, após quatro semanas, foram tratados, por 20 dias, com dexametasona (4mg/kg) ou NaCl (0,9%) e submetidos ao Teste do Campo Aberto e os parâmetros analisados foram: porcentagem de cruzamentos no centro, tempo no centro e

cruzamentos totais. A ANOVA de duas vias não revelou efeito significativo em nenhum fator.

Figura 17- Efeito do enriquecimento ambiental em parâmetros de emocionalidade e locomoção em camundongos machos tratados com dexametasona.



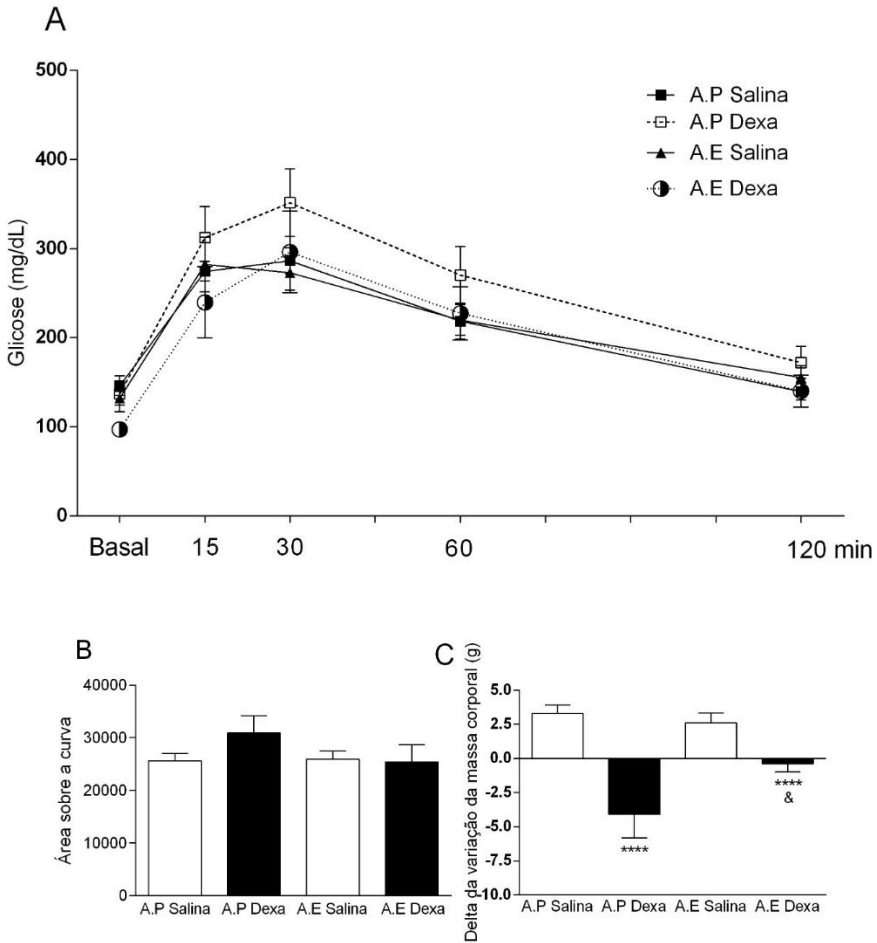
Legenda: Efeitos da administração de dexametasona (4 mg/kg, i.p) ou salina (NaCl 0, 9% i.p.) em parâmetros de emocionalidade e locomoção analisados no CA. Os dados são apresentados como média + E.P.M. (n= 10 animais) e os resultados foram analisados via ANOVA de duas vias com *post hoc* Newman Keuls. A.P: ambiente padrão; A.E: ambiente enriquecido.

6.2.5 Efeitos da exposição de camundongos machos tratados com dexametasona ao enriquecimento ambiental sobre parâmetros metabólicos.

Para avaliar os efeitos da administração de dexametasona sobre parâmetros metabólicos, os camundongos foram tratados, por 21 dias, com dexametasona (4mg/kg) ou NaCl (0,9%). No dia 21 de tratamento, os animais foram submetidos, após seis horas de jejum calórico, ao Teste do Tolerância à Glicose. A ANOVA de duas vias não mostrou significância para nenhum fator.

Quanto ao peso, a ANOVA de duas vias mostrou significativa redução de peso nos grupos tratados [F(1, 36)=25,496, p=,00001] e elucidou interação entre os fatores tratamento e ambiente [F(1, 36)=4,5636, p=,03953] (**Fig. 18 C**). Análises *post hoc* mostraram significativa diferença entre os animais do ambiente enriquecido tratados com salina comparado com os tratados com dexametasona de mesmo ambiente ($p<0,05$), bem como entre os animais tratados com dexametasona ou salina no ambiente padrão ($p<0,001$). Não obstante, a análise *post hoc* mostrou diferença significativa entre os animais de ambiente enriquecido tratados com dexametasona e os animais de ambiente padrão tratados com dexametasona ($p<0,05$). Tais dados indicam que o enriquecimento ambiental foi capaz de prevenir a perda de peso induzida pela administração de dexametasona em camundongos machos.

Figura 18- Efeito do enriquecimento ambiental em parâmetros metabólicos de camundongos machos tratados com dexametasona.

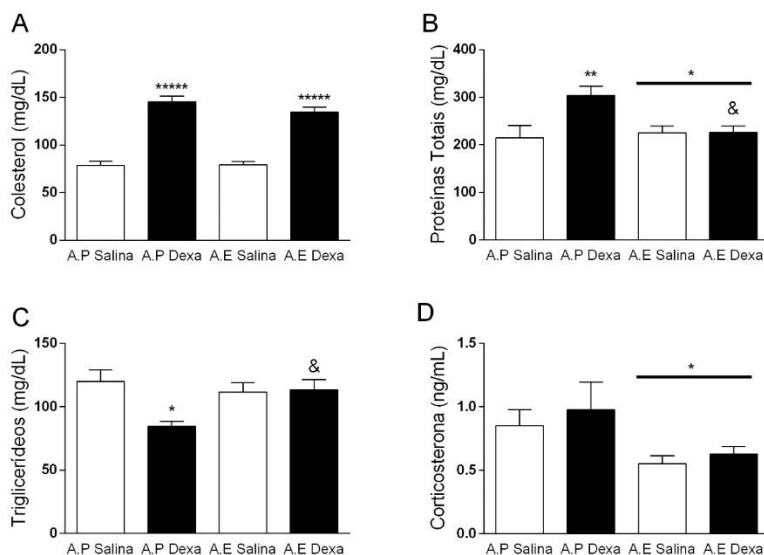


Legenda: Efeitos da administração de dexametasona (4 mg/kg, i.p) ou salina (NaCl 0, 9% i.p) em parâmetros metabólicos. Os dados são apresentados como média + E.P.M. (n= 10 animais) e os resultados foram analisados via ANOVA de duas vias com *post hoc* Newman Keuls. ****p= 0,00001 comparado com o grupo AP salina. &p< 0,05 comparado com o grupo A.P Dexa. A.P: ambiente padrão; A.E: ambiente enriquecido.

No dia 22, os animais, em jejum calórico de seis horas, foram anestesiados e tiveram o sangue coletado por punção cardíaca para análise dos níveis de triglicerídeos, colesterol e proteínas totais. A ANOVA de duas vias mostrou efeito significativo do tratamento de dexametasona no aumento das concentrações de colesterol [F(1, 36)=153,86, p=,00000] (**Fig. 19 A**). Análises *post hoc* confirmaram essa significância, mostrando que animais tratados com dexametasona apresentaram aumento significativo nas concentrações de colesterol ($p<0,05$). Nos parâmetros de concentrações plasmáticas de proteínas totais, a ANOVA de duas vias mostrou efeito do fator ambiente [F(1, 36)=4,4276, p=,04241], tratamento [F(1, 36)=7,4410, p=,00979] e interação entre os fatores [F(1, 36)=7,0144, p=,01193]. (**Fig. 19 B**). Análises *post hoc* mostraram diferença entre os animais tratados com dexametasona em ambiente padrão e tratado com salina em ambiente enriquecido ($p<0,05$) e mostraram que animais tratados com dexametasona e mantidos em ambiente padrão apresentam maiores concentrações de proteínas totais quando comparado aos animais tratados com dexametasona mantidos em enriquecimento ambiental ($p<0,05$). As concentrações de triglicerídeos plasmáticos foram mensuradas e a ANOVA de duas vias demonstrou efeito significativo do fator tratamento [F(1, 36)=5,1269, p=,02968] e interação entre os fatores [F(1, 36)=6,2658, p=,01699] (**Fig. 19 C**). Análises *post hoc* evidenciaram diferença entre os animais tratados com dexametasona e salina em ambiente padrão ($p<0,05$), tratados com dexametasona em ambiente padrão e tratado com salina em ambiente enriquecido ($p<0,05$) e mostraram que animais tratados com dexametasona e mantidos em ambiente padrão apresentam menores concentrações de triglicerídeos

quando comparado aos animais tratados com dexametasona mantidos em enriquecimento ambiental ($p < 0,05$). A corticosterona no soro foi avaliada via ELISA e a ANOVA de duas vias mostrou efeito significativo do fator ambiente [$F(1, 12) = 5,9298$, $p = 0,03144$], onde observou-se que os animais mantidos em enriquecimento ambiental apresentaram significativamente menor concentração de corticosterona no soro (**Fig. 19 D**).

Figura 19- Efeito do enriquecimento ambiental em parâmetros metabólicos de camundongos machos tratados com dexametasona.



Legenda: Efeitos da administração de dexametasona (4 mg/kg, i.p) ou salina (NaCl 0, 9% i.p.) em parâmetros metabólicos. Os dados são apresentados como média + E.P.M. (A, B e C: n= 10 animais. D: n=4 animais) e os resultados foram analisados via ANOVA de duas vias com *post hoc* Newman Keuls. * $p < 0,05$; ** $p = 0,009$ e **** $p = 0,00001$

comparado com o grupo AP salina. $p < 0,05$ comparado com o grupo A.P Dexam. A.P: ambiente padrão; A.E: ambiente enriquecido.

7. DISCUSSÃO

O desenvolvimento de Transtorno Depressivo Maior está intimamente relacionado com o estresse crônico (DE KLOET; JOELS; HOLSBOER, 2005). A hipótese da disfunção do eixo HPA para o desenvolvimento da depressão é sustentada por diversos estudos (BELMAKER; AGAM, 2008; DE KLOET; JOELS; HOLSBOER, 2005; KRISHNAN; NESTLER, 2011). Em animais, uma das maneiras de mimetizar transtornos depressivos é por meio de modelos animais de depressão. Evidências indicam que a administração aguda de dexametasona (uma dose de 64 $\mu\text{g}/\text{kg}$ via s.c.) foi capaz de aumentar o tempo de imobilidade de camundongos *Swiss* machos quando submetidos ao teste do nado forçado, o que não foi atribuído a diferenças na locomoção (WRÓBEL et al., 2014). Adicionalmente, a administração crônica (4mg/kg via i.p. por 21 dias) foi capaz de aumentar o tempo de imobilidade no teste do nado forçado e diminuir a preferência por sacarina de camundongos C57BL/6 machos, sem alterar a locomoção dos animais (SKUPIO et al., 2015).

Levando em consideração a comorbidade existente entre depressão e ansiedade, o presente estudo avaliou os efeitos do tratamento com dexametasona no comportamento do tipo-ansioso por meio do paradigma do LCE. Em nosso estudo, vimos que a administração de dexametasona não foi capaz de induzir um comportamento do tipo-ansioso analisado no paradigma do LCE em machos nem em fêmeas. Na literatura, os dados referentes a esses

efeitos são divergentes. Por exemplo, Zhang e colaboradores (2016) mostraram que camundongos machos tratados com corticosterona na dose de 40 mg/kg por 35 dias apresentaram diminuição no tempo no braço aberto no LCE. Em contrapartida, o estudo de Gregus e colaboradores (2005) relata que a administração de corticosterona na dose de 40 mg/kg por 21 dias não resultou em um aumento no comportamento do tipo-ansioso avaliado por meio do teste de interação social em ratos (GREGUS et al., 2005). Já Demuyser e colaboradores (2016) demonstraram que camundongos C57BL/6 machos tratados por 21 dias na dose de 20 mg/kg via s.c. não apresentaram alteração no tempo no braço aberto quando submetidos ao paradigma do LCE. No presente estudo, também não observamos efeito do enriquecimento ambiental sobre os parâmetros relacionados a comportamento do tipo-ansioso, embora dados da literatura aponte o enriquecimento ambiental como uma estratégia capaz de reduzir o comportamento do tipo-ansioso visto, por exemplo, no LCE. Galani e colaboradores (2007) demonstraram que a exposição ao enriquecimento ambiental por trinta dias reduziu as respostas relacionadas à ansiedade em roedores. Já Hendershott e colaboradores (2016) objetivaram verificar diferenças entre camundongos C57BL/6 machos e fêmeas submetidos ao enriquecimento ambiental por oito semanas sobre parâmetros de emocionalidade. Os autores não observaram interação entre ambiente e sexo, indicando que o enriquecimento ambiental atua igualmente sobre ambos os sexos. Ainda, os autores observaram que animais submetidos ao enriquecimento ambiental apresentaram maior número de entradas nos braços abertos do LCE, sendo efeito principal do ambiente (HENDERSHOTT et al., 2016). Outra estratégia para analisar

comportamento do tipo-ansioso é por meio da utilização do TCA, onde o instinto do animal naturalmente o leva a explorar mais as bordas do aparato, sendo que a exploração da região central é aumentada por drogas ansiolíticas (SEIBENHENER; WOOTEN, 2015). Ao observarmos os dados TCA, observamos que, nas fêmeas tratadas com dexametasona, houve uma diminuição no tempo no centro e nos cruzamentos totais, indicando comportamento do tipo-ansioso e hipolocomoção, respectivamente. Esses dados divergem de alguns encontrados na literatura. Rosa e colaboradores (2014) demonstraram que camundongos *swiss* fêmeas tratados com corticosterona na dose de 20 mg/kg por 21 dias não apresentaram diferença na locomoção analisada no TCA. Ainda, Pazini e colaboradores (2016) mostraram camundongos *swiss* tratados com corticosterona na dose de 20 mg/kg por 7, 14 e 21 dias também não apresentaram diferença na locomoção avaliadas no TCA. Embora o objetivo do estudo não tenha sido avaliar diferenças na locomoção entre os sexos, vale salientar que fêmeas naturalmente tendem a explorar mais o ambiente quando comparadas aos machos, o que foi observado nos cruzamentos totais das fêmeas durante a padronização do modelo. Tem sido sugerido que uma maior intensidade de exploração nas fêmeas pode ser importante do ponto de vista evolutivo. Como mães em potencial, as ratas devem se familiarizar mais profundamente com o ambiente desconhecido do que os machos, de modo a garantir um curso tranquilo de gravidez, parto e cuidado com a prole (DUBOVICKY; SKULTETYOVA; JEZOVA, 1999). Ainda, a literatura aponta que os efeitos da corticosterona na locomoção de roedores é dose dependente, onde observou-se que doses maiores

resultam em aumento na locomoção, ao passo que doses menores não resultam nesse efeito (SANDI; VENERO; GUAZA, 1996)

A depressão é uma desordem heterogênea, multifatorial que manifesta sintomas fisiológicos, comportamentais e psicológicos, como ideação suicida e ataques de pânico (BELMARKER; AGAM, 2008). A modelagem desses sintomas em modelos animais de laboratório é impossível. No entanto, apesar das dificuldades em traduzir as complexidades dos transtornos afetivos humanos em todo o seu espectro em testes nesses animais, numerosas tentativas foram feitas para criar os chamados modelos animais de depressão, ou pelo menos modelos que mimetizam alguns dos aspectos centrais da depressão (CRYAN; MARKOU; LUCKI, 2002). Uma das formas de verificar comportamentos do tipo-depressivo é por meio do TBS, que permite analisar o comportamento do tipo-anedônico do animal. O comportamento de autolimpeza dos roedores é um comportamento padronizado e complexo, que envolve lambida das patas, lavagem do nariz, face, cabeça, dorso e pernas (FENTRESS, 1988; ALDRIDGE; BERRIDGE; ROSEN, 2004). Especula-se que os comportamentos de autolimpeza sejam controlados centralmente e não por entradas sensoriais periféricas, uma vez que os camundongos com patas dianteiras amputadas continuaram a fazer gestos de cuidados faciais com seus cotos (SPRUIJT; HOOFF; GISPEN, 1992). A regulação do comportamento de higiene é mediada por múltiplas regiões encefálicas (SPRUIJT; HOOFF; GISPEN, 1992; KRUK et al., 1998), bem como por vários agentes endógenos, como neuromediadores (SPRUIJT; HOOFF; GISPEN, 1992; BARROS et al., 1994) e hormônios (SPRUIJT; HOOFF; GISPEN, 1992). Dada a natureza robusta desse

comportamento em fenótipos animais, é esperado que alterações neste domínio sejam vistas em modelos experimentais de estresse e depressão em roedores.

Nosso estudo demonstrou que camundongos machos tratados com dexametasona apresentaram menor tempo de autolimpeza no TBS, o que não foi visto nas fêmeas. Os resultados relacionados às fêmeas divergem dos dados encontrados na literatura. Freitas e colaboradores (2016) demonstraram que camundongos *swiss* e C57BL/6 tratados com corticosterona na dose de 20 mg/kg por 21 dias apresentaram menor tempo de autolimpeza (FREITAS et al., 2016). Em concordância com Freitas e cols, Rosa e colaboradores (2016) demonstraram que camundongos *swiss* fêmeas tratados com corticosterona na dose de 20 mg/kg por 21 dias apresentaram maior latência para o comportamento de autolimpeza e menor tempo de autolimpeza (ROSA et al., 2016). Esses efeitos do estresse na patogênese dos transtornos psiquiátricos mostram uma notável diferença de sexo. Sabe-se que a taxa de prevalência de depressão são duas vezes mais altas nas mulheres do que nos homens (NOLEN-HOEKSEMA, 2001). Em modelos animais de doenças psiquiátricas, estudos utilizando animais machos superam os que usam fêmeas (BEERY; ZUCKER, 2011). Isso é preocupante, uma vez que a pesquisa pré-clínica pode fornecer uma riqueza de dados não apenas sobre diferenças sexuais em modelos de transtornos psiquiátricos. O principal argumento para não usar animais fêmeas é o ciclo estral (TER HORST et al., 2011), evento caracterizado por um padrão distinto de secreção de estrógenos e progesterona. De fato, observa-se uma diferença entre os sexos nos receptores de glicocorticoides. Estudos sugerem que as concentrações de

corticosterona sofrem maiores alterações nas fêmeas que nos machos, especialmente durante a fase de proestro (fase em que há maior liberação de hormônios sexuais femininos), caracterizada como a primeira das quatro fases do ciclo estral (KARANDREA et al., 2000; KITRAKI et al., 2004). Nesse sentido, a capacidade de ligação de receptores para corticosterona no citosol do hipocampo é maior em ratas (TURNER; WEAVER, 1985), logo, sob estresse crônico, os padrões específicos de resposta mudam entre os sexos. Nesses casos, observa-se uma *downregulation* na ligação de glicocorticoides nos seus receptores no giro denteado e região CA1 no hipocampo de ratos machos, o que não se observa em fêmeas (KARANDREA et al., 2000; KITRAKI et al., 2004).

Em roedores fêmeas, o estresse pode elevar ou diminuir comportamentos do tipo-ansioso avaliados em diversos paradigmas, bem como prejudicar ou melhorar as capacidades cognitivas, dependendo do tipo e da origem do fator estressante (TER HORST et al., 2011). Por exemplo, em fêmeas, a exploração do braço aberto no LCE se mostrou reduzida após a exposição das mesmas ao odor de um predador (ADAMEC et al., 2006), porém o estresse gerado pela contenção desse animal não afetou a exploração do braço aberto nesse mesmo paradigma (BOWMAN et al., 2009), evidenciando padrões de respostas distintas no LCE frente a diferentes estressores. Além disso, a variação na concentração de hormônios sexuais circulantes durante o ciclo estral está relacionada as modificações em testes que mensuram comportamentos emocionais. Ratas na fase proestro (primeira fase do ciclo) e estro (segunda fase do ciclo) apresentaram maior tempo braços abertos no LCE quando comparadas a ratas na fase diestro (última fase

do ciclo) (GOUVEIA et al., 2004; MARCONDES et al., 2001; WALF et al., 2009). Em comparação com outras fases do ciclo estral, as fêmeas em proestro apresentam aprendizado aprimorado em tarefas comportamentais relativamente simples, como condicionamento clássico, mas são prejudicadas na realização de tarefas de aprendizagem mais complexas (TER HORST et al., 2011).

Em contrapartida, nossos resultados com machos convergem com os dados da literatura. David e colaboradores (2009) demonstraram que, ao serem tratados com corticosterona na dose de 35 ug/ml durante quatro semanas por meio da água de beber, dose equivalente de 1 a 5 mg/kg/dia, camundongos C56BL/6 apresentam um menor tempo de autolimpeza se comparado aos controles. Os autores mostram que o tratamento com fluoxetina, um ISRS, foi capaz de reverter o comportamento do tipo-anedônico induzido pelo tratamento com corticosterona, provavelmente por vias neurogênicas, uma vez que o bloqueio da neurogênese no hipocampo aboliu os efeitos protetores da fluoxetina (DAVID et al., 2009). Uma das estratégias que tem se mostrado eficazes para a promoção de neurogênese é por meio do enriquecimento ambiental. Os genes envolvidos na atividade neuronal e plasticidade sináptica apresentam-se aumentados pela exposição dos animais ao enriquecimento ambiental, especialmente no hipocampo (KEYVANI et al., 2004). Em contraste com estudos genômicos, vários genes candidatos foram bem caracterizados por seu papel na neurogênese induzida pelo enriquecimento ambiental e pelo exercício físico voluntário via roda de correr, em especial o aumento genes que promovem o aumento do BDNF (GARZA et al., 2004; ROSSI et al., 2006; VAN PRAAG; KEMPERMANN; GAGE, 2000), fator que

aparece diminuído em modelos animais com comportamento do tipo depressivo (O'KEEFE et al., 2014). Estudos tem avaliado as consequências da administração de corticosterona ou dexametasona na expressão de RNAm de BDNF no hipocampo e vários deles (HANSSON et al., 2000, 2006; VELLUCCI et al., 2001) examinaram os efeitos da dexametasona na expressão de RNAm de BDNF em múltiplas regiões encefálicas, focando predominantemente no hipocampo. Observou-se que esses glicocorticoides diminuem os níveis de RNAm do BDNF no hipocampo em administrações agudas (após 2-8 h da aplicação) (HANSSON et al., 2000, 2006; VELLUCCI et al., 2001) ou crônica (após 7 dias da aplicação) (SMITH et al., 1995). Em nosso estudo demonstramos que a exposição desses animais ao enriquecimento ambiental não foi capaz de aumentar o tempo de autolimpeza que se mostrou diminuído nos animais tratados com dexametasona. Em um estudo anterior, nosso grupo demonstrou que a mesma configuração de enriquecimento ambiental não foi capaz de atenuar a diminuição de BDNF induzida por dieta rica em lipídios (de Souza et al., 2019). Nesse sentido, suspeita-se que o tratamento com dexametasona tenha levado a diminuição do BDNF. Isso, somado aos nossos resultados anteriores, pode explicar, em partes, a falha do ambiente enriquecido em prevenir o aumento no tempo de autolimpeza induzido pelo tratamento com dexametasona observado no TBS. Ainda, ressalta-se que a variabilidade de tempo e configuração do enriquecimento ambiental possivelmente contribua para a divergência de resultados vistos na literatura (SIMPSON; KELLY, 2011).

Outra forma de analisar comportamento do tipo-depressivo é por meio do TSC. O TSC é um teste amplamente utilizado para avaliar o

potencial efeito antidepressivo de determinadas substâncias e vem sendo utilizado para avaliar o comportamento do tipo-depressivo em animais de laboratório (CRYAN; MARKOU; LUCKI, 2002). Nesse teste, avaliamos dois parâmetros específicos: latência para a imobilidade e tempo total de imobilidade (STERU et al., 1985). Em nosso estudo, observamos, na padronização do modelo, que os camundongos machos tratados com dexametasona apresentaram menor tempo de latência para a imobilidade se comparado ao seu grupo salina, o que não foi visto nas fêmeas, provavelmente por fatores envolvendo as diferenças na forma como o estresse atua fisiologicamente e resulta em diferenças comportamentais em machos e fêmeas, como debatidos anteriormente (TER HORST et al., 2011). Ainda, ambos os sexos apresentaram significativo aumento no tempo de imobilidade durante o teste. Esses achados estão de acordo com dados observados na literatura. Estudos já mostraram que camundongos fêmeas tratados com dexametasona apresentam comportamento do tipo-depressivo no TSC (FREITAS et al., 2016; ROSA et al., 2016) e o mesmo é observado em machos (ZHAO et al., 2008; SKUPIO et al., 2015; ALI et al., 2011). Por exemplo, Zhang e colaboradores (2016) mostraram que camundongos machos tratados com corticosterona na dose de 40 mg/kg por 35 dias apresentaram aumento no tempo de imobilidade no TSC. O estudo Gregus e colaboradores (2005) mostra que a administração de corticosterona na dose de 40 mg/kg por 21 dias resultou em um aumento no tempo de imobilidade no TSC e no teste do nado forçado em ratos (GREGUS et al., 2005). Ainda, Demuyser e colaboradores (2016) demonstraram que camundongos C57BL/6 machos tratados por 21 dias na dose de 20 mg/kg via s.c. apresentaram aumento no tempo de

imobilidade no TSC e diminuíram a preferência por sacarina no teste de preferência por sacarina. Em nosso estudo, quando camundongos machos foram expostos ao paradigma do enriquecimento ambiental, observamos uma redução no tempo de imobilidade que se mostrou aumentado nos animais tratados com dexametasona. Esses dados sugerem que o enriquecimento ambiental apresentou efeito antidepressivo avaliado pelo TSC. Ressalta-se que este resultado não pode ser atribuído a uma redução da atividade locomotora dos animais, uma vez que a administração de dexametasona não alterou a locomoção dos animais no TCA, dado compatível com demais estudos (ROSA et al., 2014; SKUPIO et al., 2015). O presente estudo não avaliou os mecanismos pelos quais o enriquecimento ambiental atuou na resposta do tipo antidepressiva, porém especula-se que possa ser por vias monoaminérgico. Estudos já demonstraram que o tratamento com corticosterona diminuiu a função serotoninérgica mediada pelos receptores do tipo 5HT1A, indicando os efeitos do tratamento com corticosterona são mais relacionadas as modificações do tipo depressiva que ansiosas (FERNANDES et al., 1997). Adicionalmente, dados comportamentais sugerem que a administração de corticosteroides resulta em maior espectro de manifestações de comportamento do tipo-depressivo que do tipo-ansioso (ZHANG et al., 2016; GREGUS et al., 2005; DEMUYSER et al., 2016). Já foi demonstrado que a exposição ao enriquecimento ambiental aumentou genes responsáveis pela transcrição de receptores de serotonina do tipo 5HT1A (RASMUSON et al., 1998) e aumentou a concentração de serotonina no encéfalo de roedores (BRENES; ROFRIGUEZ; FORNAGUERA, 2008).

Estudos demonstraram que a liberação excessiva de glicocorticoides é capaz de afetar a plasticidade hipocampal, causar atrofia dendrítica e diminuição da proliferação celular bem como a diferenciação neuronal no hipocampo, mecanismos que parecem estar correlacionados com o desenvolvimento de um comportamento depressivo (LANFUMEY et al., 2008; ZHAO et al., 2008; DUMAN, 2014). Sabe-se que a desregulação da resposta ao estresse pode ter consequências psicológicas e fisiológicas graves (DE KLOET; JOËLS; HOLSBOER, 2005) e a ativação crônica do eixo HPA tem sido associada a transtornos emocionais relacionados ao estresse, como a depressão (ZOBEL et al., 2000). Nesse sentido, outra variável possivelmente envolvida no efeito do tipo-antidepressivo do enriquecimento ambiental visto no TSC pode estar relacionada aos efeitos do ambiente padrão e ambiente enriquecido sobre as concentrações plasmáticas de corticosterona nos animais. Até o momento, a literatura não aponta um consenso sobre os efeitos do enriquecimento ambiental sobre as concentrações de corticosterona plasmática (SZTAINBERG et al., 2010). Há estudos relatando que o enriquecimento ambiental diminui as concentrações de corticosterona (BELZ et al., 2003), enquanto que outros não apontam diferenças (ROY et al., 2001; MARASHI et al., 2003). Entretanto, a maioria dos estudos sugere que o enriquecimento ambiental atenua efeitos estressores mediados pela ativação crônica do eixo HPA, e.g. animais que sofreram estresse neonatal, quando submetidos ao enriquecimento ambiental mais tarde, apresentam melhora em parâmetros comportamentais se comparado aos animais mantidos em ambiente padrão (FRANCIS et al., 2002; MORLEY-FLETCHER et al., 2003). Embora não tenhamos

avaliado por quais mecanismo o enriquecimento ambiental atuou sobre o comportamento do tipo-depressivo induzido pela dexametasona, suspeitamos que seja via redução dos receptores do hormônio liberador de corticotrofina (CRHr). Em um elegante estudo, Sztainberg e colaboradores (2010) demonstraram que o enriquecimento ambiental reduziu significativamente a expressão do RNAm do CRHr-1 em regiões límbicas, sugerindo um mecanismo molecular que poderia explicar o efeito do enriquecimento ambiental na diminuição das concentrações de corticosterona, uma vez que a *downregulation* deste receptor diminui a liberação de ACTH pela adeno-hipófese e consequente diminuição na liberação de corticosterona pelo córtex da adrenal. Esforços já foram realizados na tentativa de amenizar os quadros depressivos com base na modulação hormonal relacionada e esses receptores. Um ensaio clínico aberto demonstrou que um antagonista não peptídico CRH1r reduziu os escores de depressão em pacientes diagnosticados (ZOBEL et al., 2000). Nesse sentido, observamos efeito do fator ambiente sobre as concentrações de corticosterona no soro, isto é, animais mantidos em enriquecimento ambiental apresentaram menores concentrações de corticosterona no soro quando comparado aos animais mantidos em ambiente padrão. Suspeitamos que a diminuição da concentração de corticosterona observada nos animais em enriquecimento ambiental possa ter sido responsável pelo efeito do tipo-antidepressivo visto no TSC. Adicionalmente, esse efeito antidepressivo observado pode ter sido relacionado ao oferecimento do exercício voluntário por meio da roda de correr, haja vista que a literatura demonstra que o exercício está associado a diminuição de comportamentos do tipo-depressivo em

roedores (GREENWOOD et al., 2003). Ainda, estudos mostraram que a expressão de receptores de glicocorticoides em camundongos expostos ao exercício por meio da roda de correr é alterada (DROSTE et al., 2003). Hare e colaboradores (2013) demonstraram que o oferecimento de exercício voluntário por meio da roda de correr aumentou a sensibilidade ao ACTH, evidenciando que o exercício melhorou o controle central sobre a resposta do eixo HPA aos estressores subsequentes. Os autores sugerem que o exercício torna os animais particularmente resilientes, capazes de produzir uma resposta robusta ao estresse, limitando os danos que podem resultar da superexposição a glicocorticoides durante períodos de estresse, melhorando sua capacidade adaptativa aos estressores. Complementarmente, Chen e colaboradores (2017) observaram que o exercício físico aumenta as concentrações de corticosterona e essa, por sua vez, atuando em receptores de glicocorticoides no córtex pré-frontal, eleva a concentração de dopamina nessa região. Os autores ressaltam que esse mecanismo não ocorre quando a elevação nas concentrações de corticosterona ocorre por meio de mecanismos mediados pelo estresse. Nesse sentido, o aumento da dopamina em regiões encefálicas por meio do exercício pode explicar como o exercício físico e o enriquecimento ambiental atuam benéficamente em modelos de comportamento do tipo-depressivo, como no presente estudo.

Observamos que a dexametasona foi capaz de alterar o perfil lipídico dos animais. Na padronização do modelo, observamos que o tratamento com dexametasona não alterou a tolerância à glicose em ambos os sexos. Dados da literatura mostram respostas divergentes do perfil glicêmico de animais expostos ao tratamento com

glicocorticoides. Os glicocorticoides, *per se*, são considerados agentes diabotogênicos, pois promovem o aumento da produção hepática de glicose e diminuição da captação periférica em tecidos musculares e adiposos, por exemplo (SAINI, 2010). Nesse sentido, reproduzimos os dados da padronização quando avaliamos a exposição dos camundongos machos ao enriquecimento ambiental. Não observamos nenhuma diferença significativa relacionada à glicose avaliada pelo teste de tolerância a glicose. Nossos dados corroboram com alguns dados da literatura em diferentes tipos de roedores, onde observou-se que não houve alterações nas concentrações de glicose plasmática (embora observou-se aumento da insulina) (SHEN et al., 2016; BIGHETTI et al., 2014; LI et al., 2016). Particularmente, Shen e colaboradores (2016) mostraram que camundongos tratados com 40 mg/kg de corticosterona via s.c. durante 21 não apresentaram aumento nas concentrações de glicose plasmática em jejum. Ainda, Bighetti e colaboradores (2014) mostraram que ratos tratados com dexametasona na dose de 0,1 mg/kg por 10 dias via i.p. também não apresentaram aumento da glicemia em jejum, porém apresentaram intolerância à glicose avaliada pelo teste de tolerância à glicose. Em humanos, observou-se que uma única dose de 8 mg/kg de dexametasona foi capaz de aumentar significativamente a glicemia e a insulina dos sujeitos (ABDELMANNAN et al., 2010). Os efeitos deletérios dos glicocorticoides na liberação de insulina e captação de glicose envolvem diversas frentes: metabolismo oxidativo de glicose diminuído, ativação de canais de potássio (K^+) repolarizantes, geração de espécies reativas de oxigênio e diminuição da eficiência do cálcio (CA^{++}) intracelular na resposta secretora (ver RAFACHO et al., 2014). O aumento da insulina observado em modelos animais não

humanos tratados com dexametasona (SHEN et al., 2016; BIGHETTI et al., 2014; LI et al., 2016) e em humanos (ABDELMANNAN et al., 2010) pode ser explicado devido à capacidade adaptativa das células beta pancreáticas frente ao efeito diabetogênico dos glicocorticoides, visando contrabalancear a resistência à insulina causada pelos mesmos, isto é, a homeostase da glicose é mantida em condições fisiológicas normais ou quase normais por meio de compensações adaptativas das células beta pancreáticas secretoras de insulina. Notavelmente, esse fenômeno ocorre de maneira dose (RAFACHO et al., 2008) e tempo-dependente de administração de glicocorticoides (RAFACHO et al., 2011), o que pode explicar, em partes, porque em nosso modelo não observamos a resistência à insulina, como outros estudos. Provavelmente o tempo de administração foi suficiente para que as células betas pancreáticas conseguissem manter a homeostasia da glicose. Nesse sentido, a análise das concentrações basais de insulina em jejum seria um indicador de como a dexametasona estaria atuando no metabolismo insulinêmico.

O tecido adiposo desempenha um importante papel regulador no metabolismo energético, armazenando e liberando compostos para serem utilizados como energia quando organismo os necessita. Durante os períodos em que a comida é abundante e o nível de atividade física é baixo, o excesso de energia é armazenado na forma de triglicerídeos. Quando ocorre um déficit de energia, como durante o jejum ou o exercício mais intenso, os triglicerídeos são quebrados; e ácidos graxos e glicerol são usados como fonte de energia por meio da beta oxidação e glicólise, respectivamente, suprimindo a demanda energética do organismo. Em nosso estudo, o perfil lipídico foi significativamente

alterado pelo tratamento com dexametasona. Ao analisarmos as concentrações plasmáticas de colesterol, observamos significativo aumento nos animais tratados com dexametasona, em machos e em fêmeas. O aumento do colesterol induzido pela dexametasona é condizente com um estudo que encontramos na literatura. Kumar e colaboradores (2011) demonstram que a administração de dexametasona na dose de 10 mg/kg durante oito dias via s.c. resulta no aumento do colesterol em ratos. Os autores sugerem que tratamento com dexametasona aumenta a secreção de VLDL pelo fígado (KUMAR et al., 2011). De fato, dislipidemia (incluindo o aumento do colesterol) é um efeito adverso comumente observados em terapias que envolvem a administração de glicocorticoides (NEWELL-PRICE et al., 2006).

Em nossos achados, as concentrações plasmáticas de triglicerídeos apareceram aumentadas nas fêmeas e diminuída nos machos tratados com dexametasona. Na literatura, observamos que o tratamento com glicocorticoides aumenta significativamente as concentrações de triglicerídeos em machos (SHEN et al., 2016; LI et al., 2016). Em um organismo, o acúmulo lipídico pode variar de acordo com as demandas energéticas, podendo gerar um armazenamento excessivo de lipídios no tecido adiposo (lipogênese) ou a uma depleção excessiva em estados de catabolismo (lipólise). Na presença de um estressor, por exemplo, a maioria dos tecidos aumenta suas necessidades metabólicas; e assim, as demandas de energia do corpo são elevadas. Os glicocorticoides agem para suprir essa energia, pois liberam substratos energéticos como glicose, aminoácidos, glicerol e ácidos graxos (PECKETT; WRIGHT; RIDDELL, 2011). Durante a lipólise, enzimas chamadas lipases quebram os triglicerídeos, processo esse exacerbado

pelos glicocorticoides (XU et al., 2009; CAMPBELL et al., 2011; SLAVI; ONG; KERN, 1994). Suspeita-se que esse aumento na via lipolítica ocorra por meio da via β -adrenérgica. Como principal regulador da lipólise β -adrenérgica, a adenosina monofosfato cíclica (AMPC) é frequentemente o primeiro alvo de investigação. Aumentos nos níveis de AMPC com o tratamento com glicocorticoides sugerem um mecanismo para aumento da lipólise (LAMBERTS et al., 1975; FAIN; DODD; NOVAK, 1975). Nos adipócitos, os glicocorticoides apresentam diferentes efeitos; ora aumentando a lipogênese (BERDANIER, 1989), ora aumentando a lipólise (GRAVHOLT et al., 2002; TOMLINSON et al., 2007; SAMRA et al., 1998). Experimentos *in vitro* corroboram essa perspectiva e demonstram que, a depender da dose, a lipólise aumenta ou diminui. Por exemplo, adipócitos A 3T3-L1 tratados com corticosterona por quarenta e oito horas apresentaram aumento na lipólise com baixas doses de corticosterona ($<25 \mu\text{mol/L}$), enquanto decréscimos na lipólise foram observados com doses mais altas ($> 25 \mu\text{mol/L}$) (CAMPBELL et al., 2011). Esses dados levam a crer que a diminuição das concentrações de triglicerídeos observadas nos machos tenha se dado devido ao aumento da lipólise, o que é corroborado pela perda de peso observada nesses animais. Nessa mesma lógica, as fêmeas apresentaram significativo aumento dos triglicerídeos e, notavelmente, aumento do peso, ambos fenômenos provavelmente consequência de um aumento da lipogênese. A exposição dos machos ao enriquecimento ambiental foi capaz de aumentar as concentrações de triglicerídeos e atenuar a perda de peso. Esses dados sugerem que o enriquecimento ambiental diminuiu os efeitos lipolíticos exacerbados pelo tratamento com dexametasona. Embora os fenótipos metabólicos

regulados por glicocorticoides sejam bem descritos, os mecanismos subjacentes a esses efeitos não são totalmente elucidados, especialmente devido as modulações genômicas e não genômicas exercidas pelos glicocorticoides por meio de seus receptores intracelulares (YU et al., 2010).

A avaliação das proteínas totais mostrou que os camundongos machos tratados com dexametasona apresentaram aumento significativo nas concentrações plasmáticas de proteínas totais, enquanto que, nas fêmeas tratadas, não se observou diferença. O aumento nas concentrações de proteínas totais observadas nos machos pode ser explicado pela propriedade catabólica que os glicocorticoides apresentam, inibindo a síntese proteica e aumentando a degradação (MORGAN et al., 2016). Parte dessa característica catabólica pode explicar a perda de peso observada nos machos tratados com dexametasona, enquanto que não se observou perda de peso nas fêmeas, mas sim aumento. Esses dados sugerem associação entre o aumento nas concentrações plasmáticas de proteínas totais mediadas pelas propriedades catabólicas dos glicocorticoides com a perda de peso observada nesses animais. Sabe-se que o desenvolvimento do músculo esquelético sofre influência dos hormônios esteroides. Doses terapêuticas de glicocorticoides, bem como aumento do nível plasmático de glicocorticoides sob várias condições, provocam uma redução acentuada na massa muscular e causam fraqueza, visto que os glicocorticoides diminuem a taxa de síntese proteica e aumentam as taxas médias de catabolismo (SEENE; VIRU, 1982). Seene e Viru (1982) demonstraram que a administração de 100 ug/100g de dexametasona reduziu o peso de ratos, provavelmente por vias do catabolismo proteico. Ainda, observou-

se que a exposição ao enriquecimento ambiental reverteu o aumento na concentração de proteínas totais nos camundongos machos tratados com dexametasona, ao passo que também se observou a reversão da perda de peso nesses mesmos animais. Tal fenômeno pode estar associado ao exercício voluntário oferecido pela roda de correr, uma vez que o exercício físico aumenta a síntese proteica, conseqüentemente gerando a manutenção da massa muscular (TIPTON; WOLFE, 2001; ATHERTON; SMITH, 2012) o que explicaria; i- a reversão do aumento da concentração plasmática de proteínas totais e ii- a reversão da perda de peso pela manutenção da massa muscular.

Sumariamente, esse estudo reforça a propriedade antidepressiva do enriquecimento ambiental, bem como os benefícios do oferecimento do exercício voluntário por meio da roda de correr em modelos animais de comportamento do tipo-depressivo induzido pela administração de glicocorticoides. Dado que o atual quadro de tratamentos para depressão é insatisfatório, pois os fármacos apresentam baixa taxa de resposta e efeitos colaterais que dificultam a adesão dos pacientes (BERTON e NESTLER, 2006), é interessante que novas estratégias não farmacológicas sejam estudadas. O enriquecimento ambiental emerge como uma dessas propostas, embora careça de padronização no meio acadêmico. Nesse sentido, mostramos que o enriquecimento ambiental foi capaz de atenuar prejuízos comportamentais e metabólicos e que muitos dos dados divergem ou convergem com os da literatura, explicitando e corroborando a necessidade de uma melhor padronização para a utilização do protocolo de enriquecimento ambiental, visando aumentar a reprodutibilidade dos dados. A variação nos resultados da literatura sugere que os efeitos do enriquecimento ambiental podem ser

influenciados pelo tipo de enriquecimento, duração dos experimentos, sexo e linhagem dos animais usados nos experimentos (SIMPSON; KELLY, 2011).

8. CONCLUSÃO

- A administração crônica de dexametasona (4 mg/kg, durante 21 dias) produziu um aumento no tempo de imobilidade no TSC, sem alterações na atividade locomotora dos animais, evidenciando que este protocolo é capaz de induzir um comportamento tipo-depressivo em camundongos.
- A exposição dos camundongos machos ao enriquecimento ambiental por quatro semanas foi capaz de diminuir o tempo de imobilidade no TSC, sem alterações na atividade locomotora dos animais, evidenciando o efeito tipo-antidepressivo do enriquecimento ambiental nesse modelo de comportamento do tipo-depressivo induzido por dexametasona.
- A administração crônica de dexametasona (4 mg/kg, durante 21 dias) produziu uma diminuição do tempo de autolimpeza em machos, mas não em fêmea no TBS, sugerindo que este protocolo é capaz de induzir um comportamento tipo-anedônico apenas nos machos.
- A administração crônica de dexametasona (4 mg/kg, durante 21 dias) não mostrou efeitos significativos no comportamento do tipo-ansioso observado no LCE, sugerindo que tal modelo apresente maiores efeitos em comportamentos do tipo-depressivo.
- A administração crônica de dexametasona (4 mg/kg, durante 21 dias) não mostrou efeitos significativos no teste de tolerância à glicose em machos ou em fêmeas.
- A administração crônica de dexametasona (4 mg/kg, durante 21 dias) mostrou aumento significativo das concentrações plasmáticas de colesterol em machos e em fêmeas, sendo que, nos machos, o enriquecimento ambiental não foi capaz de reverter tal alteração.

- A administração crônica de dexametasona (4 mg/kg, durante 21 dias) mostrou diminuição significativa nas concentrações plasmáticas de triglicerídeos em machos e aumento nas fêmeas.
- O enriquecimento ambiental apresentou efeitos significativos em parâmetros plasmáticos de triglicerídeos nos machos, sendo capaz de reverter a diminuição de tais alterações.
- A administração crônica de dexametasona (4 mg/kg, durante 21 dias) resultou em um aumento significativo nas proteínas totais em machos, mas não nas fêmeas, sendo que, em machos, o enriquecimento ambiental apresentou efeitos significativos, revertendo o aumento das concentrações plasmáticas de proteínas totais.
- A administração crônica de dexametasona (4 mg/kg, durante 21 dias) resultou em significativa diminuição de peso nos machos, o que não foi observado nas fêmeas. Ainda, o enriquecimento ambiental foi capaz de atenuar a perda de peso nos machos, provavelmente refletindo os benefícios observados nos parâmetros metabólicos.

PERSPECTIVAS

- Avaliar níveis de insulina em jejum;
- Avaliar o imunoconteúdo dos CRHR;
- Avaliar frações de LDL e HDL;
- Verificar o ciclo estral das fêmeas durante a realização dos protocolos;
- Mensurar a distância percorrida na roda de correr nas caixas de enriquecimento ambiental;
- Avaliar as concentrações de ácidos graxos livres plasmáticos;

- Avaliar o imunoconteúdo de BDNF no hipocampo;
- Avaliar o imunoconteúdo de dopamina e serotonina no córtex pré-frontal.

REFERÊNCIAS

ADAMEC R, HEAD D, BLUNDELL J, BURTON P, BERTON O (2006) Lasting anxiogenic effects of feline predator stress in mice: sex differences in vulnerability to stress and predicting severity of anxiogenic response from the stress experience. **Physiol Behav** 88(1–2):12–29.

ALDRIDGE JW, BERRIDGE KC, ROSEN AR. Basal ganglia neural mechanisms of natural movement sequences. **Can J Physiol Pharmacol** 2004;82:732–9.

ALI SH, MADHANA RM, K V A, KASALA ER, BODDULURU LN, PITTA S, MAHAREDDY JR, LAHKAR M. Resveratrol ameliorates depressive-like behavior in repeated corticosterone-induced depression in mice. **Steroids**. 2015; 101:37-42

ANDREATINI R, LACERDA RB, VITAL MABF. Modelos Animais em Psicofarmacologia. In: Almeida RN. **Psicofarmacologia: Fundamentos Práticos**, Guanabara Koogan, Rio de Janeiro, 2006.

ATHERTON, P. J., & SMITH, K. (2012). Muscle protein synthesis in response to nutrition and exercise. **The Journal of physiology**, 590(5), 1049-57.

AUER D.P., PUTZ B., KRAFT E., LIPINSKI B., SCHILL J., HOLLSBOER F. Reduced glutamate in the anterior cingulate cortex in depression: an in vivo proton magnetic resonance spectroscopy study. **Biol. Psychiatry**. 2000;47:305–313

BARROS HM, TANNHAUSER SL, TANNHAUSER MA, TANNHAUSER M. The effects of GABAergic drugs on grooming behaviour in the open field. **Pharmacol Toxicol** 1994;74:339–44.

BARROS, MARILISA BERTI DE AZEVEDO, et al (2017). Depression and health behaviors in Brazilian adults – PNS 2013. **Revista de Saúde Pública**, 51(Suppl. 1),

BAXTER, A. J., PATTON, G., SCOTT, K. M., DEGENHARDT, L., & WHITEFORD, H. A. (2013). Global epidemiology of mental disorders: what are we missing?. **PloS one**, 8(6), e65514.
doi:10.1371/journal.pone.0065514

BEERY AK, ZUCKER I (2011) Sex bias in neuroscience and biomedical research. **Neurosci Biobehav Rev** 35(3):565–572.

BELMAKER RH, AGAM G.. Major depressive disorder. **N Engl J Med**. 2008 Jan 3;358(1):55-68. doi: 10.1056/NEJMra073096

BELZ EE, KENNELLS JS, CZAMBEL RK, RUBIN RT, RHODES ME. Environmental enrichment lowers stress-responsive hormones in singly housed male and female rats. **Biochem Behav** 2003; 76: 481–486.

BERDANIER CD. Role of glucocorticoids in the regulation of lipogenesis. **Faseb J**. 1989;3:2179–2183.

BERMAN RM et al. Antidepressant effects of ketamine in depressed patients. **Biol Psychiatry**. 2000 Feb 15;47(4):351-4.

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

BIGHETTI, B. B., ASSIS, G. F. D., VIEIRA, D. C., VIOLATO, N. M., CESTARI, T. M., TAGA, R., ... RAFACHO, A. (2014). Long-term dexamethasone treatment alters the histomorphology of acinar cells in rat parotid and submandibular glands. **International Journal of Experimental Pathology**, 95(5), 351–363. doi:10.1111/iep.12092

BOARD F, WADESON R, PERSKY H. Depressive Affect and Endocrine Functions Blood Levels of Adrenal Cortex and Thyroid Hormones in Patients Suffering from Depressive Reactions. **AMA Arch NeurPsych**. 1957;78(6):612–620.
doi:10.1001/archneurpsyc.1957.02330420072015

BOLLES RC. Grooming behavior in the rat. **J Comp Physiol Psychol** 1960;53:306–10.

BOSQUEIRO JR. (2011) Morphofunctional alterations in endocrine pancreas of short- and long-term dexamethasone-treated rats. **Hormone and Metabolic Research** 43 275–281.

BOWMAN RE, MICIK R, GAUTREAUX C, FERNANDEZ L, LUINE VN (2009) Sex-dependent changes in anxiety, memory, and monoamines following 1 week of stress. **Physiol Behav** 97(1):21–29.
doi:

BRENES JC, FORNAGUERA J. Effects of environmental enrichment and social isolation on sucrose consumption and preference: Associations with depressive-like behavior and ventral striatum dopamine. **Neuroscience Let**, 2008; 436: 278–282.

BRENES JC, RODRIGUEZ O, FORNAGUERA J. Differential effect of environment enrichment and social isolation on depressive-like behavior, spontaneous activity and serotonin and norepinephrine concentration in prefrontal cortex and ventral striatum. **Pharmacol Biochem Behav** 2008;89:85–93.

BUNNEY, W. E., & BUNNEY, B. G. (2000). Molecular clock genes in man and lower animals: Possible implications for circadian abnormalities in depression. **Neuropsychopharmacology**, 22(4), 335–345. [https://doi.org/10.1016/S0893-133X\(99\)00145-1](https://doi.org/10.1016/S0893-133X(99)00145-1)

CAMPBELL JE, PECKETT AJ, D'SOUZA AM, HAWKE TJ, RIDDELL MC. Adipogenic and lipolytic effects of chronic glucocorticoid exposure. **Am J Physiol Cell Physiol** 2011;300:C198-209

CAMPBELL, S., & MACQUEEN, G. (2004). The role of the hippocampus in the pathophysiology of major depression. **Journal of psychiatry & neuroscience : JPN**, 29(6), 417-26.

CANNON, W. B. (1932). *The wisdom of the body*. New York, NY, US: W W Norton & Co.

CHEN C, NAKAGAWA S, AN Y, ITO K, KITAICHI Y, KUSUMI I. (2017) The exercise-glucocorticoid paradox: How exercise is beneficial to cognition, mood, and the brain while increasing glucocorticoid levels. **Front Neuroendocrinol.** 2017 Jan;44:83-102. doi: 10.1016/j.yfrne.2016.12.001.

CIPRIANI, A. et al. (2011). Comparative efficacy and acceptability of antimanic drugs in acute mania : a multiple-treatments meta-analysis. **The Lancet**, 378(9799), 1306–1315. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(11\)60873-8](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(11)60873-8)

COHEN S, JANICKI-DEVERTS D, MILLER GE. Psychological stress and disease. **JAMA.** 2007 Oct 10;298(14):1685-7.

CROFTON, E. J., ZHANG, Y., & GREEN, T. A. (2014). Inoculation stress hypothesis of environmental enrichment. **Neuroscience and biobehavioral reviews**, 49, 19-31.

CRYAN JF, MOMBÉREAU C, VASSOUT A. The tail suspension test as a model for assessing antidepressant activity: review of pharmacological and genetic studies in mice. **Neurosci Biobehav Rev.** 2005;29(4-5):571-625.

CRYAN, J. F., MARKOU, A., & LUCKI, I. (2002). Assessing antidepressant activity in rodents: recent developments and future needs. **Trends in Pharmacological Sciences**, 23(5), 238–245. doi:10.1016/s0165-6147(02)02017-5

D et al. Effect of dexamethasone on oral glucose tolerance in healthy adults. **Endocr Pract**. 2010 Sep-Oct;16(5):770-7. doi: 10.4158/EP09373.OR.

DAILLY E, CHENU F, RENARD CE, BOURIN M. Dopamine, depression and antidepressants. **Fundam Clin Pharmacol**. 2004 Dec;18(6):601-7.

DAVID, D. J., SAMUELS, B. A., RAINER, Q., WANG, J. W., MARSTELLER, D., MENDEZ, I., DREW, M., CRAIG, D. A., GUIARD, B. P., GUILLOUX, J. P., ARTYMYSHYN, R. P., GARDIER, A. M., GERALD, C., ANTONIJEVIC, I. A., LEONARDO, E. D., ... HEN, R. (2009). Neurogenesis-dependent and -independent effects of fluoxetine in an animal model of anxiety/depression. **Neuron**, 62(4), 479-93.

DE KLOET ER, JOËLS M, HOLLSBOER F. Stress and the brain: from adaptation to disease. **Nat Rev Neurosci**. 2005 Jun;6(6):463-75.

DE SOUZA RM et al. Behavioural, metabolic and neurochemical effects of environmental enrichment in high-fat cholesterol-enriched diet-fed mice. **Behav Brain Res**. 2019 Feb 1;359:648-656. doi: 10.1016/j.bbr.2018.09.022.

DEVERTEUIL, R. & LEHMANN, H. (1958). Therapeutic trial of iproniazid (marsilid) in depressed and apathetic patients. **Can Med Assoc J**, 78, 131–133.

DIAMOND, MARIAN C. (2001). Response of the brain to enrichment. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, 73(2), 211-220.

DREVETS WC. Neuroimaging and neuropathological studies of depression: implications for the cognitive-emotional features of mood disorders. **Curr Opin Neurobiol**. 2001 Apr;11(2):240-9

DROSTE SK, GESING A, ULBRICHT S, MULLER MB, LINTHORST ACE, REUL JM. Effects of long-term voluntary exercise on the mouse hypothalamic-pituitary-adrenocortical axis. **Endocrinology**. 2003;144:3012–3023

DUBOVICKY M, SKULTETYOVA I, JEZOVA D. Neonatal stress alters habituation of exploratory behavior in adult male but not female rats. **Pharmacol Biochem Behav**. 1999;64:681–686

DUMAN, R. S. Neurobiology of stress, depression, and rapid acting antidepressants: remodeling synaptic connections. **Depress Anxiety**, v. 31, n. 4, p. 291-6, 2014

FAIN JN, DODD A, NOVAK L. Enzyme regulation in gluconeogenesis and lipogenesis. relationship of protein synthesis and cyclic AMP to lipolytic action of growth hormone and glucocorticoids. **Metabolism** 1971;20:109-18.

FENTRESS JC. Expressive contexts, fine structure, and central mediation of rodent grooming. **Ann N Y Acad Sci** 1988;525:18–26.

FERNANDES C, MCKITTRICK CR, FILE SE AND MCEWEN B (1997). Decreased 5-HT1A and increased 5HT2A receptor binding after

chronic corticosterone associated with a behavioral indication of depression but not anxiety. **Psychoneuroendocrinology**. 22(7): 477-491

FERNÁNDEZ-TERUEL A, GIMÈNEZ-LLORT L, ESCORIHUELA RM, GIL L, AGUILAR R, STEIMER T, TOBENÀ A. Early-life handling stimulation and environmental enrichment: are some of their effects mediated by similar neural mechanisms? **Pharmacol Biochem Behav**, 2002; 73: 233–245.

FERRARI, A. J. et al. . Burden of depressive disorders by country, sex, age, and year: findings from the global burden of disease study 2010. **PLoS Med**, v. 10, n. 11, p. e1001547, 2013.

FRANCIS DD, DIORIO J, PLOTSKY PM, MEANEY MJ.

Environmental enrichment reverses the effects of maternal separation on stress reactivity. **J Neurosci** 2002; 22: 7840–7843.

FRANCO-COLÍN, M., VILLANUEVA, I., PIÑÓN, M., & RACOTTA, R. (2006). The effects of sympathectomy and dexamethasone in rats ingesting sucrose. **International journal of biological sciences**, 2(1), 17-22.

FREIS, E. (1954). Mental depression in hypertensive patients treated for long periods with large doses of reserpine. **The New England Journal of Medicine**.

FREITAS A, E, EGEA J, BUENDIA I, GÓMEZ-RANGEL V, PARADA E, NAVARRO E, CASAS AI, WOJNICZ A, ORTIZ JA, CUADRADO A, RUIZ-NUÑO A, RODRIGUES ALS, LOPEZ MG.

Agmatine, by Improving Neuroplasticity Markers and Inducing Nrf2, Prevents Corticosterone-Induced Depressive-Like Behavior in Mice. **Mol Neurobiol.** 2016 Jul;53(5):3030-3045.

GALANI R, BERTHELMC, LAZARUS C, MAJCHRZAK M, BARBELIVIEN A, KELCHE C, et al. The behavioral effects of enriched housing are not altered by serotonin depletion but enrichment alters hippocampal neurochemistry. **Neurobiol Learn Mem** 2007;88:1–10.

GARZA AA, HA TG, GARCIA C, CHEN MJ, RUSSO-NEUSTADT AA: Exercise, antidepressant treatment, and BDNF mRNA expression in the aging brain. **Pharmacol Biochem Behav** 2004, 77:209-220.

GIBBONS JL. Cortisol Secretion Rate in Depressive Illness. **Arch Gen Psychiatry.** 1964;10(6):572–575.

GOUVEIA A JR, DOS SANTOS UD, FELISBINO FE, DE AFONSECA TL, ANTUNES G, MORATO S (2004) Influence of the estrous cycle on the behavior of rats in the elevated T-maze. **Behav Process** 67(2):167–171.

GRADUS J. L. (2017). Prevalence and prognosis of stress disorders: a review of the epidemiologic literature. **Clinical epidemiology**, 9, 251-260. doi:10.2147/CLEP.S106250

GRAVHOLT CH, DALL R, CHRISTIANSEN JS, MOLLER N, SCHMITZ O. Preferential stimulation of abdominal subcutaneous

lipolysis after prednisolone exposure in humans. **Obes Res.** 2002;10:774–781

GREENWOOD BN, FOLEY TE, DAY HE, CAMPISI J, HAMMACK SH, CAMPEAU S, MAIER SF, FLESHNER M. Freewheel running prevents learned helplessness/behavioral depression: role of dorsal raphe serotonergic neurons. **J Neurosci.** 2003 Apr 1;23(7):2889-98.

GREGUS, A. et al. Effect of repeated corticosterone injections and restraint stress on anxiety and depression-like behavior in male rats. **Behav Brain Res**, v. 156, n. 1, p. 105-14, 2005.

GUMNICK, J. F., & NEMEROFF, C. B. (2000). Problems with currently available antidepressants. **The Journal of Clinical Psychiatry**, 61(Suppl10), 5-15.

HANSSON AC, CINTRA A, BELLUARDO N, SOMMER W, BHATNAGAR M, BADER M, GANTEN D, FUXE K (2000) Gluco- and mineralocorticoid receptor-mediated regulation of neurotrophic factor gene expression in the dorsal hippocampus and the neocortex of the rat. **Eur J Neurosci** 12:2918–2934.

HANSSON AC, SOMMER WH, METSIS M, STROMBERG I, AGNATI LF, FUXE K (2006) Corticosterone actions on the hippocampal brain-derived neurotrophic factor expression are mediated by exon IV promoter. **J Neuroendocrinol** 18:104–114

HARE, B. D., BEIERLE, J. A., TOUFEXIS, D. J., HAMMACK, S. E., & FALLS, W. A. (2013). Exercise-associated changes in the

corticosterone response to acute restraint stress: evidence for increased adrenal sensitivity and reduced corticosterone response duration.

Neuropsychopharmacology: official publication of the American College of Neuropsychopharmacology, 39(5), 1262-9.

HASLER G. ET AL. (2002). Reduced prefrontal glutamate/glutamine and gamma-aminobutyric acid levels in major depression determined using proton magnetic resonance spectroscopy. **Arch Gen Psychiatry**. 2007 Feb;64(2):193-200

HEBB DO. The effects of early experience on problem-solving at maturity. **Am Psychol**, 1947; (2):306-307.

HENDERSHOTT, T. R., CRONIN, M. E., LANGELLA, S., MCGUINNESS, P. S., & BASU, A. C. (2016). Effects of environmental enrichment on anxiety-like behavior, sociability, sensory gating, and spatial learning in male and female C57BL/6J mice. **Behavioural Brain Research**, 314, 215–225. doi:10.1016/j.bbr.2016.08.004

HERMAN JP et al. Central mechanisms of stress integration: hierarchical circuitry controlling hypothalamo-pituitary-adrenocortical responsiveness. **Front Neuroendocrinol**. 2003 Jul;24(3):151-80

HOLSBOER F. The corticosteroid receptor hypothesis of depression. **Neuropsychopharmacology**. 2000;23:477-501.

HYMAN S. E. (2013). Psychiatric drug development: diagnosing a crisis. **Cerebrum**: the Dana forum on brain science, 2013, 5.

HASHIMOTO K. Emerging role of glutamate in the pathophysiology of major depressive disorder. **Brain Res Rev.** 2009 Oct;61(2):105-23. doi: 10.1016/j.brainresrev.2009.05.005. Epub 2009 May 28.

ISINGRINI, E., CAMUS, V., LE GUIQUET, A. M., PINGAUD, M., DEVERS, S., & BELZUNG, C. (2010). Association between repeated unpredictable chronic mild stress (UCMS) procedures with a high fat diet: a model of fluoxetine resistance in mice. **PloS one**, 5(4), e10404. doi:10.1371/journal.pone.0010404

KARANDREA D, KITTAS C, KITRAKI E (2000) Contribution of sex and cellular context in the regulation of brain corticosteroid receptors following restraint stress. **Neuroendocrinology** 71(6):343–353

KELLER, J., GOMEZ, R., WILLIAMS, G., LEMBKE, A., LAZZERONI, L., MURPHY, G. M., & SCHATZBERG, A. F. (2016). HPA axis in major depression: cortisol, clinical symptomatology and genetic variation predict cognition. **Molecular psychiatry**, 22(4), 527-536.

KEYVANI K, SACHSER N, WITTE OW, PAULUS W: Gene expression profiling in the intact and injured brain following environmental enrichment. **J Neuropathol Exp Neurol** 2004, 63:598-609.

KHOSHABA, D. M., & MADDI, S. R. (1999). Early experiences in hardiness development. **Consulting Psychology Journal: Practice and Research**, 51(2), 106-116.

KITRAKI E, KREMMYDA O, YOULATOS D, ALEXIS M, KITTAS C (2004) Spatial performance and corticosteroid receptor status in the 21- day restraint stress paradigm. **Ann N Y Acad Sci** 1018:323–327.

KORNEYEV AY (1997). The role of the hypothalamic-pituitary-Adrenocortical axis in memory related effects of anxiolytic. **Neurobiology of Learning and Memory**, 67: 1-13.

KRISHNAN, V., & NESTLER, E. J. (2011). Animal models of depression: molecular perspectives. **Current topics in behavioral neurosciences**, 7, 121-47.

KRUK MR, WESTPHAL KG, VAN ERP AM, et al. The hypothalamus: cross-roads of endocrine and behavioural regulation in grooming and aggression. **Neurosci Biobehav Rev** 1998;23:163–77.

KUMAR VR, INAMDAR MN, NAYEEMUNNISA, VISWANATHA GL. Protective effect of lemongrass oil against dexamethasone induced hyperlipidemia in rats: possible role of decreased lecithin cholesterol acetyl transferase activity. **Asian Pac J Trop Med**. 2011 Aug;4(8):658-60. doi: 10.1016/S1995-7645(11)60167-3.

LAMBERTS SW, TIMMERMANS HA, KRAMER-BLANKESTIJN M, BIRKENHAGER JC. The mechanism of the potentiating effect of glucocorticoids on catecholamine-induced lipolysis. **Metabolism** 1975;24:681-9.

LANFUMEY, L. et al. . Corticosteroid-serotonin interactions in the neurobiological mechanisms of stress-related disorders. **Neurosci Biobehav Rev**, v. 32, n. 6, p. 1174-84, 2008.

LARSSON F, WINBLAD B, MOHAMMED AH. Psychological stress and environmental adaptation in enriched versus impoverished housed rats. **Pharmacol Biochem Behav**, 2002; 73:193–207.

LI Y-C, LIU Y-M, SHEN J-D, CHEN J-J, PEI Y-Y, FANG X-Y. Resveratrol Ameliorates the Depressive-Like Behaviors and Metabolic Abnormalities Induced by Chronic Corticosterone Injection. **Molecules**. 2016; 21(10):1341.

LI, S.-X., FUJITA, Y., ZHANG, J.-C., REN, Q., ISHIMA, T., WU, J., & HASHIMOTO, K. (2014). Role of the NMDA receptor in cognitive deficits, anxiety and depressive-like behavior in juvenile and adult mice after neonatal dexamethasone exposure. **Neurobiology of Disease**, 62, 124–134. doi:10.1016/j.nbd.2013.09.004

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

LIU, D. et al. (2013). A practical guide to the monitoring and management of the complications of systemic corticosteroid therapy. **Allergy, asthma, and clinical immunology.**, 9(1), 30. doi:10.1186/1710-1492-9-30

LORRAINE I, MCKAY; JOHN A, C. (2003). Physiologic and Pharmacologic Effects of Corticosteroids. (et al. Kufe DW, Pollock RE, Weichselbaum RR, Ed.).

LYONS DM, PARKER KJ, KATZ M, SCHATZBERG AF. Developmental cascades linking stress inoculation, arousal regulation, and resilience. **Front Behav Neurosci.** 2009;3:32

LAPIDUS, K. A et al. (2014). A randomized controlled trial of intranasal ketamine in major depressive disorder. **Biological psychiatry**, 76(12), 970-6.

MARASHI V, BARNEKOW A, OSSENDORF E, SACHSER N. Effects of different forms of environmental enrichment on behavioral, endocrinological, and immunological parameters in male mice. **Horm Behav** 2003; 43: 281–292.

MARCONDES FK, MIGUEL KJ, MELO LL, SPADARI-BRATFISCH RC (2001) Estrous cycle influences the response of female rats in the elevated plus-maze test. **Physiol Behav** 74(4–5):435–440

MAYEUX, R. (2003) Epidemiology of neurodegeneration. **Annu. Rev. Neurosci.** 26, 81–104

MCEWEN, B. S. (2000).Sex, stress and the hippocampus: allostasis, allostatic load and the aging process. **Neurobiol Aging.** 2002 Sep-Oct;23(5):921-39.

MCGONIGLE, P., & RUGGERI, B. (2014). Animal models of human disease: Challenges in enabling translation. **Biochemical Pharmacology**, 87(1), 162–171. doi:10.1016/j.bcp.2013.08.006

MILLER, W. L., & AUCHUS, R. J. (2010). The molecular biology, biochemistry, and physiology of human steroidogenesis and its disorders. **Endocrine reviews**, 32(1), 81-151.

MONCEK F, DUNCKO R, JOHANSSON B, JEZOVA D. Effect of environmental enrichment on stress related systems in rats. **Journal of neuroendocrinology**. 2004;16:423–431

MORGAN, S. A., HASSAN-SMITH, Z. K., DOIG, C. L., SHERLOCK, M., STEWART, P. M., & LAVERY, G. G. (2016). Glucocorticoids and 11 β -HSD1 are major regulators of intramyocellular protein metabolism. **The Journal of endocrinology**, 229(3), 277-86.

MORILAK DA, FRAZER A. Antidepressants and brain monoaminergic systems: a dimensional approach to understanding their behavioural effects in depression and anxiety disorders. **Int J Neuropsychopharmacol**. 2004 Jun;7(2):193-218. Epub 2004 Mar 5.

MORLEY-FLETCHER S, REA M, MACCARI S, LAVIOLA G. Environmental enrichment during adolescence reverses the effects of prenatal stress on play behavior and HPA axis reactivity in rats. **Eur J Neurosci** 2003; 18: 3367–3374

MUNHOZ, T. N., NUNES, B. P., WEHRMEISTER, F. C., SANTOS, I. S., & MATIJASEVICH, A. (2016). A nationwide population-based

study of depression in Brazil. **Journal of Affective Disorders**, 192, 226–233. <https://doi.org/10.1016/j.jad.2015.12.038>

MYERS, B., MCKLVEEN, J. M., & HERMAN, J. P. (2014). Frontiers in Neuroendocrinology Glucocorticoid actions on synapses , circuits , and behavior : Implications for the energetics of stress. **Frontiers in Neuroendocrinology**, 35(2), 180–196. <https://doi.org/10.1016/j.yfrne.2013.12.003>

MURRAY CJ. Disability-adjusted life years (DALYs) for 291 diseases and injuries in 21 regions, 1990-2010: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2010. **LANCET**. 2012 Dec 15;380(9859):2197-223. doi: 10.1016/S0140-6736(12)61689-4.

NEMEROFF, C. (1998). The Neurobiology of Depression. **Scientific American**, 278(6).

NESTLER E ET AL. Neurobiology of depression. **Neuron**. 2002 Mar 28;34(1):13-25.

NEWELL-PRICE J, BERTAGNA X, GROSSMAN AB, NIEMAN LK. Cushing's syndrome. **Lancet**. 2006 May 13;367(9522):1605-17.

NG, J., PAPANDREOU, A., HEALES, S. J., & KURIAN, M. A. (2015). Monoamine neurotransmitter disorders - Clinical advances and future perspectives. **Nature Reviews Neurology**, 11(10), 567–584. <https://doi.org/10.1038/nrneurol.2015.172>

NITHIANANTHARAJAH J, HANNAN AJ. Enriched environments, experience dependent plasticity and disorders of the nervous system. **Nat Rev Neurosci**, 2006; 7: 697–709.

NOLEN-HOEKSEMA S (2001) Gender differences in depression. **Curr Dir Psychol Sci** 10(5):173–176

OAKLEY, R. H., & CIDLOWSKI, J. A. (2013.). The biology of the glucocorticoid receptor : New signaling mechanisms in health and disease. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, 1–12.

<https://doi.org/10.1016/j.jaci.2013.09.007>

O'KEEFE, L. M., DORAN, S. J., MWILAMBWE-TSHILOBO, L., CONTI, L. H., VENNA, V. R., & MCCULLOUGH, L. D. Social isolation after stroke leads to depressive-like behavior and decreased BDNF levels in mice. **Behavioural Brain Research**. 2014; 260, 162–170.

PARIANTE CM, LIGHTMAN SL. The HPA axis in major depression: classical theories and new developments. **Trends Neurosci**. 2008 Sep;31(9):464-8. doi: 10.1016/j.tins.2008.06.006. Epub 2008 Jul 31.

PATEL PD. Glucocorticoid and mineralocorticoid receptor mRNA expression in squirrel monkey brain. **J Psychiatr Res**. 2000 Nov-Dec;34(6):383-92.

PAZINI FL., CUNHA MP, ROSA JM, COLLA AR, LIEBERKNECHT V, OLIVEIRA Á, RODRIGUES AL. Creatine, Similar to Ketamine,

Counteracts Depressive-Like Behavior Induced by Corticosterone via PI3K/Akt/mTOR Pathway. **Mol Neurobiol.** 2016; 53(10):6818-6834.

PECKETT, A. J., WRIGHT, D. C., & RIDDELL, M. C. (2011). The effects of glucocorticoids on adipose tissue lipid metabolism. **Metabolism**, 60(11), 1500–1510. doi:10.1016/j.metabol.2011.06.012

PENA Y, PRUNELL M, ROTLLANT D, ARMARIO A, ESCORIHUELA RM. Enduring effects of environmental enrichment from weaning to adulthood on pituitary-adrenal function, pre-pulse inhibition and learning in male and female rats. **Psychoneuroendocrinology.** 2009;34:1390–1404.

PRUT L, BELZUNG C. The open field as a paradigm to measure the effects of drugs on anxiety-like behaviors: a review. **Eur J Pharmacol.** 2003 Feb 28;463(1-3):3-33

RAFACHO A, GIOZZET VA, BOSCHERO AC & BOSQUEIRO JR. (2008) Functional alterations in endocrine pancreas of rats with different degrees of dexamethasone-induced insulin resistance. **Pancreas** 36 284–293

RAFACHO A, ORTSÄTER H, NADAL A, QUESADA I. Glucocorticoid treatment and endocrine pancreas function: implications for glucose homeostasis, insulin resistance and diabetes. **J Endocrinol.** 2014 Dec;223(3):R49-62. doi: 10.1530/JOE-14-0373. 30.

RAFACHO A, ABRANTES JL, RIBEIRO DL, PAULA FM, PINTO ME, BOSCHERO AC, BOSQUEIRO JR. Morphofunctional alterations

in endocrine pancreas of short- and long-term dexamethasone-treated rats. **Horm Metab Res.** 2011 Apr;43(4):275-81. doi: 10.1055/s-0030-1269896.

RAMAMOORTHY, S., & CIDLOWSKI, J. A. (2016). Corticosteroids: Mechanisms of Action in Health and Disease. **Rheumatic diseases clinics of North America**, 42(1), 15-31, vii. D

RASMUSON S, OLSSON T, HENRIKSSON BG, KELLY PA, HOLMES MC, SECKL JR, et al. Environmental enrichment selectively increases 5-HT1A receptor mRNA expression and binding in the rat hippocampus. **Brain Res Mol Brain Res** 1998;53:285–90.

RENNER, M. J., & ROSENZWEIG, M. R. (1986). Social interactions among rats housed in grouped and enriched conditions. **Developmental Psychobiology**, 19(4), 303–313. doi:10.1002/dev.420190403

RICE JB, WHITE AG, SCARPATI LM, WAN G, NELSON WW. Long-term Systemic Corticosteroid Exposure: A Systematic Literature Review. **Clin Ther.** 2017 Nov;39(11):2216-2229. doi: 10.1016/j.clinthera.2017.09.011. Epub 2017 Oct 19.

ROSA PB, RIBEIRO CM, BETTIO LE, COLLA A, LIEBERKNECHT V, MORETTI M, RODRIGUES AL. Folic acid prevents depressive-like behavior induced by chronic corticosterone treatment in mice. **Pharmacol Biochem Behav.** 2014; 127: 1-6.

ROSENZWEIG, M. R., & BENNETT, E. L. (1996). Psychobiology of plasticity: effects of training and experience on brain and behavior.

Behavioural Brain Research, 78(1), 57–65. doi:10.1016/0166-4328(95)00216-2

ROSSI C, ANGELUCCI A, COSTANTIN L, BRASCHI C, MAZZANTINI M et al.: Brain-derived neurotrophic factor (BDNF) is required for the enhancement of hippocampal neurogenesis following environmental enrichment. **Eur J Neurosci** 2006, 24:1850-1856

ROY V, BELZUNG C, DELARUE C, CHAPILLON P. Environmental enrichment in BALB/c mice: effects in classical tests of anxiety and exposure to a predatory odor. **Physiol Behav** 2001; 74: 313–320.

ROY, M. et al. (1999). Stress and cognition : are corticosteroids good or bad guys? **Trends in Neurosciences**, 22(10), 422–426.
[https://doi.org/10.1016/S0166-2236\(99\)01438-1](https://doi.org/10.1016/S0166-2236(99)01438-1)

SANDI C, VENERO C, GUAZA C. Novelty-related rapid locomotor effects of corticosterone in rats. **Eur J Neurosci**. 1996 Apr;8(4):794-800.

SAINI V. (2010). Molecular mechanisms of insulin resistance in type 2 diabetes mellitus. **World journal of diabetes**, 1(3), 68-75.

SAMRA JS, CLARK ML, HUMPHREYS SM, MACDONALD IA, BANNISTER PA, et al. Effects of physiological hypercortisolemia on the regulation of lipolysis in subcutaneous adipose tissue. **J Clin Endocrinol Metab**. 1998;83:626–631

SANACORA, G., TRECCANI, G., & POPOLI, M. (2012). Towards a glutamate hypothesis of depression: An emerging frontier of

neuropsychopharmacology for mood disorders. **Neuropharmacology**, 62(1), 63–77. <https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2011.07.036>

SANDI C, LOSCERTALES M, GUAZA C. Experience-dependent facilitating effect of corticosterone on spatial memory formation in the water maze. **Eur J Neurosci**. 1997 Apr;9(4):637-42.

SANTOS, C.L.; RAFACHO, A.; BOSQUEIRO, J.R. Efeitos da administração de dexametasona in vivo sobre glicemia, insulinemia e substratos circulantes são dependentes do tempo de tratamento. **Biosci. J.**, v.23, p.101-110, 2007.

SAVARY I, DEBRAS E, DARDEVET D, SORNET C, CAPITAN P, PRUGNAUD J, MIRAND PP, GRIZARD J. 1998. Effect of glucocorticoid excess on skeletal muscle and heart protein synthesis in adult and old rats. **British Journal of Nutrition** 79 297–304. (10.1079/BJN19980047)

SC, H., & DB, D. (1995). Selectivity of cell cycle regulation of glucocorticoid receptor function. **J Biol Chem**, 7(7), 270.

SEERY MD, LEO RJ, LUPIEN SP, KONDRACK CL, ALMONTE JL. An upside to adversity?: moderate cumulative lifetime adversity is associated with resilient responses in the face of controlled stressors. **Psychological science**. 2013;24:1181–1189.

SEIBENHENER, M. L., & WOOTEN, M. C. (2015). Use of the Open Field Maze to measure locomotor and anxiety-like behavior in mice.

Journal of visualized experiments : **JoVE**, (96), e52434.

doi:10.3791/52434

SELYE, H. (1936). A Syndrome produced by Diverse Nocuous Agents. **Nature**, 138, 32.

SHELINE YI. Neuroimaging studies of mood disorder effects on the brain. **Biol Psychiatry**. 2003 Aug 1;54(3):338-52.

SEENE T, VIRU A. The catabolic effect of glucocorticoids on different types of skeletal muscle fibres and its dependence upon muscle activity and interaction with anabolic steroids. **J Steroid Biochem**. 1982 Feb;16(2):349-52.

SHEN JD, , MA LG, HU CY, PEI YY, JIN SL, FANG XY, LI YC. Berberine up-regulates the BDNF expression in hippocampus and attenuates corticosterone-induced depressive-like behavior in mice. **Neurosci Lett**. 2016; 12;614:77-82.

SHIH, J. C., CHEN, K., & RIDD, M. J. (1999). Monoamine oxidase: from genes to behavior. **Annual review of neuroscience**, 22, 197-217.

SIGWALT AR, BUDDE H, HELMICH I, GLASER V, GHISONI K, LANZA S, CADORE EL, LHULLIER FLR, DE BEM AF, HOHL A, DE MATOS FJ, DE OLIVEIRA PA, PREDIGER RD, GUGLIELMO LGA, LATINI A. Molecular aspects involved in swimming exercise training reducing anhedonia in a rat model of depression. **Neuroscience**. 2011; 192:661–674.

SIMPSON, J., & KELLY, J. P. (2011). The impact of environmental enrichment in laboratory rats—Behavioural and neurochemical aspects.

Behavioural Brain Research, 222(1), 246–264.

doi:10.1016/j.bbr.2011.04.002

SKUPIO U, TERTIL M, SIKORA M, GOLDA S, WAWRZCZAK-BARGIELA A, PRZEWLOCKI R. Behavioral and molecular alterations in mice resulting from chronic treatment with dexamethasone: relevance to depression. **Neuroscience**. 2015; 12; 286:141-50.

SLAVIN BG, ONG JM, KERN PA. Hormonal regulation of hormone-sensitive lipase activity and mRNA levels in isolated rat adipocytes. **J Lipid Res** 1994;35:1535-41

SMITH MA, MAKINO S, KVETNANSKY R, POST RM (1995) Stress and glucocorticoids affect the expression of brain-derived neurotrophic factor and neurotrophin-3 mRNAs in the hippocampus. **J Neurosci** 15:1768–1777.

SPRUIJT BM, VAN HOOFF JA, GISPEN WH. Ethology and neurobiology of grooming behavior. **Physiol Rev** 1992;72:825–52

STERU L, CHERMAT R, THIERRY B, SIMON P. The tail suspension test: a new method for screening antidepressants in mice.

Psychopharmacology (Berl). 1985;85(3):367-70.

STOKES WS. Humane endpoints for laboratory animals used in regulatory testing. **ILAR J**. 2002;43 Suppl:S31-8.

SULLIVAN, P. F., NEALE, M. C., & KENDLER, K. S. (2000).

Genetic Epidemiology of Major Depression: Review and Meta-Analysis. **American Journal of Psychiatry**, 157(10), 1552–1562.
<https://doi.org/10.1176/appi.ajp.157.10.1552>

SUTANO W, DE KLOET ER. Species-specificity of corticosteroid receptors in hamster and rat brains. **Endocrinology**. 1987;121:1405-11.

SZTAINBERG Y, KUPERMAN Y, TSOORY M, LEBOW M, CHEN A. The anxiolytic effect of environmental enrichment is mediated via amygdalar CRF receptor type 1. **Mol Psychiatry**. 2010 Sep;15(9):905-17. doi: 10.1038/mp.2009.151. Epub 2010 Jan 19.

TER HORST, J. P., DE KLOET, E. R., SCHÄCHINGER, H., & OITZL, M. S. (2011). Relevance of stress and female sex hormones for emotion and cognition. **Cellular and molecular neurobiology**, 32(5), 725-35.

TIPTON KD, WOLFE RR. Exercise, protein metabolism, and muscle growth. **Int J Sport Nutr Exerc Metab**. 2001 Mar;11(1):109-32.

TOMLINSON JW, SHERLOCK M, HUGHES B, HUGHES SV, KILVINGTON F, et al. Inhibition of 11beta-hydroxysteroid dehydrogenase type 1 activity in vivo limits glucocorticoid exposure to human adipose tissue and decreases lipolysis. **J Clin Endocrinol Metab**. 2007;92:857–864.

TURNER BB, WEAVER DA (1985) Sexual dimorphism of glucocorticoid binding in rat brain. **Brain Res** 343(1):16–23

VAN PRAAG, H., KEMPERMANN, G., & GAGE, F. H. (2000).

Neural consequences of environmental enrichment. **Nature Reviews Neuroscience**, 1(3), 191–198. doi:10.1038/35044558

VELLUCCI SV, PARROTT RF, MIMMACK ML (2001) Down-regulation of BDNF mRNA, with no effect on trkB or glucocorticoid receptor mRNAs, in the porcine hippocampus after acute dexamethasone treatment. **Res Vet Sci** 70:157–162

VIGO, D., THORNICROFT, G., & ATUN, R. (2016). Estimating the true global burden of mental illness. **The Lancet Psychiatry**, 3(2), 171–178. doi:10.1016/s2215-0366(15)00505-2

VOS, T., ALLEN, C., ARORA, M., BARBER, R. M., BHUTTA, Z. A., BROWN, A., ... CHEN, A. Z. (2016). Global, regional, and national incidence, prevalence, and years lived with disability for 310 diseases and injuries, 1990–2015: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2015. **The Lancet**, 388(10053), 1545–1602. doi:10.1016/s0140-6736(16)31678-6

WALF AA, KOONCE C, MANLEY K, FRYE CA (2009) Proestrous compared to diestrous wildtype, but not estrogen receptor beta knockout, mice have better performance in the spontaneous alternation and object recognition tasks and reduced anxiety-like behavior in the elevated plus and mirror maze. **Behav Brain Res** 196(2):254–260.

WANG, X., MAGKOS, F., & MITTENDORFER, B. (2011). Sex differences in lipid and lipoprotein metabolism: it's not just about sex

hormones. **The Journal of clinical endocrinology and metabolism**, 96(4), 885-93.

WILL B, GALANI R, KELCHE C, ROSENZWEIG MR. Recovery from brain injury in animals: relative efficacy of environmental enrichment, physical exercise or formal training (1990–2002). **Prog Neurobiol**, 2004; 72:167–182.

WONG ML, LICINIO J. Research and treatment approaches to depression. **Nat Rev Neurosci**. 2001 May;2(5):343-51.

WRAY N. et al. (2018). Genome-wide association analyses identify 44 risk variants and refine the genetic architecture of major depression. **Nature Genetics**, 50(5), 668–681. <https://doi.org/10.1038/s41588-018-0090-3>

WRÓBEL A, SEREFKO A, WLAŹ P, POLESZAK E. The depressogenic-like effect of acute and chronic treatment with dexamethasone and its influence on the activity of antidepressant drugs in the forced swim test in adult mice. **Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry**. 2014; 3;54:243-8.

XU C, HE J, JIANG H, ZU L, ZHAI W, PU S, et al. Direct effect of glucocorticoids on lipolysis in adipocytes. **Mol Endocrinol** 2009;23:1161-70.

YE, P. et al. (2008). Effects of ACTH, dexamethasone, and adrenalectomy on 11beta-hydroxylase (CYP11B1) and aldosterone

synthase (CYP11B2) gene expression in the rat central nervous system. **The Journal of endocrinology**, 196(2), 305-11.

YU, C. Y., MAYBA, O., LEE, J. V., TRAN, J., HARRIS, C., SPEED, T. P., & WANG, J. C. (2010). Genome-wide analysis of glucocorticoid receptor binding regions in adipocytes reveal gene network involved in triglyceride homeostasis. **PloS one**, 5(12), e15188.
doi:10.1371/journal.pone.0015188

ZARATE CA Jr et al. A randomized trial of an N-methyl-D-aspartate antagonist in treatment-resistant major depression. **Arch Gen Psychiatry**. 2006 Aug;63(8):856-64.

ZHANG, K., YANG, J., WANG, F., PAN, X., LIU, J., WANG, L., ... WU, C. (2016). Antidepressant-like effects of Xiaochaihutang in a neuroendocrine mouse model of anxiety/depression. **Journal of Ethnopharmacology**, 194, 674–683. doi:10.1016/j.jep.2016.10.028

ZHAO Y. MA R, SHEN J, SU H, XING D, DU L. A mouse model of depression induced by repeated corticosterone injections. **Eur J Pharmacol**. 2008;26;581(1-2):113-20.

ZHAO, Y. et al. . A mouse model of depression induced by repeated corticosterone injections. **Eur J Pharmacol**, v. 581, n. 1-2, p. 113-20, 2008.

ZOBEL AW, NICKEL T, KÜNZEL HE, ACKL N, SONNTAG A, ISING M, HOLSBOER F. Effects of the high-affinity corticotropin-releasing hormone receptor 1 antagonist R121919 in major depression:

the first 20 patients treated. **J Psychiatr Res.** 2000 May-Jun;34(3):171-81.

ZOBEL, A. W. NICKEL T, SONNTAG A, UHR M, HOLLSBOER F, ISING M. Cortisol response in the combined dexamethasone/CRH test as predictor of relapse in patients with remitted depression. A prospective study. **J. Psychiatr. Res.** 2001;35, 83–94.