

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BÁSICAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS –
FISIOLOGIA

Dissertação de Mestrado

Identificação de possíveis mecanismos envolvidos na ação da progesterona sobre o hipotálamo e o bulbo olfatório de ratas Wistar submetidas ao teste do nado forçado

Aluno

Bruno Dutra Arbo

Orientadora

Prof^ª. Dra. Maria Flávia Marques Ribeiro

Co-orientadora

Prof^ª. Dra. Helena Maria Tannhauser Barros

Porto Alegre, 2012

Agradecimentos

À minha família pelo apoio indispensável.

Às orientadoras, Prof. Dra. Maria Flávia Marques Ribeiro e Prof. Dra. Helena Maria Tannhauser Barros pelos exemplos, ensinamentos e pelos esforços na condução deste trabalho.

À CAPES e ao CNPq, pelas bolsas e pelo apoio financeiro.

À Susie de Andrade, que iniciou este projeto e possibilitou com que chegássemos até aqui.

À Gabriela Osterkamp, pelo constante apoio, compreensão e que esteve sempre presente desde o início da realização desse trabalho.

À Ana Lucia e à Gabriela Cheuiche, pelo apoio na realização da segunda parte dos experimentos.

Aos colegas Luana Ferreira Gomes, Dhãniel Baraldi e Patricia Martiny pelo auxílio na realização dos experimentos.

Aos colegas de mestrado da Fisiologia pelos 2 anos de parceria e história, e que foram fonte de motivação para a realização de todas as atividades, em especial ao coach e churrasqueiro Bruno da Rocha Berger, à presidente Luana Ferreira Gomes, ao paulista José Pedro Estrella, ao cabeludo Christiano Spindler, ao Dhãniel Baraldi e à Patricia Martiny.

Aos demais colegas da Fisiologia que de alguma forma ajudaram na realização deste trabalho.

Ao Kléber Gladiador, que acabou com o Gre-Nal.

Índice	
Abstract	4
Resumo	6
Lista de Abreviaturas	8
Lista de Figuras	9
1. Introdução	11
2. Objetivos	28
3. Material e Métodos	30
a. Experimento 1	30
b. Experimento 2	35
4. Resultados	40
a. Experimento 1	40
b. Experimento 2	54
5. Discussão	60
6. Conclusões	74
7. Referências Bibliográficas	75
Anexo I: Artigo a ser submetido para publicação	101

Abstract

Depression is a mood disorder with a high prevalence in the population, which is higher in women than in men. Previous studies showed that the chronic administration of low doses of progesterone in diestrus female rats has an antidepressive effect in the forced swimming test (FST). Depression is associated with the neurodegeneration and the cell death of some brain circuits and progesterone is a neuroprotective steroid that could at least partially prevent this neurodegeneration. Also, the physiopathology of depression involves the GABAergic and serotonergic systems, and both of them could be functionally modulated by progesterone. The laboratory animals are constantly exposed to several kinds of stressors in the laboratory routine, and stress could be an interfering factor in behavioral studies. The aim of this study was to verify the effect of progesterone in the protein expression and activation of Akt and Erk and the expression of caspase-3, SERT and GABA_A receptor $\alpha 4$ subunit in the hypothalamus and in the olfactory bulb of diestrus female rats exposed to the forced swimming test (FST). In the first experiment, diestrus female rats (n = 8/group) were randomly selected to receive a daily injection of progesterone (0.4mg/kg i.p.) or vehicle, during two complete female estrous cycles (8-10 days). On the experiment day, the animals were euthanized 30 min after the FST, and we evaluated the protein expression of Akt, Erk, caspase-3, SERT and GABA_A $\alpha 4$ subunit in the hypothalamus and in the olfactory bulb. In the second experiment, male and ovariectomized female rats (n = 6/group) were acutely and chronically exposed to the manipulation and the injection stress caused by the administration of vehicle or progesterone (0.4mg/kg i.p.), and the serum levels of corticosterone, prolactin and progesterone were evaluated. Progesterone decreased the expression of procaspase-3 in the hypothalamus, but did not change the activation of Akt and Erk and the expression of SERT in this area. Progesterone did not change the

activation and the expression of these proteins in the olfactory bulb. The treatment increased the expression of $\alpha 4$ subunit in the hypothalamus, and also changed the expression of this subunit in the olfactory bulb, increasing the expression of this subunit in the right hemisphere and decreasing this expression in the left hemisphere, creating an asymmetry in the expression of this subunit. There was not significant correlation between the expression of these proteins and the immobility behavior of these animals in the FST. In the second experiment, there was a sex difference in the seric levels of corticosterone in the acute experiment, with females showing higher levels of corticosterone than males. Also, the chronic exposure to the stressors decreased the seric levels of corticosterone and increased the seric levels of prolactin in females in relation to the acute experiment, but not in males. In summary, our results suggest that the neuroprotective effect in the hypothalamus through the reduction in the expression of procaspase-3 could be involved in the antidepressive effect of progesterone in diestrus females. The GABA_A receptor is another target for the action of progesterone, and the modulation of the expression of $\alpha 4$ subunit in the hypothalamus and in the olfactory bulb could also be related do the antidepressive effect of progesterone in the FST. There are sex differences in the neuroendocrine response to the stress generated by routine laboratory proceedings and this should be taken in consideration in the interpretation of results involving animal experimentation.

Resumo

A depressão é um transtorno comportamental com uma alta prevalência na população, a qual é maior nas mulheres do que nos homens. Estudos prévios mostraram que a administração de baixas doses de progesterona em ratas em diestro tem um efeito antidepressivo no teste do nado forçado. A depressão está associada com a neurodegeneração e a morte celular em alguns circuitos cerebrais, e a progesterona é um esteróide neuroprotetor que poderia prevenir ao menos parcialmente essa neurodegeneração. A fisiopatologia da depressão também envolve os sistemas GABAérgico e serotoninérgico, e ambos poderiam ter seu funcionamento modulado pela progesterona. Os animais de laboratório são constantemente expostos a vários tipos de estressores na rotina de laboratório, e o estresse poderia ser um fator de interferência em estudos comportamentais. O objetivo desse estudo foi verificar o efeito da progesterona na expressão protéica e na ativação da Akt e da Erk, e na expressão da caspase-3, SERT e na subunidade $\alpha 4$ do receptor GABA_A no hipotálamo e no bulbo olfatório de ratas em diestro submetidas ao teste do nado forçado. No primeiro experimento, fêmeas em diestro (n= 8/grupo) foram randomicamente selecionadas para receber uma injeção diária de progesterona (0,4mg/kg i.p.) ou veículo durante dois ciclos estrais regulares e completos (8-10 dias). No dia do experimento, os animais foram eutanasiados 30 min após o teste do nado forçado, e foram avaliadas a expressão das proteínas Akt, Erk, caspase-3, SERT e da subunidade $\alpha 4$ do receptor GABA_A no hipotálamo e no bulbo olfatório. No segundo experimento, ratos machos e fêmeas ovariectomizadas (n= 6/grupo) foram expostos ao estresse agudo e crônico ocasionado pela manipulação e pela administração de veículo ou progesterona (0,4mg/kg i.p.), e os níveis séricos de corticosterona, prolactina e progesterona foram avaliados. A progesterona reduziu a expressão da procaspase-3 no hipotálamo, mas não alterou a

ativação da Akt e da Erk, bem como a expressão do SERT nessa estrutura. A progesterona não mudou a ativação e a expressão dessas proteínas no bulbo olfatório. O tratamento aumentou a expressão da subunidade $\alpha 4$ no hipotálamo, e também alterou a expressão dessa subunidade no bulbo olfatório, aumentando a expressão dessa subunidade no hemisfério direito e diminuindo no hemisfério esquerdo, criando uma assimetria na expressão dessa subunidade. Não houve correlação significativa entre a expressão dessas proteínas e o comportamento de imobilidade desses animais no teste do nado forçado. No segundo experimento, verificamos uma diferença de sexo na secreção de corticosterona no experimento agudo, de forma que as fêmeas apresentaram níveis séricos de corticosterona maiores do que os machos. Ainda, a exposição crônica aos estressores reduziu a corticosterona sérica e aumentou a prolactina sérica nas fêmeas em relação ao experimento agudo, sem ocasionar alterações na secreção desses hormônios nos machos. Em suma, nossos resultados sugerem que o efeito neuroprotetor da progesterona no hipotálamo através da redução na expressão da procaspase-3 poderia estar envolvido no efeito antidepressivo da progesterona em fêmeas em diestro. O receptor $GABA_A$ é outra via paralela de ação da progesterona, e a modulação da expressão da subunidade $\alpha 4$ no hipotálamo e no bulbo olfatório também pode estar relacionada com seu efeito antidepressivo. Existem diferenças na resposta neuroendócrina ao estresse ocasionado por procedimentos laboratoriais de rotina, e esse fato deve ser levado em conta na interpretação dos resultados oriundos da experimentação animal.

Lista de Abreviaturas

ACTH – hormônio adrenocorticotrófico

Akt – RAC-alfa serina/treonina cinase

CRH – hormônio liberador de corticotrofinas

DHEA – desidroepiandrosterona

EDTA – ácido etilenodiamino tetra-acético

Eixo HPA – eixo hipotálamo-hipófise-adrenal

Eixo HPG – eixo hipotálamo-hipófise-gonadal

Erk – cinase regulada por sinais extracelulares

GABA – ácido γ -aminobutírico

GAD – glutamato descarboxilase

GAPDH – gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase

MAPK – proteínas cinases ativadas por mitógenos

NMDA – N-metil D-aspartato

PI3K – fosfoinositídeo-3-cinase

PMSF – fenilmetilsulfonil fluorídeo

SERT – transportador de serotonina

Lista de Figuras

Figura 1 – Efeitos da progesterona na expressão protéica da relação p-Akt/Akt no hipotálamo de ratas Wistar submetidas ao teste do nado forçado.

Figura 2 – Efeitos da progesterona na expressão protéica das enzimas p-Akt e Akt no hipotálamo de ratas Wistar submetidas ao teste do nado forçado.

Figura 3 – Efeitos da progesterona na expressão protéica da relação p-Akt/Akt no bulbo olfatório de ratas Wistar submetidas ao teste do nado forçado.

Figura 4 – Efeitos da progesterona na expressão protéica das enzimas p-Akt e Akt no bulbo olfatório de ratas Wistar submetidas ao teste do nado forçado.

Figura 5 – Efeitos da progesterona na expressão protéica da relação p-Erk/Erk no hipotálamo de ratas Wistar submetidas ao teste do nado forçado.

Figura 6 – Efeitos da progesterona na expressão protéica das enzimas p-Erk e Erk no hipotálamo de ratas Wistar submetidas ao teste do nado forçado.

Figura 7 – Efeitos da progesterona na expressão protéica da relação p-Erk/Erk no bulbo olfatório de ratas Wistar submetidas ao teste do nado forçado.

Figura 8 – Efeitos da progesterona na expressão protéica das enzimas p-Erk e Erk no bulbo olfatório de ratas Wistar submetidas ao teste do nado forçado.

Figura 9 – Efeitos da progesterona na expressão protéica da procaspase-3 no hipotálamo e no bulbo olfatório de ratas Wistar submetidas ao teste do nado forçado.

Figura 10 – Efeitos da progesterona na expressão protéica do SERT no hipotálamo e no bulbo olfatório de ratas Wistar submetidas ao teste do nado forçado.

Figura 11 – Efeitos da progesterona na expressão protéica da subunidade $\alpha 4$ do receptor GABA_A em ratas Wistar submetidas ao teste do nado forçado.

Figura 12 – Efeito agudo e crônico da manipulação e da administração de injeções de veículo e progesterona sobre os níveis séricos de progesterona.

Figura 13 - Efeito agudo e crônico da manipulação e da administração de injeções de veículo e progesterona sobre os níveis séricos de corticosterona.

Figura 14 – Efeito agudo e crônico da manipulação e da administração de injeções de veículo e progesterona sobre os níveis séricos de prolactina.

1. Introdução

O transtorno depressivo maior, também conhecido como depressão, consiste em uma grave alteração crônica do estado emocional, sendo caracterizado pela ocorrência de um estado deprimido durante grande parte do tempo, interesse diminuído ou perda de prazer para realizar as atividades de rotina, sensação de inutilidade ou culpa excessiva, dificuldade de concentração, fadiga proeminente ou perda de energia, distúrbios do sono e idéias recorrentes de morte ou suicídio (DSM IV, 2002).

As causas da depressão podem ser diversas, abrangendo fatores psicossociais, morais e biológicos (Peluso e Blay, 2008). A doença pode resultar de problemas envolvendo falhas e disfunções dos sistemas neurotransmissores do encéfalo, de uma resposta comportamental mal adaptada para o estresse social e também da influência de elementos genéticos (Barros, 1987; Choi et al., 2004). Algumas estimativas relatam que aproximadamente 20% da população experimenta algum tipo de depressão em suas vidas (Kessler et al., 1994), todavia, apesar da grande prevalência desse e de outros transtornos de humor, apenas cerca de um terço dos indivíduos que sofrem com esses transtornos são tratados (Stahl, 2000), e o tratamento de modo geral ainda é insatisfatório (Tunnicliff e Malatynska, 2003). Atualmente, dada a ineficácia no diagnóstico e tratamento de doenças como o Transtorno Depressivo Maior, países como os Estados Unidos da América registram estatísticas indicando a presença de transtorno depressivo em aproximadamente 70% dos indivíduos suicidas, e o suicídio é a sétima causa de morte mais importante nesse país (Stahl, 2000). No Brasil, dados presentes na página do Ministério da Saúde indicam a presença de aproximadamente 10 milhões de pessoas com depressão em nosso país

(http://portal.saude.gov.br/saude/visualizar_texto.cfm?idtxt=19108, acesso em 08/09/2009).

A depressão maior é mais prevalente em mulheres do que em homens, ocorrendo cerca de duas vezes mais nas mulheres (Yonkers e Brawman-Mintzer, 2002) e essa prevalência é especialmente observada entre a puberdade e o final da idade reprodutiva (Weissman et al., 1996). Flutuações nos níveis hormonais têm sido associadas a um aumento na sintomatologia depressiva, como observado em casos de depressão perimenopausal e depressão pós-parto (Schmidt et al., 2004; Freeman et al., 2004; Zanardi et al., 2007). Verificou-se que o tratamento com fluoxetina em transtornos de ansiedade e depressão pode aumentar os níveis de outros esteróides como, por exemplo, a pregnenolona sulfatada (Barret-Connor et al., 1999). Ainda, a interrupção abrupta da terapia de reposição hormonal em mulheres pode induzir rápida instalação de episódios depressivos (Stewart et al., 2004; Zanardi et al., 2007), corroborando a influência das flutuações hormonais na ocorrência desses transtornos. Além disso, pacientes com depressão apresentam níveis reduzidos de alguns esteróides como a desidroepiandrosterona (DHEA) (Fabian et al., 2001).

A progesterona é um esteróide e pode ser sintetizada no sistema nervoso central (SNC) e periférico, em células gliais e também em neurônios (Schumacher et al., 2000; Plassart-Schiess e Baulieu, 2001; Stoffel-Wagner, 2003) a partir do colesterol ou a partir de precursores esteróides importados de estruturas periféricas que são metabolizados “*in situ*” (Baulieu, 1998; Dubrovsky, 2006). A progesterona tem sido classificada como um esteróide neuroativo, nomenclatura que se refere a esteróides que, independentemente de sua origem, tem capacidade de modificar a atividade neural (Dubrovsky, 2006). Ainda, ela é um composto com papel fundamental em diversas

funções do organismo animal, como desenvolvimento, diferenciação, metabolismo e reprodução de fêmeas de várias espécies (Pluchino et al., 2006).

A progesterona atua ocasionando tanto efeitos genômicos como efeitos não-genômicos (Rupprecht, 2003). A progesterona, sendo um esteróide, atravessa a membrana plasmática e atua em receptores intracelulares, ocasionando seus efeitos genômicos a longo-prazo, os quais levam de minutos até algumas horas para serem realizados, sendo esta a sua via clássica de ação. Os receptores de progesterona atuam como fatores de transcrição, regulando a expressão de genes de redes neurais para o início ou para a manutenção de respostas fisiológicas (Mani, 2008). Classicamente, esses receptores se apresentam sob duas isoformas, os receptores de progesterona A e os receptores de progesterona B, que diferem em relação a sua estrutura e, conseqüentemente, na sua resposta à progesterona e funcionamento, regulando genes-alvo distintos (Mani, 2008). Além disso, a progesterona ainda pode atuar ocasionando efeitos não-genômicos, com ação mais rápida que seus efeitos clássicos, necessitando de milissegundos até poucos segundos para serem observados. Muitos desses efeitos são mediados por metabólitos da progesterona, como por exemplo a alopregnanolona, e esses efeitos incluem a modulação da excitabilidade neuronal através de ações na superfície celular e efeitos moduladores sobre a função e composição de alguns receptores, como por exemplo os receptores serotoninérgicos e o receptor GABA_A (Rupprecht, 2003).

Vários autores têm investigado os efeitos comportamentais de hormônios e outros fármacos na depressão. Dentre os diversos modelos existentes para a realização desses estudos, destacamos o modelo do nado forçado. O teste do nado forçado é um modelo animal clássico (Porsolt et al., 1977) usado para testar o efeito antidepressivo de fármacos. Sucintamente, os animais são colocados individualmente em aquários de

vidro opaco com água, impossibilitados de se apoiarem com as patas ou com a cauda no fundo do aquário, não existindo possibilidade de fuga. Neste modelo, após um período inicial de nado vigoroso, os animais passam a executar apenas movimentos para manter a cabeça fora da água. Este comportamento de imobilidade é interpretado como perda de motivação, ou “desespero comportamental”. A redução da duração da imobilidade por um fármaco é considerada como efeito antidepressivo (Porsolt et al., 1977).

Os efeitos ocasionados pela administração de progesterona a animais submetidos ao teste do nado forçado ainda não estão claros. Um estudo verificou que a administração de progesterona a camundongos fêmeas aumentou a sua imobilidade no teste do nado forçado, ou seja, aumentou o comportamento tipo depressivo desses animais (Kaur e Kulkarni, 2002). Contraditoriamente, outros autores demonstraram que a administração de progesterona reduziu o comportamento tipo depressivo de ratos (Martínez-Mota et al., 1999; Molina-Hernández et al., 2000; Molina-Hernández e Téllez-Alcántara., 2001). Da mesma forma, a administração intraseptal de progesterona diminuiu a imobilidade de ratas ovariectomizadas em outro estudo, e esse efeito foi bloqueado por um antagonista do receptor GABA_A (Estrada-Camarena et al., 2002). Estudos utilizando modelos de pseudoprenhez por administração de progesterona e modelos de retirada desse esteróide mostraram que altos níveis de progesterona parecem proteger contra a depressão, pois a interrupção da sua administração aumentou a imobilidade de ratas ovariectomizadas e camundongos (Stoffel e Craft, 2004; Beckley e Finn, 2007). Muitos efeitos da progesterona no SNC que resultam na modulação do comportamento tipo depressivo têm relação com a sua conversão em alopregnanolona, pois a administração de finasterida, um inibidor dessa conversão, ocasionou aumento no tempo de imobilidade de ratas em proestro e ratas ovariectomizadas (Walf et al., 2006). Também, camundongos *knockout* para a enzima 5-alfa-redutase, responsável pela

metabolização da progesterona que irá resultar posteriormente na formação de alopregnanolona, apresentaram maior imobilidade em relação aos camundongos tipo selvagem após a administração de progesterona (Frye et al., 2004). Além disso, um estudo recente realizado em camundongos selvagens e em camundongos *knockout* para o receptor de progesterona verificou uma redução no comportamento tipo depressivo de ambos os grupos, sugerindo que o efeito antidepressivo da progesterona seria independente da sua ação clássica via o seu receptor de progesterona (Frye, 2011).

Diversas estruturas encefálicas estão envolvidas na fisiopatologia de transtornos comportamentais como a depressão. O hipotálamo é uma estrutura encefálica localizada na parte ventral do diencéfalo, envolvida no controle do sistema neurovegetativo e da hipófise. Diversos estudos têm abordado a relação do hipotálamo com a depressão e distúrbios bipolares, destacando principalmente aspectos relativos à neurodegeneração nesse local e ainda a sua importância dentro do funcionamento do eixo hipotalâmico-hipofisário-adrenal (Manaye et al., 2005; Raone et al., 2007; Bao et al., 2008). O bulbo olfatório é uma estrutura derivada do telencéfalo localizada na parte anterior do encéfalo, que recebe aferências de neurônios olfativos e que também se relaciona com a fisiopatologia da depressão, e o modelo de bulbectomia é um modelo de depressão bem estabelecido em ratos (Roche et al., 2007; Wierónska et al., 2008).

A neurodegeneração normalmente é abordada no contexto de déficits motores ou cognitivos. Entretanto, tem sido sugerido que as psicopatologias também podem envolver a degeneração funcional de sistemas neurais centrais críticos (Benninghoff et al., 2002; Bethea et al., 2009), e há uma série de evidências associando a depressão com mudanças marcantes no número e no tamanho de neurônios e de células da glia em diferentes regiões encefálicas (Manji e Duman et al., 2001; Campbell e MacQueen, 2006). Eventos estressores também estão relacionados com a atrofia e com o aumento

da apoptose em algumas regiões encefálicas, e o tratamento com antidepressivos poderia reverter esse aumento na apoptose (Fuchs et al., 2004).

Vários estudos presentes na literatura indicam que os hormônios ovarianos são neuroprotetores (Simpkins et al., 2005; Singh et al., 2008). A progesterona aumenta a atividade de algumas vias de sinalização envolvidas com estímulos pró-sobrevivência em diferentes áreas cerebrais, promovendo a fosforilação da Akt e a fosforilação da Erk, componentes das vias da fosfoinositídeo-3-cinase (PI3K) e das proteínas cinases ativadas por mitógenos (MAPK), respectivamente (Kaur et al., 2007; Guerra-Araiza et al., 2009). A Akt é uma serina/treonina cinase da via da PI3K, sendo um importante mediador da sobrevivência celular (Bryant et al., 2006). Quando ativada, essa enzima estimula substratos envolvidos na sobrevivência celular e inibe substratos pró-apoptóticos, como a Bad e a caspase-9, inibindo a apoptose e contribuindo para a sobrevivência celular (Cardone et al., 1998, Kim et al., 2007; Nair e Olanow, 2008). A Erk é uma cinase da via das MAPK que é ativada preferencialmente por estímulos mitogênicos como fatores de crescimento e citocinas, exercendo um papel fundamental na regulação do crescimento, da sobrevivência e da diferenciação celular (Fan et al., 2007). Já foi demonstrado que alguns antidepressivos promovem neurogênese e crescimento neuronal através da via das MAPK (Hunsberger et al., 2009), e que o bloqueio dessa via produz efeitos pró-depressivos em contraponto aos efeitos produzidos pelos antidepressivos (Duman et al., 2007). Além disso, a progesterona pode reduzir a atividade da enzima caspase-3, que é considerada a caspase efetora central e final, sendo responsável pela maior parte da apoptose biológica, em neurônios serotoninérgicos localizados na rafe dorsal de macacos (Tokuyama et al., 2008). Entretanto, esses efeitos neuroprotetores da progesterona e sua conexão com a depressão ainda não são completamente conhecidos, uma vez que eles podem ser

espécie-dependentes e dose-dependentes, e podem modular a sobrevivência neuronal apenas em algumas regiões específicas.

Além da sua relação com a neurodegeneração de certos circuitos neurais, a fisiopatologia dos transtornos depressivos também apresenta uma relação muito importante com a disfunção de alguns sistemas neurotransmissores. Por muitos anos, a principal teoria para a explicação das bases biológicas da depressão foi a hipótese monoaminérgica da depressão (Hindmarch, 2002). Segundo essa hipótese, a base biológica da depressão seria uma deficiência de um ou mais dos três sistemas neurotransmissores que mediarão as ações terapêuticas da grande maioria dos antidepressivos conhecidos: norepinefrina, dopamina e serotonina. Dentro desse contexto, o desenvolvimento dos inibidores seletivos da recaptação da serotonina representou um grande avanço dentro da farmacoterapia dos distúrbios psiquiátricos, sendo efetivos dentro do tratamento de uma série de transtornos, inclusive vários tipos de depressão (Goodnick et al., 2000).

Os inibidores da recaptação da serotonina atuam bloqueando o transportador de serotonina (SERT), inibindo a recaptação da serotonina presente na fenda sináptica para o interior do terminal pré-sináptico, aumentando a concentração de serotonina na fenda sináptica e prolongando sua atuação sobre os receptores pós-sinápticos (Birzniece et al., 2006). A atuação desses fármacos produz efeitos antidepressivos (Cipriani et al., 2008) e ansiolíticos (Bechtholt et al., 2008), além de poder atuar na redução do comportamento de medo (Miyata et al., 2007).

Além de ser alvo da ação de uma série de fármacos, o sistema serotoninérgico também é alvo da ação de hormônios esteróides, citocinas, neuropeptídeos e fatores de crescimento, de forma que todos esses compostos têm a capacidade de modular a neurotransmissão serotoninérgica (Smith et al., 2004). No que diz respeito aos

hormônios esteróides, vários estudos tem sido feitos no sentido de elucidar a atuação dos hormônios ovarianos sobre componentes envolvidos na síntese, no transporte e na degradação da serotonina. Alguns estudos realizados em macacas já relataram que os hormônios ovarianos aumentam a expressão da triptofano-hidroxilase, enzima limitante responsável pela síntese de serotonina, e reduzem a expressão da monoamina oxidase A (MAO-A), enzima responsável pela degradação da serotonina (Gundlah et al., 2002; Sanchez et al., 2005). Todavia, os efeitos dos hormônios ovarianos sobre o SERT são controversos. A administração aguda de estradiol em ratas ovariectomizadas aumentou a expressão do mRNA e da proteína do SERT no núcleo da rafe dorsal, assim como a densidade dos sítios de ligação do SERT na amígdala, no hipotálamo, no tálamo e no septo, porém diminuiu essa densidade no hipocampo (Mendelson et al., 1993; McQueen et al., 1997; Sumner et al., 1999). A administração de estrógeno por dois dias aumentou o *binding* do SERT na amígdala basolateral, no hipotálamo ventromedial e no hipocampo (Krajnak et al., 2003). A administração crônica de estradiol diminuiu o mRNA do SERT no mesencéfalo de ratos, enquanto a sua *down-regulation* no hipotálamo induzida por ovariectomia foi revertida pelo tratamento com estradiol, progesterona, ou a combinação de ambos (Attali et al., 1997; Zhou et al., 2002; Lu et al., 2003). Em primatas, por sua vez, a administração de estrógeno combinada ou não com progesterona não alterou a expressão protéica do SERT após um mês, porém aumentou sua expressão após cinco meses (Smith et al., 2004). Além disso, enquanto a maior parte desses estudos observou a atuação do estrógeno, em combinação ou não com a progesterona, sobre a modulação do SERT, poucos estudos abordaram a ação direta da progesterona e seus metabólitos sobre a modulação dessa proteína. Dessa forma, são necessários novos estudos com foco sobre os efeitos da progesterona sobre a modulação do SERT.

A hipótese monoaminérgica da depressão, porém, não consegue prover uma base biológica sólida o suficiente para elucidar completamente as causas desse transtorno, uma vez que é significativo o número de pacientes não responsivos a fármacos que atuam no sistema serotoninérgico (Shors e Leuner, 2003). Dessa forma, na busca de outras teorias complementares para a explicação da fisiopatologia da depressão, emerge a importância do sistema GABAérgico dentro do estudo desse distúrbio.

Sinapses GABAérgicas, diferentemente de outras sinapses inibitórias do SNC, estão presentes em abundância em todas as regiões do encéfalo, constituindo aproximadamente um terço de todas as sinapses (Tunnicliff e Malatynska, 2003). Devido à grande relação existente entre estas sinapses e outros sistemas neurotransmissores, tais como as vias monoaminérgica e colinérgica (Onténiente et al., 1987; Login et al., 1998), o sistema GABAérgico está bastante propenso a associações com distúrbios comportamentais, especialmente com a depressão (Tunnicliff e Malatynska, 2003; Brambilla et al., 2003; Eser et al., 2006). Alguns autores verificaram que os níveis das enzimas responsáveis pela síntese do GABA, a GAD 65 e a GAD 67, encontram-se reduzidos em pacientes que sofrem de depressão (Fatemi et al., 2005), corroborando a associação entre o sistema GABAérgico e os distúrbios comportamentais.

O ácido γ -aminobutírico (GABA) é um composto sintetizado pela descarboxilação do glutamato, catalisada pela enzima glutamato descarboxilase (GAD), que pode atuar em diferentes tipos de receptores (Freichel et al., 2006). O receptor GABA_A é um canal iônico dependente de ligante envolvido na rápida transmissão inibitória no SNC e é alvo de importantes fármacos neuroativos como os benzodiazepínicos (Wallner et al., 2003). A maioria dos receptores GABA_A de

mamíferos são constituídos por subunidades (α 1-6, β 1-3, γ 1-3, δ , ϵ , θ) que ficam dispostas em um arranjo pentamérico, usualmente compostos por duas subunidades α , duas subunidades β e uma subunidade γ ou δ (Baur et al., 2006; Olsen et al., 2007). Essa forma de arranjo com três diferentes subunidades permite uma enorme diversidade na composição do receptor, embora se saiba que o número de subtipos farmacológicos desse receptor presente em mamíferos seja limitado (Barnard et al., 1998; Olsen et al., 2007). Fatores como os diferentes tipos celulares e regiões encefálicas envolvidas em cada caso, além de flutuações hormonais do organismo, são determinantes da expressão de diferentes conformações referentes às subunidades que compõem o receptor GABA_A, e a conformação desse receptor está diretamente relacionada com particularidades em relação ao seu funcionamento. (De Blas, 1996; Follesa et al., 2005; Griffiths e Lovick 2005a, 2005b).

A subunidade α 4 do receptor GABA_A tem uma expressão relativamente baixa no sistema nervoso central, porém alguns estudos já demonstraram a presença da expressão dessa subunidade no hipotálamo e no bulbo olfatório de ratos (Laurie et al., 1992; Wisden et al., 1992). Essa subunidade pode estar presente tanto em receptores sinápticos (Chandra et al., 2006) quanto em receptores extrasinápticos (Liang et al., 2006), e sua expressão torna o receptor insensível à modulação por benzodiazepínicos (Wafford et al., 1996; Benke et al., 1997), sendo fundamental dentro de uma série de transtornos de humor (Smith et al., 2007), embora seu papel dentro da fisiopatologia da depressão ainda não esteja completamente esclarecido.

Alguns metabólitos da progesterona, como a alopregnanolona, atuam como potentes moduladores positivos do receptor GABA_A, contribuindo para uma maior inibição do SNC. De modo geral, a ação desses compostos no receptor GABA_A produz efeitos ansiolíticos, anticonvulsivantes, antidepressivos e sedativos (Walf et al., 2006;

Morrow, 2007; Nim et al., 2008). A ação desses esteróides, todavia, costuma ser específica conforme a região encefálica envolvida (Herd et al., 2007), fazendo-se necessários mais estudos envolvendo as mais diversas regiões encefálicas para a melhor elucidação desses efeitos.

O sistema GABA também está relacionado com a sinalização intracelular no SNC. Sabe-se que o receptor GABA_A é um dos alvos da ação da enzima Akt, uma cinase que pode fosforilar esse receptor e aumentar a translocação desses receptores do interior das células para a membrana celular (Wang et al., 2003). Um estudo recente já demonstrou que a exposição ao estresse aumenta as correntes pós-sinápticas inibitórias mediadas pelo receptor GABA_A na área tegmental ventral, e esse efeito provavelmente também é realizado pela via da PI3K/Akt (Margolis et al., 2011). Além disso, tem-se visto que os receptores GABA_A e GABA_B são fundamentais dentro da modulação da sobrevivência celular em modelos de isquemia cerebral, de forma que agonistas desses receptores exercem efeitos neuroprotetores dentro desse contexto (Xu et al., 2008). Por fim, sabe-se que alguns dos efeitos neuroprotetores induzidos pela alopregnanolona e por uma série de neuroesteróides análogos a ela no SNC são acompanhados por mudanças na expressão de algumas subunidades do receptor GABA_A (Xilouri e Papazafiri, 2006; Xilouri et al., 2007), de forma que esses efeitos poderiam ser importantes dentro de possíveis alterações comportamentais induzidas pela administração de neuroesteróides.

Os efeitos da administração da progesterona e seus metabólitos sobre a expressão da subunidade $\alpha 4$ são paradoxais. Sabe-se que na puberdade, com o aumento da secreção dos hormônios sexuais, ocorre um aumento na expressão dessa subunidade no hipocampo de roedores (Shen et al., 2007). A administração de progesterona por três dias aumentou a expressão dessa subunidade no hipocampo de ratas, porém, a

administração do mesmo tratamento por sete dias reduziu a expressão dessa mesma subunidade (Gulinello et al., 2001). Outro estudo também mostrou que a administração de alopregnanolona durante três dias também aumenta a expressão dessa subunidade no hipocampo (Shen et al., 2005). Todavia, Nim et al., (2008) não verificaram alteração na expressão dessa subunidade após a administração aguda de alopregnanolona, e alguns autores já demonstraram um aumento na expressão dessa subunidade em modelos de retirada de progesterona no encéfalo de ratos (Smith et al., 1998).

O estresse é outro fator muito importante dentro do estudo comportamento e do sistema GABAérgico e amplamente presente na rotina da experimentação animal. Estudos prévios realizados em nosso laboratório sugerem que o estresse ocasionado pela administração de injeções e pela exposição dos animais ao teste do nado forçado para a avaliação do seu comportamento tipo-depressivo poderiam alterar os níveis de corticosterona (Andrade et al., 2007), um hormônio diretamente relacionado ao estresse, bem como a expressão de subunidades do receptor GABA_A em diferentes estruturas encefálicas de ratos (Andrade, 2010b), o que poderia ter uma relação direta com os resultados comportamentais observados nesses trabalhos, tornando o estresse outro fator de interesse dentro deste estudo.

O estresse mobiliza um complexo espectro de respostas adaptativas fisiológicas e comportamentais. Essas modificações podem habilitar o organismo a lidar mais eficientemente com a situação estressora e restaurar a homeostase. No entanto, se a situação estressora torna-se crônica e não-controlável, ela pode gerar uma desregulação nos sistemas neurobiológicos responsivos ao estresse (de Kloet et al., 2005; Biggio et al., 2007), e essa desregulação pode levar a uma maior predisposição a transtornos relacionados à ansiedade, à depressão e à agressão em roedores e humanos (Patchev et al., 1991; Brambilla et al., 2003; de Kloet et al., 2005).

O eixo hipotálamo-hipófise-adrenal (HPA) é a principal via efetora do sistema neuroendócrino de resposta ao estresse. Nesta via, o hipotálamo secreta o hormônio liberador de corticotrofina (CRH), que estimula a adeno-hipófise a secretar o hormônio adrenocorticotrófico (ACTH). O ACTH, por sua vez, estimula o córtex das glândulas adrenais a secretarem glicocorticóides, entre outros hormônios. O principal esteróide da adrenal envolvido na resposta ao estresse nos humanos é o cortisol e nos roedores é a corticosterona, sendo esse um marcador clássico de estresse utilizado em vários modelos experimentais (Patchev et al., 1991; Asai et al., 2004; Serra et al., 2005). O estresse ativa o sistema nervoso simpático e o eixo HPA, e, dentro de um a cinco minutos, ocorre um rápido aumento nos níveis plasmáticos de catecolaminas. O pico de secreção do ACTH é observado entre cinco e 15 minutos após a exposição ao agente estressor, sendo seguido por um pico plasmático de liberação dos glicocorticóides da adrenal cerca de 15 minutos depois. Os sistemas neuroendócrinos retornam à sua condição basal entre 24 e 72 horas após a exposição ao estresse (Olfe et al., 2010).

A resposta da corticosterona ao estresse é dependente do sexo, da duração e do tipo de estressor. Nosso laboratório já demonstrou a presença de diferenças sexuais em relação aos níveis de corticosterona plasmática secretadas após o estresse agudo causado pela administração de injeções e pelo teste de natação forçada em ratos, bem como a existência de um componente temporal importante relacionado à resposta do eixo HPA à exposição aguda ou crônica a um mesmo estressor (Andrade et al., 2007). Outros estudos também têm abordado as mudanças na secreção de corticosterona em resposta a diferentes agentes estressores, como, por exemplo, o estresse ocasionado por procedimentos laboratoriais de rotina, como, por exemplo, o transporte, a pesagem, a manipulação, e a administração de injeções, o estresse por contenção, o estresse causado pelo isolamento social e o estresse ocasionado pela privação do sono (Balcombe et al.,

2004; Labruto et al., 2005; Olfe et al., 2010; Ren et al., 2010; Reis et al., 2011; Wu et al., 2011).

Outro importante hormônio relacionado ao estresse é a prolactina. A prolactina é um hormônio secretado por células especializadas da adenohipófise, os lactotrofos. Além das suas funções clássicas relacionadas à reprodução e à lactação, sabe-se que a prolactina apresenta uma relação importante com o estresse, tendo sua secreção alterada após diferentes formas de estresse físico ou emocional, tendo sua secreção alterada até mesmo por procedimentos como o transporte, a manipulação e a administração de injeções (Balcombe et al., 2004). Apesar do ACTH normalmente ser considerado como o principal regulador da secreção dos hormônios do córtex das adrenais, estudos prévios mostraram que a prolactina poderia atuar diretamente sobre as adrenais e estimular a secreção de corticosterona (Kaminska et al., 2002; Lo et al., 2003; Silva et al., 2004), e também já se identificou a expressão de receptores de prolactina no córtex adrenal de roedores e humanos (McDonough e Ewig, 1982; Ouhtit et al., 1993; Glasow et al., 1996). Também, sabe-se que alterações na secreção de prolactina modulam a função do eixo HPA, com a hiperprolactinemia estimulando o funcionamento do hipotálamo, da hipófise e das adrenais, e, em contra-partida, a hipoprolactinemia aparentemente inibindo o funcionamento desse eixo (Kooy et al., 1990; Weber e Calogero, 1991). Outros estudos ainda observaram que essas condições também apresentam um efeito regulatório sobre a secreção de progesterona em resposta ao estresse, com essa secreção sendo maior em animais com hiperprolactinemia em relação a animais com hipoprolactinemia em resposta ao estresse agudo em um modelo de contenção (Jaroenporn et al., 2007). Dessa forma, esses dados apontam para uma possível regulação exercida pela prolactina sobre a secreção de corticosterona e de progesterona em resposta ao estresse.

A progesterona e seu metabólito alopregnanolona são outros hormônios também responsáveis ao estresse, de forma que suas concentrações podem ser alteradas de acordo com o tipo de estresse. A ativação do eixo HPA estimula a secreção de progesterona, sendo que ela também pode se converter em corticosterona e é outro componente fundamental dentro da resposta neuroendócrina ao estresse (Serra et al., 2008; Andrade et al., 2010a; Ren et al., 2010; Ter Horst et al., 2011). Em modelos experimentais envolvendo a exposição aguda ao estresse ocasionado por contenção, choque nas patas ou por inalação de CO₂, observou-se um aumento nos níveis circulantes de progesterona e de alopregnanolona (Barbaccia et al., 1997; Serra et al., 2000; Jaroenporn et al., 2007), enquanto em modelos de estresse crônico provocado pelo isolamento social foi encontrada uma diminuição nos níveis plasmáticos e cerebrais desses esteróides associados a um efeito ansiolítico e a um aumento do comportamento agressivo (Serra et al., 2000; Serra et al., 2008). Além da sua relação com o estresse e os comportamentos de ansiedade e agressividade, a progesterona e seus metabólitos apresentam uma relação muito importante com o comportamento tipo-depressivo conforme previamente discutido (Andrade et al., 2010a; Frye, 2011).

A depressão é um transtorno cuja neurobiologia envolve uma série de vias de sinalização em diferentes estruturas encefálicas, sendo que atualmente pelo menos cinco sistemas hipotalâmicos peptidérgicos e três sistemas neurotransmissores aminérgicos que inervam o hipotálamo têm sido associados com a sua sintomatologia. Esse transtorno normalmente é considerado um resultado da interação dos estressores do ambiente com um fator genético de predisposição a essa doença, sendo que o eixo HPA, um sistema chave no controle da resposta ao estresse, é considerado uma via final comum no que diz respeito a manifestação de grande parte da sintomatologia depressiva (Swaab et al., 2005). A maior parte dos fatores de risco genéticos e ambientais para a

depressão se correlaciona com um aumento da ativação do eixo HPA na vida adulta, corroborando a relação do estresse com a depressão, enquanto o tratamento desses indivíduos com antidepressivos restaura a função normal desse eixo (Nemeroff, 1996). Outro fato interessante é o de que a resposta ao estresse, assim como a depressão, também apresenta um componente sexual importante, e isso poderia ter relação com a maior resposta afetiva negativa ao estresse por parte de indivíduos do sexo feminino em relação a indivíduos do sexo masculino (Ordaz e Luna, 2012).

A maioria dos compostos que são utilizados na área clínica como antidepressivos atualmente são inibidores seletivos da recaptção da serotonina ou da norepinefrina. De modo geral, são necessárias cerca de pelo menos três semanas de tratamento com esses fármacos para o início dos seus efeitos antidepressivos (Paul, 2001). Todavia, apesar de esses compostos serem efetivos em uma série de casos de depressão, o tratamento em geral ainda é insatisfatório (Tunnicliff e Malatynska, 2003). Assim como uma série de outras doenças, a depressão também é uma doença multifatorial, envolvendo uma série de sistemas neurotransmissores e vias de sinalização molecular dentro da sua fisiopatologia (Millan, 2006). Dessa forma, tem crescido o debate em torno do uso de antidepressivos de amplo espectro, que atuam em mais de um sistema neurotransmissor (por exemplo, inibindo simultaneamente a recaptção da norepinefrina, da serotonina e da dopamina, ou ainda atuando sobre o sistema GABAérgico) ou em outras áreas e vias de sinalização do SNC, como por exemplo em enzimas de sinalização intracelular envolvidas com o estresse e com a integridade neuronal, visando o combate à depressão (Skolnick et al, 2003; Millan, 2006; Millan, 2009).

O uso de antidepressivos de amplo espectro seria positivo basicamente devido ao fato de combaterem a depressão em uma série de sistemas e vias que estão envolvidas

na sua fisiopatologia, uma vez que é uma doença multifatorial, e, assim, eles poderiam diminuir o tempo de tratamento necessário para o surgimento dos primeiros efeitos desse fármaco no combate a essa doença em comparação com as três semanas normalmente necessárias quando se utilizam os antidepressivos tradicionais (Skolnick et al., 2003).

Dessa forma, uma vez que a progesterona modula o comportamento tipo depressivo e ainda se relaciona com uma série de fatores envolvidos na fisiopatologia da depressão, o objetivo deste estudo foi identificar as possíveis vias envolvidas na ação da progesterona sobre o comportamento tipo depressivo.

2. Objetivos

2.1 Objetivos Gerais

Este trabalho teve como objetivo verificar os efeitos da progesterona sobre a modulação de vias de neuroproteção celular e dos sistemas GABAérgico e serotoninérgico no encéfalo de ratas Wistar em diestro submetidas ao teste do nado forçado e o envolvimento de hormônios relacionados ao estresse nesses efeitos.

2.2 Objetivos Específicos

- Verificar a influência da administração de progesterona sobre a expressão proteica das enzimas Akt, Erk e caspase-3 no hipotálamo e bulbo olfatório de ratas Wistar submetidas ao teste do nado forçado.
- Verificar a influência da administração de progesterona sobre a expressão proteica do SERT no hipotálamo e bulbo olfatório nos mesmos grupos experimentais.
- Verificar a influência da administração de progesterona sobre a expressão proteica da subunidade $\alpha 4$ do receptor GABA_A no hipotálamo e bulbo olfatório.
- Verificar a presença ou não de assimetria na expressão dessas proteínas no bulbo olfatório de ratas Wistar.
- Correlacionar o comportamento tipo-depressivo com a expressão das diferentes enzimas componentes das vias de sinalização intracelular, com a expressão da subunidade $\alpha 4$ do receptor GABA_A e com a expressão do SERT no hipotálamo e no bulbo olfatório de ratas Wistar.

- Verificar o efeito agudo e crônico da manipulação e da administração de injeções de veículo e progesterona sobre os níveis séricos de corticosterona, prolactina e progesterona.

- Verificar a presença ou não de diferenças sexuais envolvidas na resposta a esses agentes estressores.

- Verificar a influência do tempo de exposição a esses agentes estressores sobre a secreção de corticosterona, prolactina e progesterona.

3. Materiais e Métodos

3.1 Experimento 1: Efeitos da progesterona sobre a modulação das vias de neuroproteção celular e dos sistemas GABAérgico e serotoninérgico no encéfalo de ratas Wistar submetidas ao teste do nado forçado.

3.1.1 Animais

Foram utilizadas 20 ratas Wistar adultas em diestro, pesando aproximadamente 250g, com média de 75 dias de idade no início dos experimentos, provenientes do biotério da Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre (UFCSPA). Os animais foram mantidos em gaiolas de polipropileno (40x33x17cm) e separados em grupos de quatro ratos por gaiola, com livre acesso à ração e água. Os animais permaneceram em ambiente controlado, sob ciclo claro/escuro de 12 horas (das 7 h às 19 h) e temperatura ambiental de $22 \pm 2^{\circ}$ C. Todos os protocolos utilizados estão de acordo com o Guia de Cuidado e Uso de Animais de Laboratório do National Institute of Health (NIH) e o projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal da UFCSPA e pela Comissão de Ética no Uso de Animais da UFRGS (CEUA/UFRGS). Todos os esforços foram realizados para minimizar o sofrimento dos animais e foi utilizado apenas o número suficiente de animais para produzir dados científicos confiáveis.

3.1.2 Ciclo Estral

O ciclo estral das fêmeas foi acompanhado mediante esfregaço vaginal diário, segundo a técnica de Evans e Long (1922). Os esfregaços foram obtidos por lavagem vaginal diária com solução salina utilizando-se ponteiros descartáveis de pipetas

automáticas acopladas a pequenas peras de sucção. O material obtido pelo esfregaço vaginal foi analisado a fresco em microscópio óptico durante duas a três semanas antes do início do procedimento experimental. Foram utilizadas fêmeas na fase de diestro II que apresentaram de dois a três ciclos regulares completos.

3.1.3 Fármacos e Tratamento

Os animais previamente selecionados foram alocados aleatoriamente em dois grupos conforme o tratamento: veículo e progesterona (n= 10/grupo). De acordo com experimentos prévios realizados em nosso laboratório, a dose de progesterona (Sigma) utilizada nesse experimento foi de 0,4 mg/kg/dia intraperitoneal (i.p.), a qual foi dissolvida em 1-2 gotas de Tween 80 e salina. O grupo veículo recebeu o mesmo veículo usado para a progesterona. O tempo de tratamento dos animais correspondeu a dois ciclos estrais regulares e completos, podendo variar entre oito e dez dias, tendo em vista a variabilidade temporal presente na duração da fase de diestro II. As soluções foram preparadas no máximo vinte e quatro horas antes do experimento e armazenadas a 4°C. Todas as soluções foram administradas em um volume de 1 mL/kg de peso do animal.

3.1.4 Nado Forçado

Dentre os modelos animais utilizados para o estudo da depressão, destaca-se o modelo animal que utiliza o teste do nado forçado (Porsolt et al., 1977). Nessa metodologia, os animais são colocados individualmente em aquários de vidro opaco (25 x 25 x 40 cm) com água a $25 \pm 1^\circ \text{C}$ até uma altura de 27 cm, para impossibilitar que os

animais se apoiem com as patas ou com a cauda no fundo do aquário, sem existir nenhuma possibilidade de fuga do aquário. No primeiro dia de tratamento, os animais foram submetidos a um treino de 15 minutos dentro do modelo do nado forçado, sendo posteriormente retirados, secos e recolocados em suas gaiolas. No último dia relativo ao período de tratamento, os animais foram submetidos ao teste propriamente dito, com duração de 5 minutos, e que foi gravado em vídeo para posterior análise etológica.

Depois de colocados nos aquários, os animais submetidos ao teste apresentam um período inicial de nado vigoroso, em que procuram alguma rota de fuga dentro do aquário devido ao estresse ocasionado pelo modelo aos animais. Posteriormente, eles passam a executar apenas movimentos para manter a cabeça fora da água. Este comportamento de imobilidade é interpretado como perda de motivação ou desespero comportamental. A redução da duração da imobilidade ocasionada por um fármaco é considerada como efeito antidepressivo (Porsolt et al., 1977). Os dados comportamentais dos animais utilizados nesse estudo não serão apresentados nesse trabalho, uma vez que já foram publicados (Andrade et al., 2010a).

Para detectar eventuais alterações motoras que pudessem comprometer as observações comportamentais no teste do nado forçado, os animais foram colocados em caixas de locomoção. O teste de locomoção foi realizado imediatamente antes do teste do nado forçado, com duração de cinco minutos. Estas caixas (30 x 30 x 72 cm) apresentam três células fotossensíveis dispostas longitudinalmente, que captam o número de cruzamentos do animal. Existe um contador digital ligado a cada caixa que fornece o registro numérico destas passagens.

3.1.5 Eutanásia e Coleta dos Tecidos

Os animais foram eutanasiados por decapitação 30 minutos após o Teste do Nado Forçado e o hipotálamo e o bulbo olfatório direito e esquerdo foram dissecados e coletados assepticamente em microtubos, sendo imediatamente congelados em nitrogênio líquido e posteriormente armazenados a -80°C para posterior análise molecular.

3.1.6 Western Blotting

As amostras foram homogeneizadas na presença de um tampão de lise (NaCl 150mM, Tris 20mM, EDTA 5mM, glicerol 10%, NP 40 10% e PMSF 1mM, pH de 7,4). Em seguida, os homogeneizados foram centrifugados por 10 minutos a 7000xg em centrífuga refrigerada (Sorvall RC 5B-Rotor SM 24) e o sobrenadante foi retirado e congelado em freezer a -20°C. As proteínas foram quantificadas pelo método de Bradford (1976). Após a quantificação de proteínas, foi utilizado o sistema mini-protean (Bio-Rad) para a separação das proteínas por eletroforese em gel SDS-PAGE (poliacrilamida com dodecil sulfato de sódio). As amostras (80 µg de proteína) foram preparadas com tampão de carga (Tris 65 mM, SDS 10%, glicerol 50%, azul de bromofenol 0,03% e β-mercaptoetanol 1:20, pH de 6,8) e colocadas em cada canaleta para a realização da eletroforese, que foi realizada na presença do tampão de corrida (glicina 192 mM, Tris 25 mM e SDS 0,1%, pH de 8,3). O peso molecular das proteínas estudadas foi verificado pela utilização do marcador padrão de peso molecular (Full-Range Rainbow Molecular Weight Markers, GE Healthcare). As amostras foram aquecidas a 94°C por um período de 2 minutos antes de serem submetidas à eletroforese. A seguir, foi realizada a transferência para membranas de nitrocelulose (Hybond, Amersham) com voltagem de 100V por aproximadamente 60 minutos na presença do tampão de transferência (Tris 25 mM, glicina 192 mM e metanol a 20%, pH 8,3). As membranas foram bloqueadas com leite em pó (Molico, Nestlé) 8% em

TTBS (Tris 25 mM, NaCl 140 mM e Tween 20 a 0,05%) por 60 minutos e posteriormente incubadas *overnight* a 4°C com os seguintes anticorpos primários: p-Akt (Ser 473) (60kDa) (1:500), Akt total (60kDa) (isoforma 1) (1:500), p-Erk (42-44kDa) (Tyr 177) (1:750), Erk total (42-44kDa) (isoformas 1 e 2) (1:1000), Caspase-3 (Procaspase-3 – 38kDa; Caspase-3 clivada – 17kDa) (1:250), ST (70kDa) (1:500) (Millipore), subunidade $\alpha 4$ do receptor GABA_A (70kDa) (1:500) e GAPDH (36kDa) (1:500) (Millipore). Todos os anticorpos foram adquiridos da Santa-Cruz Biotechnology, exceto onde indicado. Todos os anticorpos primários foram diluídos em tampão (TTBS com albumina bovina 2,5%). A seguir, as membranas foram lavadas com TTBS (três períodos de 10 minutos cada) e incubadas com o respectivo anticorpo secundário (Millipore) durante duas horas, sob agitação constante em temperatura ambiente, na diluição de 1:10000 em TTBS. Antes de proceder à revelação por quimioluminescência, as membranas foram lavadas por três períodos de 10 minutos com TBS (Tris 20 mM e NaCl 140 mM). A reação de quimioluminescência foi realizada mediante uso de sistema de detecção baseado em substratos luminescentes (luminol e ácido p-cumárico), com exposição das membranas ao filme radiográfico (Amersham Hyperfilm, GE Healthcare) por aproximadamente 1 minuto. A autorradiografia gerada foi analisada por meio de analisador de imagem e quantificador densitométrico (Image J).

3.1.7 Análise Estatística

Foi utilizado o teste T de Student para comparar os dados da análise da expressão das diferentes proteínas no hipotálamo (grupo controle x grupo tratado). Foi realizada uma análise de variância (ANOVA) de duas vias para avaliar a expressão das

diferentes proteínas no bulbo olfatório dos animais, considerando como fatores o tratamento e o hemisfério cerebral analisado. Quando apropriado, a ANOVA foi seguida do pós-teste de Student-Newman-Keuls (SNK). Ainda, utilizamos correlação de Pearson para correlacionar a expressão das proteínas com o tempo de imobilidade dos animais no teste do nado forçado. Todos os resultados estão apresentados como média \pm erro padrão da média e foi considerado significativo $P < 0,05$.

3.2 Experimento 2: Efeito agudo e crônico da manipulação e da administração de injeções de veículo e progesterona sobre os níveis séricos de hormônios relacionados ao estresse em ratos machos e fêmeas.

Estudos prévios realizados em nosso laboratório envolvendo um desenho experimental semelhante ao deste estudo mostraram que o estresse ocasionado por procedimentos laboratoriais de rotina e pela exposição dos animais ao teste do nado forçado pode alterar a secreção de hormônios relacionados ao estresse e a expressão de subunidades do receptor GABA_A (Andrade et al., 2007; Andrade, 2010b). Dessa forma, realizamos um segundo experimento para observarmos o efeito agudo e crônico da manipulação e da administração de injeções intraperitoneais sobre os níveis séricos de hormônios relacionados ao estresse em ratos, além de observarmos o efeito da administração de progesterona sobre esses mesmos parâmetros.

3.2.1 Animais

Foram utilizados 96 ratos Wistar adultos machos e fêmeas, pesando aproximadamente 250g, com média de 75 dias de idade no início dos experimentos,

provenientes do biotério da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS). Os animais foram mantidos em gaiolas de polipropileno (40x33x17cm) e separados em grupos de quatro ratos por gaiola, com livre acesso à ração e água. Os animais permaneceram em ambiente controlado, sob ciclo claro/escuro de 12 horas (das 7 h às 19 h) e temperatura ambiental de $22 \pm 2^{\circ}$ C. Todos os protocolos utilizados estão de acordo com o Guia de Cuidado e Uso de Animais de Laboratório do National Institute of Health (NIH) e o projeto foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais da UFRGS (CEUA/UFRGS). Todos os esforços foram realizados para minimizar o sofrimento dos animais e foi utilizado apenas o número suficiente de animais para produzir dados científicos confiáveis.

3.2.2 Ovariectomia

Tendo em vista a influência das diferentes fases do ciclo estral sobre a secreção de diversos hormônios e a impossibilidade de monitorarmos o ciclo estral das fêmeas, uma vez que estudos prévios demonstram que a manipulação dos animais é capaz de alterar a secreção de hormônios em resposta ao estresse produzido por esse procedimento (Balcombe et al., 2004), uma semana antes do início dos experimentos as fêmeas foram submetidas à cirurgia de ovariectomia bilateral para a retirada de seus ovários. A cirurgia foi realizada sob anestesia de cetamina (100mg/kg i.p.) e xilazina (10mg/kg i.p.). Durante os dois primeiros dias do período pós-operatório, os animais receberam a administração de paracetamol (1,5mg/mL na água de beber) (Damy et al., 2010) visando um efeito analgésico e uma melhor recuperação do procedimento cirúrgico.

3.2.3 Fármacos e Tratamento

3.2.3.1 Experimento Agudo

Inicialmente, realizamos um experimento para verificarmos o efeito agudo do estresse da manipulação e das injeções, além do efeito da administração aguda de progesterona, sobre hormônios relacionados ao estresse. Nesse experimento, os machos e as fêmeas foram pesados e posteriormente divididos em quatro grupos conforme o estresse e o tratamento (n= 6/grupo): um grupo controle, em que não houve qualquer manipulação dos animais exceto o procedimento de pesagem, um grupo manipulado, em que os animais foram submetidos a um estresse semelhante à contenção e à manipulação necessária para a administração das injeções, mas não foram injetados, um grupo veículo que recebeu a administração de veículo (i.p.) e um grupo progesterona, que recebeu a administração de progesterona (Sigma) na dose de 0,4 mg/kg/dia (intraperitoneal), a qual foi dissolvida em uma solução de 10% de β -ciclodextrina (Fluka).

3.2.3.2 Experimento Crônico

Posteriormente, realizamos um experimento crônico para a avaliação do efeito crônico da manipulação e das injeções, além do efeito da administração crônica de progesterona sobre hormônios relacionados ao estresse. Nesse experimento, os animais foram divididos nos mesmos grupos do experimento anterior (controle, manipulado, veículo e progesterona) (n= 6/grupo), e a manipulação e as injeções foram realizadas uma vez ao dia durante 10 dias. Este protocolo é semelhante ao protocolo utilizado na realização do experimento 1, com exceção da exposição dos animais ao teste do nado

forçado, e, dessa forma, nos permite avaliar o efeito dos outros estressores sobre a secreção de hormônios envolvidos na resposta neuroendócrina ao estresse.

3.2.4 Eutanásia e coleta de sangue

Em ambos os experimentos, os animais foram eutanasiados por decapitação 30 minutos após a realização das manipulações ou das injeções, e o sangue do tronco foi coletado e posteriormente centrifugado a 1800 x g por 15 minutos em tubos contendo ativador de coágulo e gel separador para a separação do soro. As amostras foram congeladas a -20°C para posteriores dosagens hormonais.

3.2.5 Dosagens Hormonais

Foram realizadas dosagens séricas dos hormônios progesterona, corticosterona e prolactina através de kits de ELISA conforme as instruções do fabricante (Uscn Life Science Inc.).

3.2.6 Análise Estatística

Foi realizado o teste de Kruskal-Wallis seguido pelo pós-teste de comparações múltiplas de Dunn quando necessário para a comparação dos níveis séricos dos hormônios quando os dados apresentaram distribuição não-paramétrica e uma Análise de Variância (ANOVA) de duas vias seguida pelo pós-teste de Student-Newman-Keuls (SNK) para a comparação dos níveis hormonais quando os dados apresentaram distribuição paramétrica, considerando como fatores sexo e tratamento. Os dados não

paramétricos estão apresentados como mediana e intervalos interquartis 25 e 75, enquanto os dados paramétricos estão apresentados como média \pm erro padrão da média, sendo considerado significativo $P < 0,05$.

4. Resultados

4.1 Experimento 1

4.1.1 Efeitos comportamentais da progesterona no teste do nado forçado

Os dados da análise comportamental dos animais no teste do nado forçado fizeram parte da tese “Efeitos da progesterona sobre o comportamento tipo-depressivo e sobre a expressão das subunidades do receptor GABA_A de ratos Wistar machos e fêmeas” da aluna Susie de Andrade (Andrade, 2010b) e já estão publicados sob a forma de um artigo científico. Verificou-se que o tratamento com progesterona reduziu o tempo de imobilidade de fêmeas em diestro submetidas ao teste do nado forçado em relação ao grupo controle (Andrade et al., 2010a).

4.1.2 Ciclo-estral

Durante o período de tratamento, mesmo após a seleção dos animais, o ciclo estral das fêmeas continuou a ser monitorado. Nesse período, não houve alteração na regularidade do ciclo estral desses animais, de forma que nem a administração de progesterona e nem o estresse gerado, seja pelo processo de administração, seja pelo teste do nado forçado, foram capazes de ocasionar mudanças no ciclo estral das fêmeas.

4.1.3 Efeitos da progesterona sobre vias de neuroproteção celular

O tratamento com progesterona aumentou a relação p-Akt/Akt no hipotálamo das fêmeas em diestro em relação ao grupo controle ($t= 4,446$, $P < 0,001$) (Figura 1). Esse aumento da relação p-Akt/Akt no hipotálamo desses animais ocorreu devido a uma

redução da expressão proteica da Akt ($t= 2,795$, $P= 0,016$) (Figura 2B), enquanto não houve alteração da expressão protéica da p-Akt nesse estrutura encefálica (Figura 2A). Não houve quaisquer alterações na expressão proteica da relação p-Akt/Akt bem como das enzimas p-Akt e Akt no bulbo olfatório (Figuras 3 e 4).

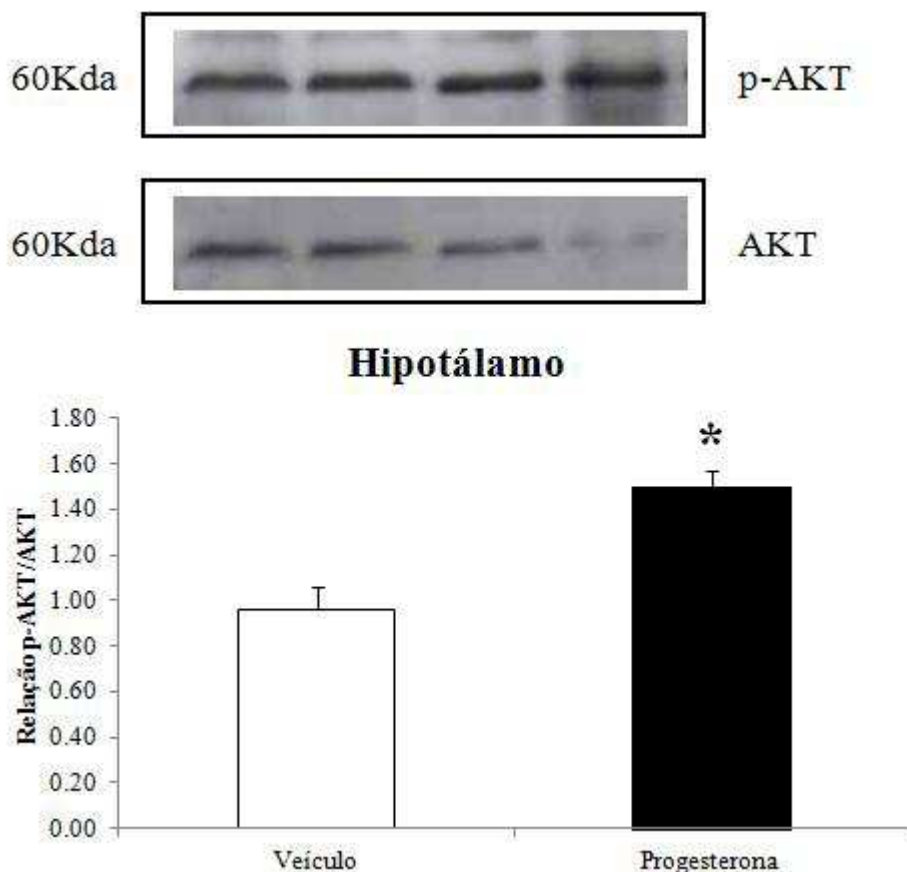


Figura 1 – Efeitos da progesterona na expressão protéica da relação p-Akt/Akt (representada por unidades densitométricas arbitrárias) no hipotálamo de ratas Wistar submetidas ao teste do nado forçado. *Difere do grupo veículo ($P < 0,05$) ($n= 7$ /grupo) (2 bandas representativas de cada grupo).

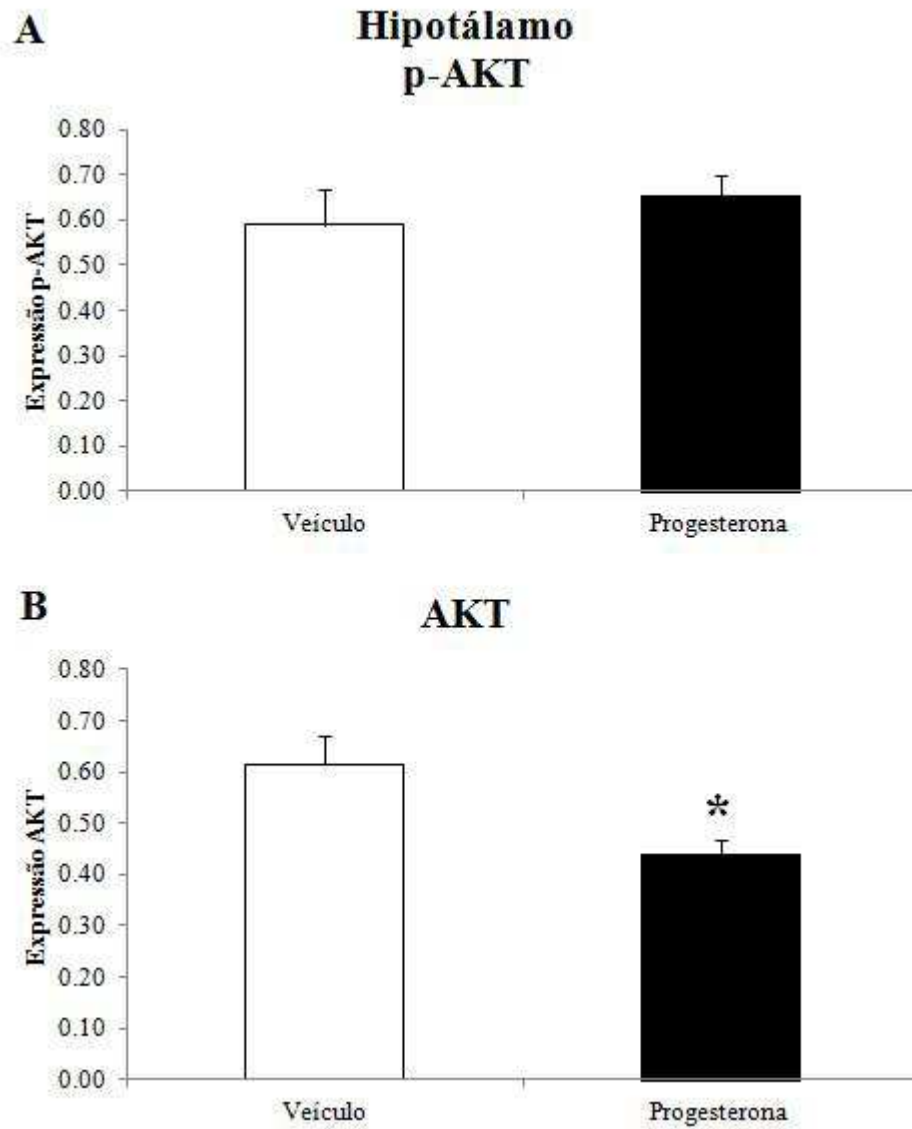


Figura 2 – Efeitos da progesterona na expressão protéica das enzimas p-Akt (A) e Akt (B) (representadas por unidades densitométricas arbitrárias) no hipotálamo de ratas Wistar submetidas ao teste do nado forçado. *Difere do grupo veículo ($P < 0,05$) ($n=7$ /grupo).

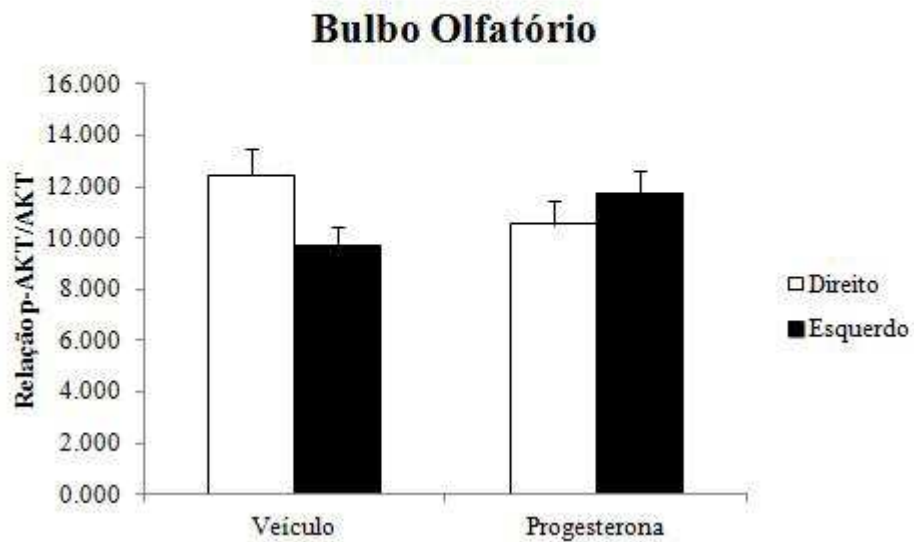


Figura 3 – Efeitos da progesterona na expressão protéica da relação p-Akt/Akt (representada por unidades densitométricas arbitrárias) no bulbo olfatório de ratas Wistar submetidas ao teste do nado forçado (n= 4-5/grupo) (2 bandas representativas de cada grupo).

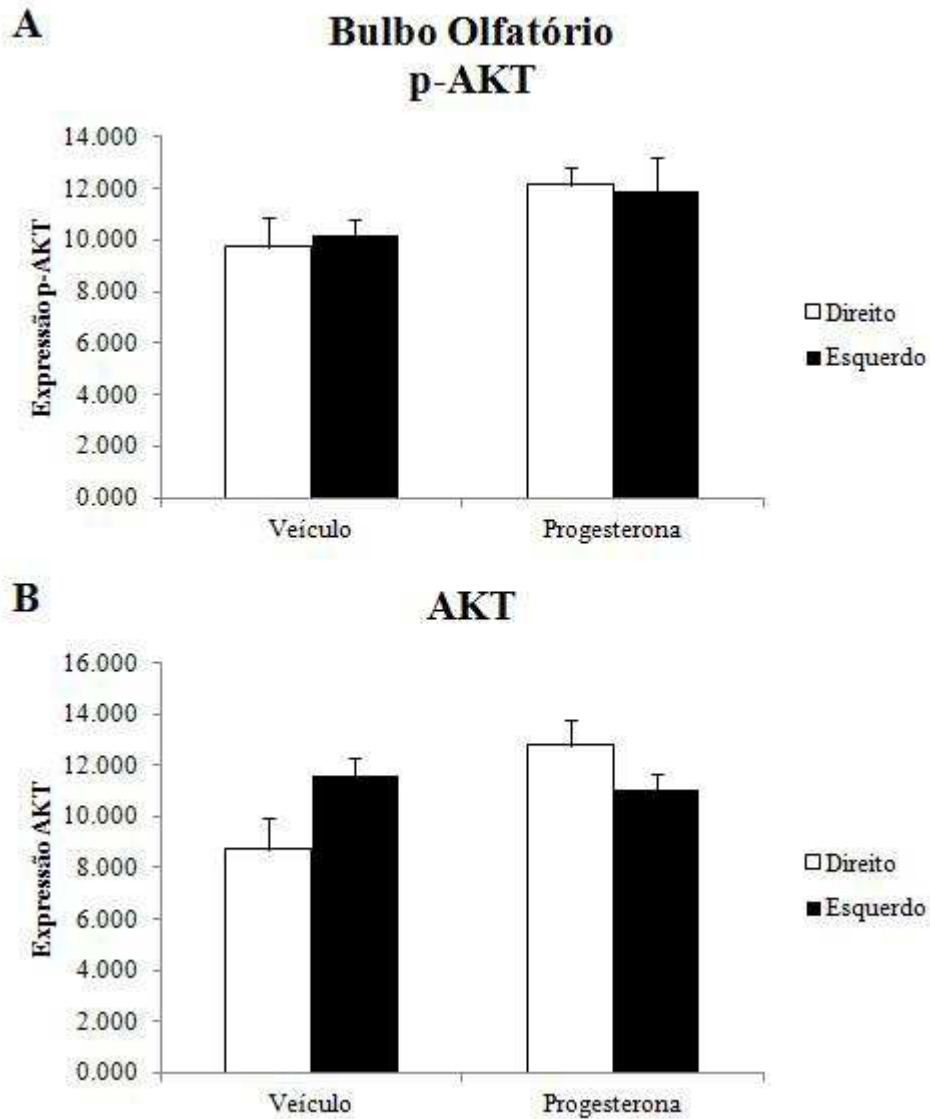


Figura 4 – Efeitos da progesterona na expressão protéica das enzimas p-Akt (A) e Akt (B) (representadas por unidades densitométricas arbitrárias) no bulbo olfatório de ratas Wistar submetidas ao teste do nado forçado (n= 4-5/grupo).

Os efeitos da progesterona na expressão proteica da enzima Erk estão representados nas Figuras 5, 6, 7 e 8. O tratamento com progesterona não alterou a

expressão proteica da relação p-Erk/Erk nem das enzimas p-Erk e Erk no hipotálamo e no bulbo olfatório das fêmeas em diestro submetidas ao teste do nado forçado.

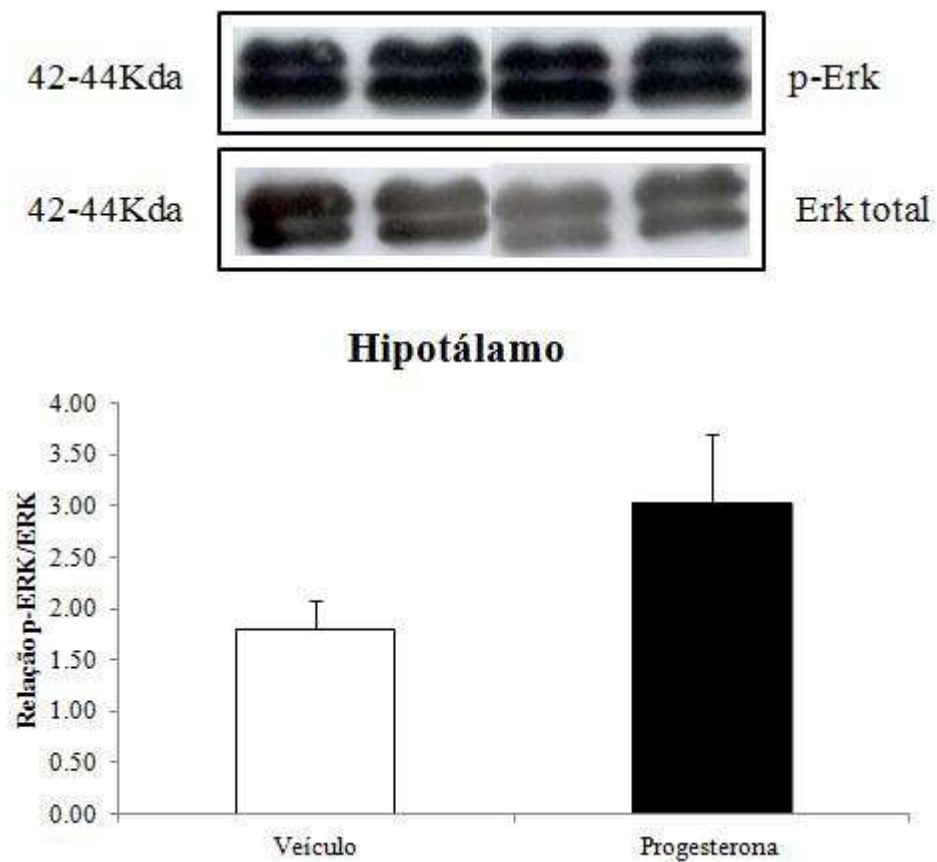


Figura 5 – Efeitos da progesterona na expressão protéica da relação p-Erk/Erk (representada por unidades densitométricas arbitrárias) no hipotálamo de ratas Wistar submetidas ao teste do nado forçado (n=4/grupo) (2 bandas representativas de cada grupo).

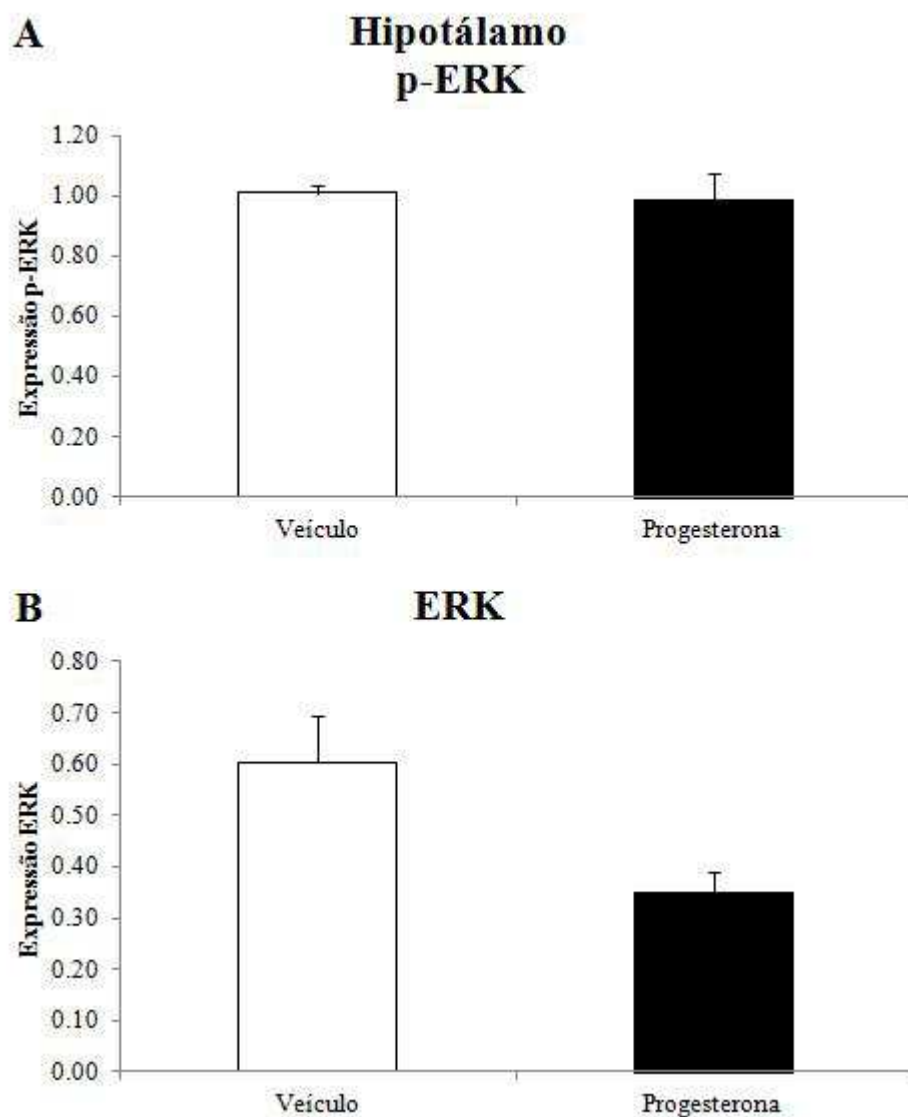


Figura 6 – Efeitos da progesterona na expressão protéica das enzimas p-Erk (A) e Erk (B) (representadas por unidades densitométricas arbitrárias) no hipotálamo de ratas Wistar submetidas ao teste do nado forçado (n=4/grupo).

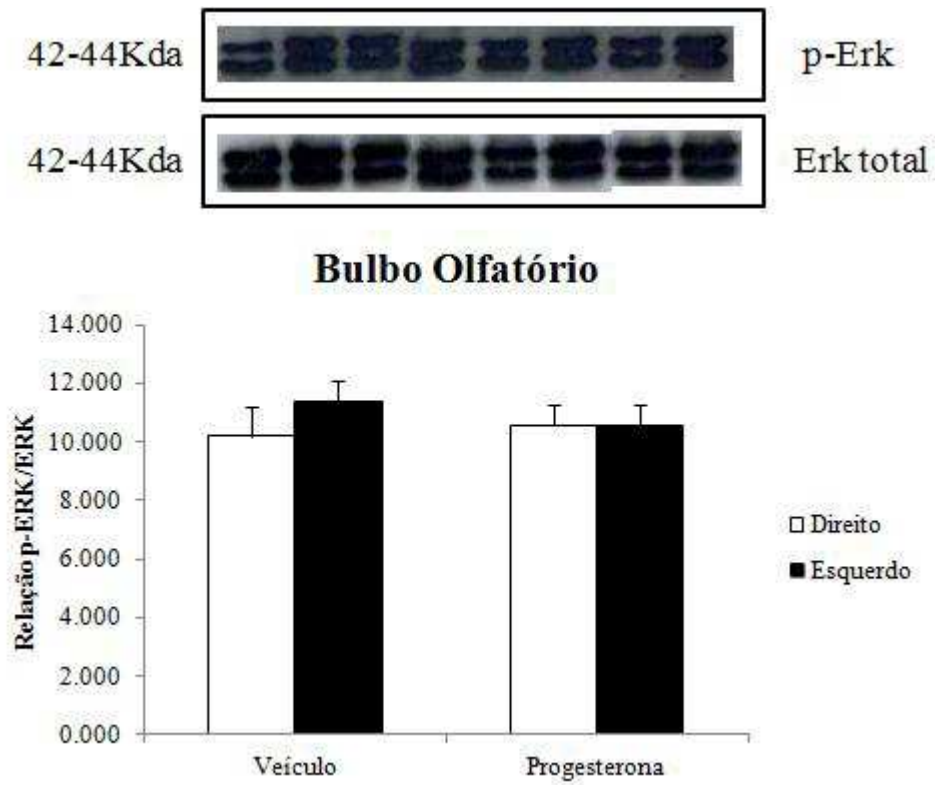


Figura 7 – Efeitos da progesterona na expressão protéica da relação p-Erk/Erk (representada por unidades densitométricas arbitrárias) no bulbo olfatório de ratas Wistar submetidas ao teste do nado forçado (n=3-5/grupo) (2 bandas representativas de cada grupo).

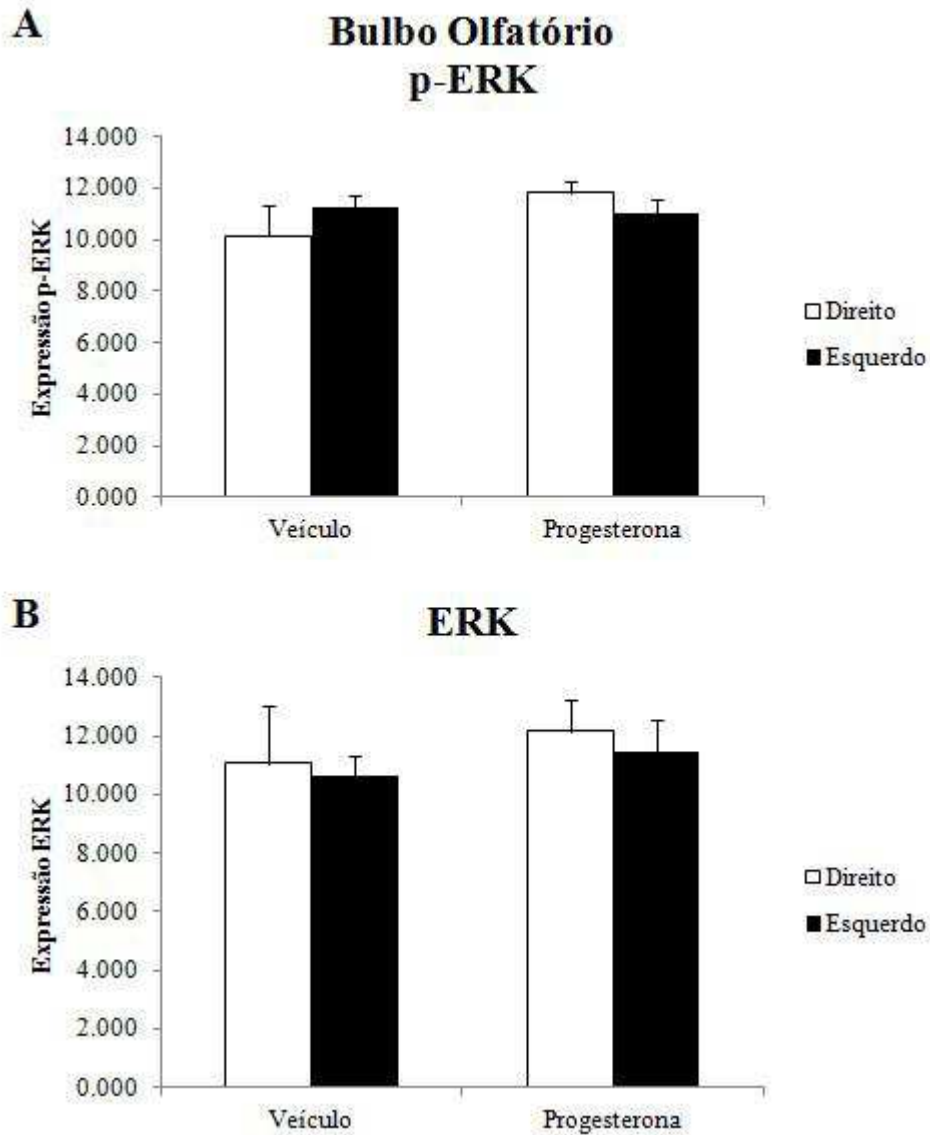


Figura 8 – Efeitos da progesterona na expressão protéica das enzimas p-Erk (A) e Erk (B) (representadas por unidades densitométricas arbitrárias) no bulbo olfatório de ratas Wistar submetidas ao teste do nado forçado (n=3-5/grupo).

O tratamento com progesterona reduziu a expressão proteica da procaspase-3 (38Kda) no hipotálamo das fêmeas em diestro ($t= 2,502$, $P= 0,046$) (Figura 9A), mas não alterou a expressão proteica dessa enzima no bulbo olfatório desses animais (Figura 9B). A caspase-3 clivada, em sua forma ativa, apresenta um peso molecular de 17Kda,

mas não vimos níveis detectáveis dessas enzimas em quaisquer dos nossos grupos experimentais.

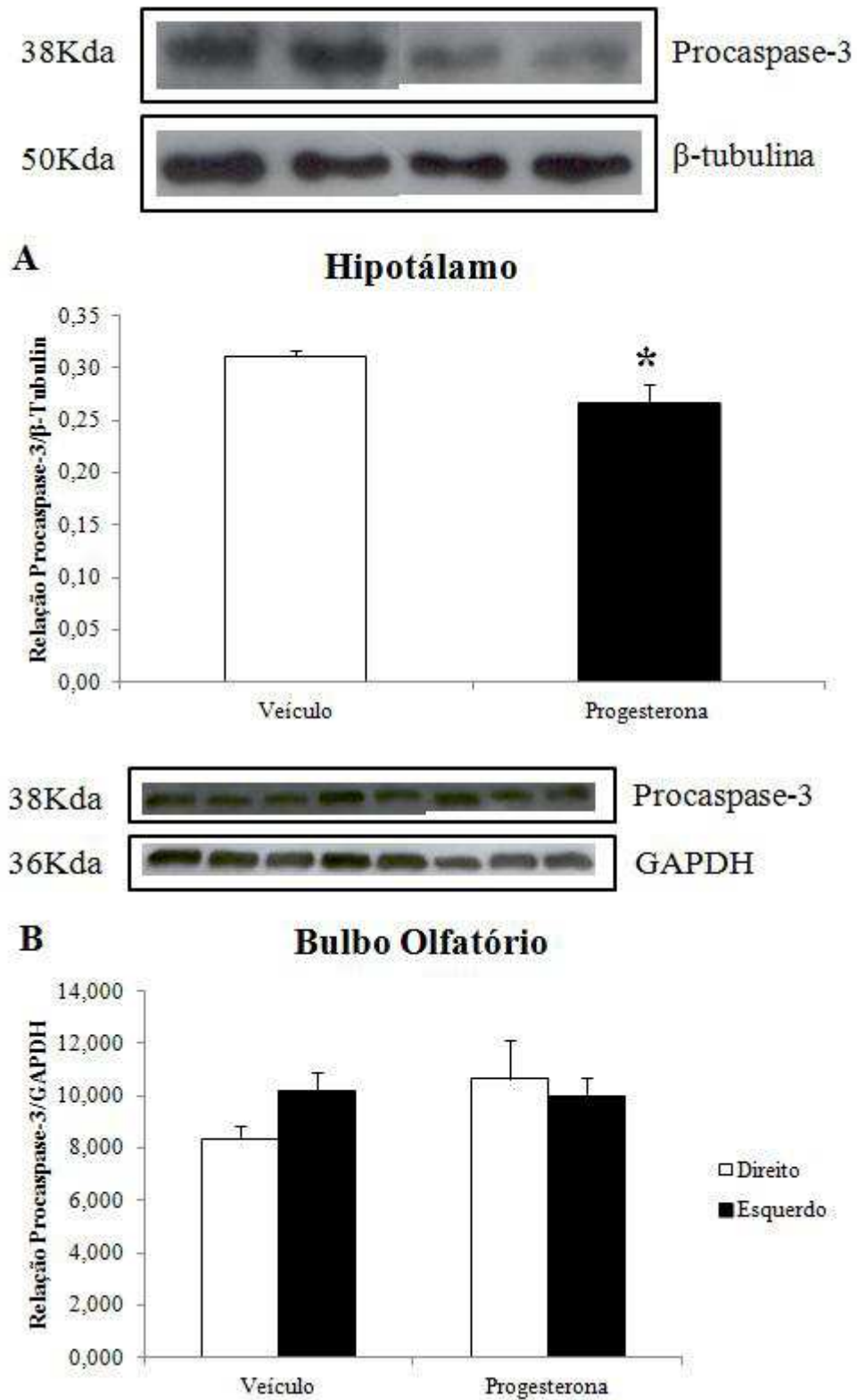


Figura 9 – Efeitos da progesterona na expressão protéica da procaspase-3 (representada

por unidades densitométricas arbitrárias) no hipotálamo (A) e no bulbo olfatório (B) de ratas Wistar submetidas ao teste do nado forçado. *Difere do grupo veículo ($P < 0,05$) ($n = 3-4/\text{grupo}$) (2 bandas representativas de cada grupo).

Não houve correlação entre a expressão de quaisquer dessas proteínas e o tempo de imobilidade das fêmeas no teste do nado forçado.

4.1.4 Efeitos da progesterona sobre a expressão do SERT

O tratamento com progesterona não foi capaz de modular a expressão proteica do transportador de serotonina no hipotálamo e no bulbo olfatório de fêmeas em diestro submetidas ao teste do nado forçado (Figura 10). Não houve correlação entre a expressão proteica do SERT e o tempo de imobilidade dos animais no teste do nado forçado.

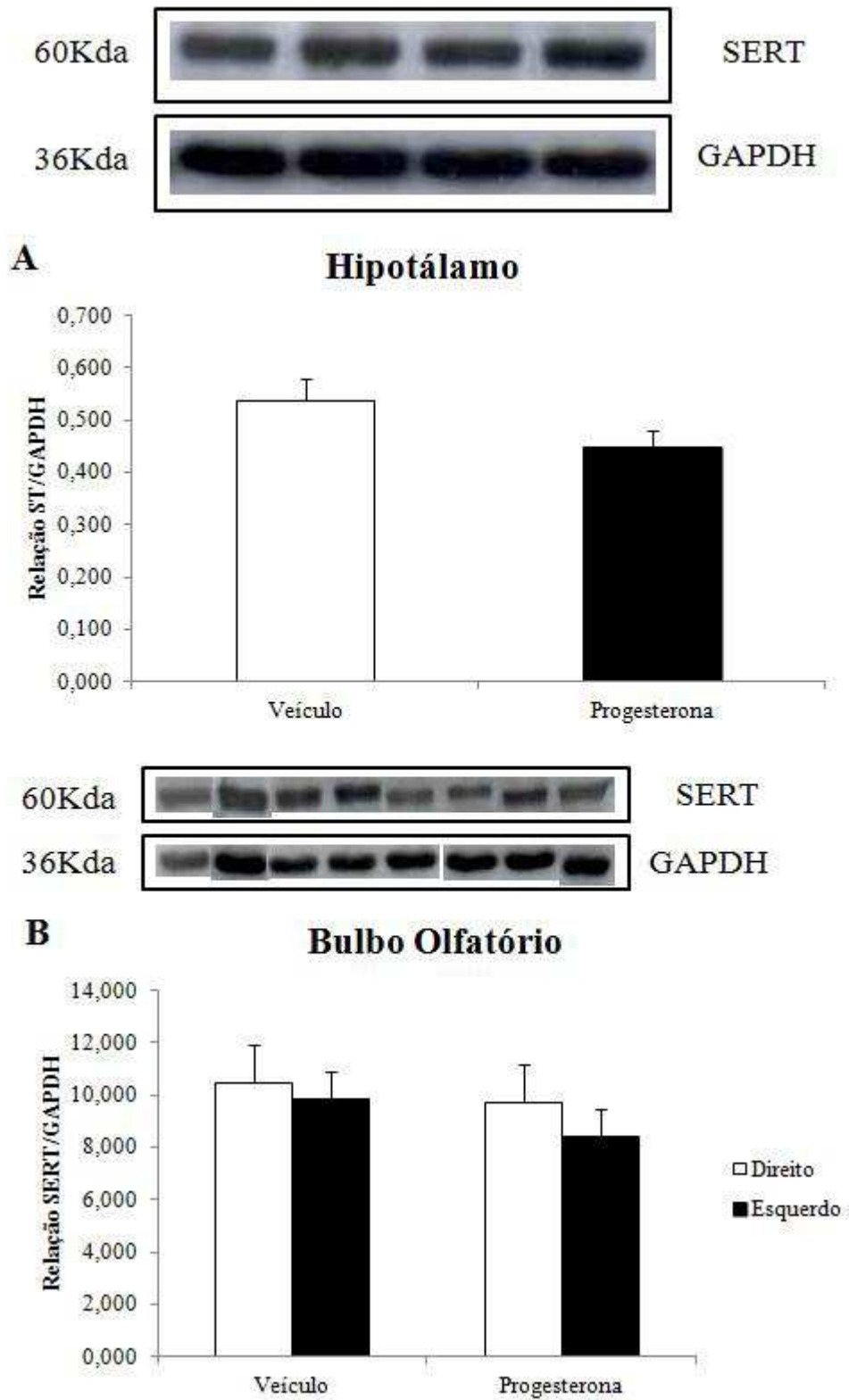


Figura 10 – Efeitos da progesterona na expressão protéica do SERT (representada por unidades densitométricas arbitrárias) no hipotálamo (A) e no bulbo olfatório (B) de

ratas Wistar submetidas ao teste do nado forçado (n= 4/grupo) (2 bandas representativas de cada grupo).

4.1.5 Efeitos da progesterona sobre a expressão da subunidade $\alpha 4$ do receptor GABA_A

O tratamento com progesterona aumentou a expressão protéica da subunidade $\alpha 4$ no hipotálamo das fêmeas tratadas em relação ao grupo controle (t= 3,437, P= 0,026) (Figura 11A). Também, o tratamento com progesterona aumentou a expressão proteica da subunidade $\alpha 4$ no bulbo olfatório direito, e reduziu a expressão dessa mesma subunidade no bulbo olfatório esquerdo de ratas em diestro submetidas ao teste do nado forçado. Verificou-se uma assimetria em relação à expressão proteica da subunidade $\alpha 4$ no bulbo olfatório das fêmeas tratadas com progesterona, com uma maior expressão dessa subunidade no bulbo olfatório direito do que no esquerdo desses animais ($F_{\text{int}(3,12)} = 29,197$, $P < 0,001$) (Figura 11B). Não houve correlação entre a expressão dessa subunidade e o tempo de imobilidade no teste do nado forçado.

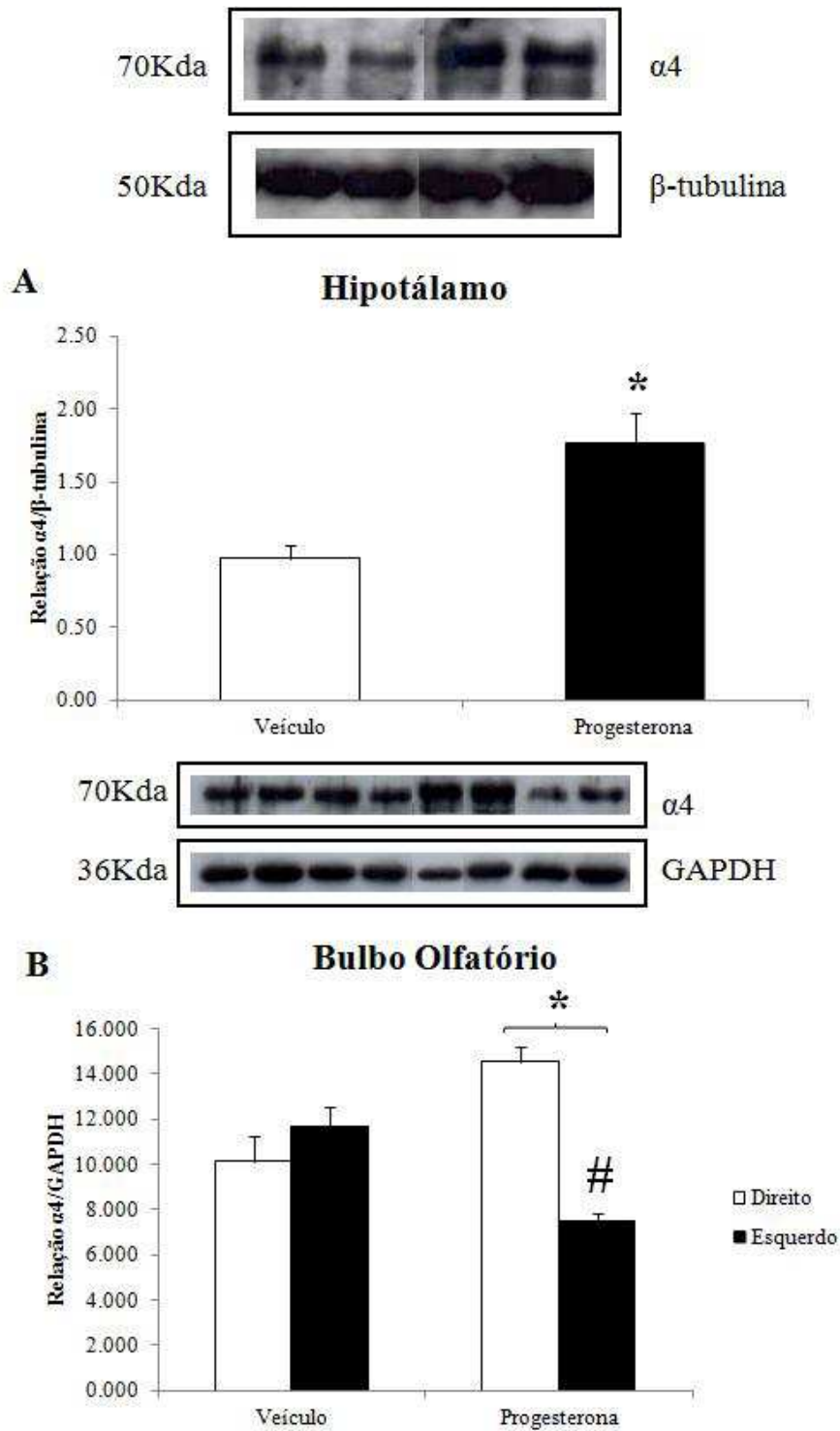


Figura 11 – Efeitos da progesterona na expressão protéica da subunidade $\alpha 4$ do receptor $GABA_A$ (representada por unidades densitométricas arbitrárias) em ratas Wistar submetidas ao teste do nado forçado. *Difere do grupo veículo; #Difere do bulbo olfatório direito ($P < 0,05$) ($n = 4-5$ /grupo) (2 bandas representativas de cada grupo).

4.2 Efeito agudo e crônico da manipulação e da administração de injeções de veículo e progesterona sobre os níveis séricos de hormônios relacionados ao estresse em ratos machos e fêmeas.

4.2.1 Níveis Séricos de Progesterona

No experimento agudo, verificamos que a administração de uma única injeção de progesterona ocasionou uma tendência ao aumento nos níveis desse hormônio nos animais tratados em relação aos outros grupos experimentais. Essa tendência pode ser melhor observada nos machos, que apresentaram uma diferença significativa em relação ao grupo controle ($H= 24,250$, $P= 0,001$). Entretanto, devido à alta variabilidade dos dados e à sua distribuição não-paramétrica, não foram observadas diferenças estatisticamente significativas entre as fêmeas tratadas com progesterona e os outros grupos experimentais (Figura 12A). Algo semelhante ocorreu no experimento crônico, embora o aumento nos níveis de progesterona tenha sido menor. Ocorreu um aumento nos níveis de progesterona nos machos tratados em relação ao grupo dos machos manipulados ($H= 18,896$, $P= 0,009$). Não houve qualquer diferença nos níveis séricos de progesterona entre os grupos das fêmeas (Figura 12B).

Na comparação do experimento agudo com o experimento crônico, nem a manipulação crônica e nem os diferentes tipos de tratamento crônicos (veículo e progesterona) foram capazes de promover alterações nos níveis séricos de progesterona em relação ao seu respectivo grupo no experimento agudo, tanto nas fêmeas quanto nos machos.

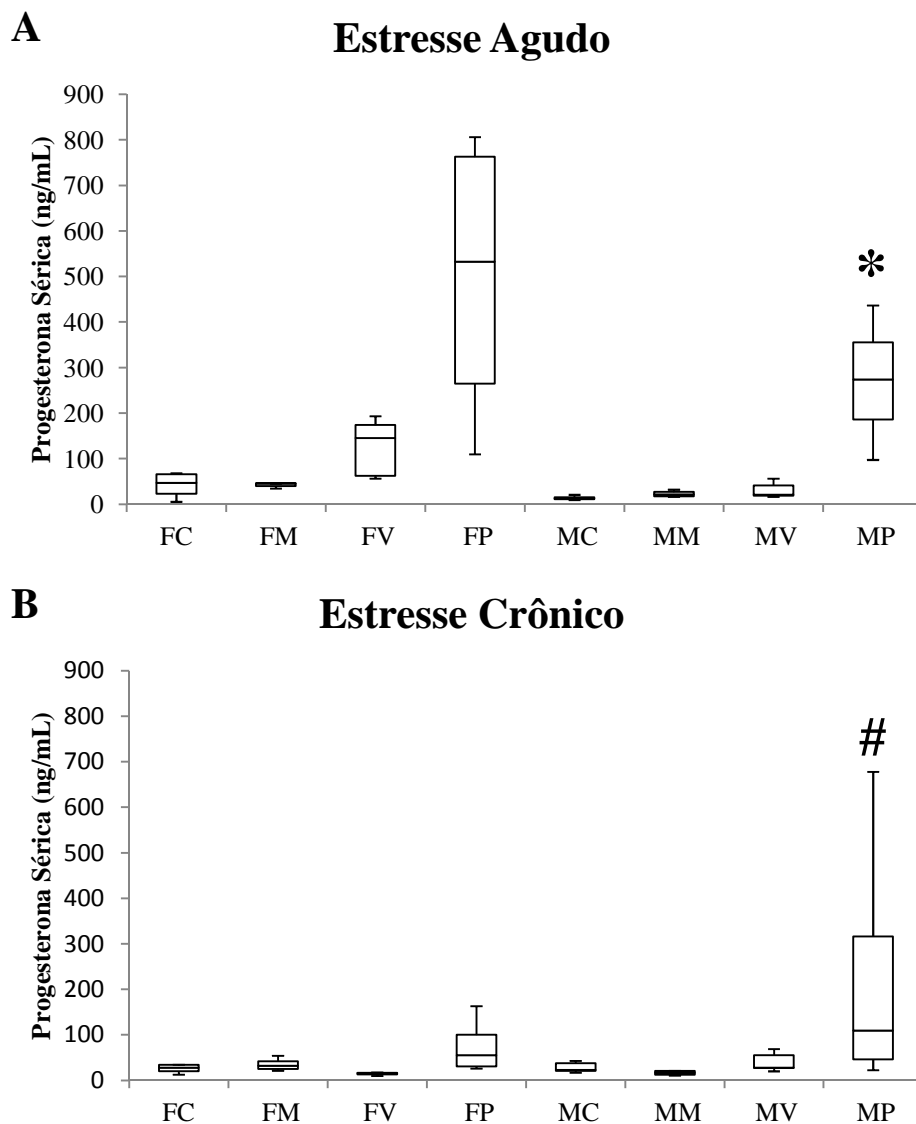


Figura 12 – Efeito agudo e crônico da manipulação e da administração de injeções de veículo e progesterona sobre os níveis séricos de progesterona (ng/mL). *Difere do grupo controle. #Difere do grupo manipulado. N= 3-5/grupo (F= fêmeas; M= machos; C= controle; M= manipulado; V= veículo; P= progesterona).

4.2.2 Níveis Séricos de Corticosterona

No experimento agudo, houve distribuição paramétrica dos dados, e a ANOVA de duas vias mostrou uma diferença relacionada ao sexo nos níveis séricos de

corticosterona, que foram maiores nas fêmeas em relação aos machos ($F_{\text{sexo}}= 20,031$, $P< 0,001$). Os diferentes tipos de tratamento não alteraram significativamente os níveis séricos de corticosterona (Figura 13A).

No experimento crônico, a distribuição dos dados foi não-paramétrica, e não houve qualquer diferença nos níveis séricos de corticosterona entre os grupos experimentais (Figura 13B).

Na comparação entre os experimentos agudo e crônico, verificamos que as fêmeas do experimento crônico apresentaram uma redução nos níveis séricos de corticosterona em relação aos animais do experimento agudo, independente do tipo de tratamento ($F_{\text{tempo}}= 34,177$, $P<0,001$). Não houve diferença entre os níveis séricos de corticosterona nos machos do experimento crônico em comparação com os machos do experimento agudo em quaisquer dos grupos experimentais.

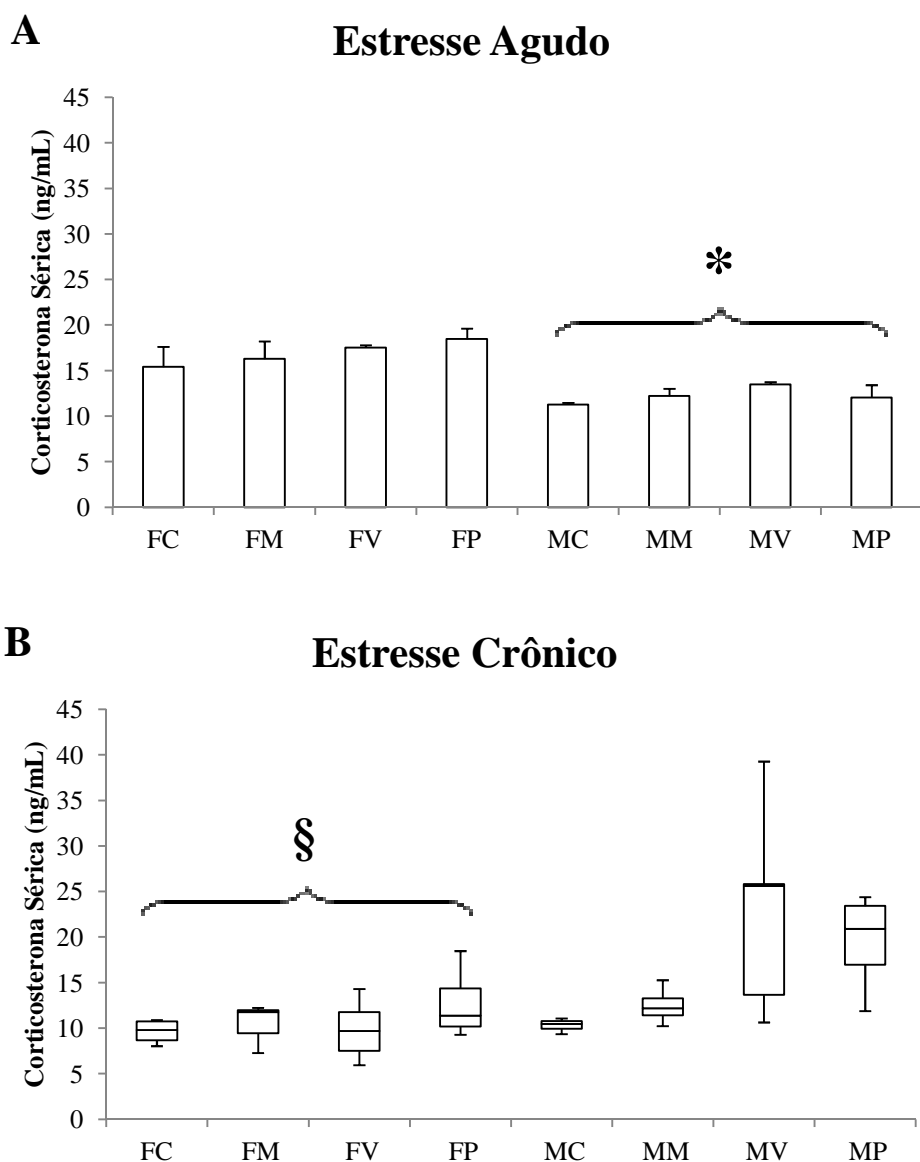


Figura 13 - Efeito agudo e crônico da manipulação e da administração de injeções de veículo e progesterona sobre os níveis séricos de corticosterona (ng/mL). *Diferente das fêmeas. §Diferente do experimento agudo. N= 3-5/grupo. (F= fêmeas; M= machos; C= controle; M= manipulado; V= veículo; P= progesterona).

4.2.3 Níveis Séricos de Prolactina

Os níveis séricos de prolactina nos experimentos agudo e crônico estão mostrados na Figura 14. Não houve diferença entre os níveis séricos desse hormônio entre os grupos experimentais tanto no experimento agudo como no experimento crônico. Na comparação entre os níveis séricos de prolactina entre os animais do experimento agudo com os animais do experimento crônico, verificamos que as fêmeas do experimento crônico apresentaram maiores níveis séricos de prolactina do que as fêmeas do experimento agudo ($F_{tempo} = 8,593$; $P = 0,007$), enquanto que nos machos não houve diferença entre os níveis séricos de prolactina entre os animais do experimento agudo e os do experimento crônico.

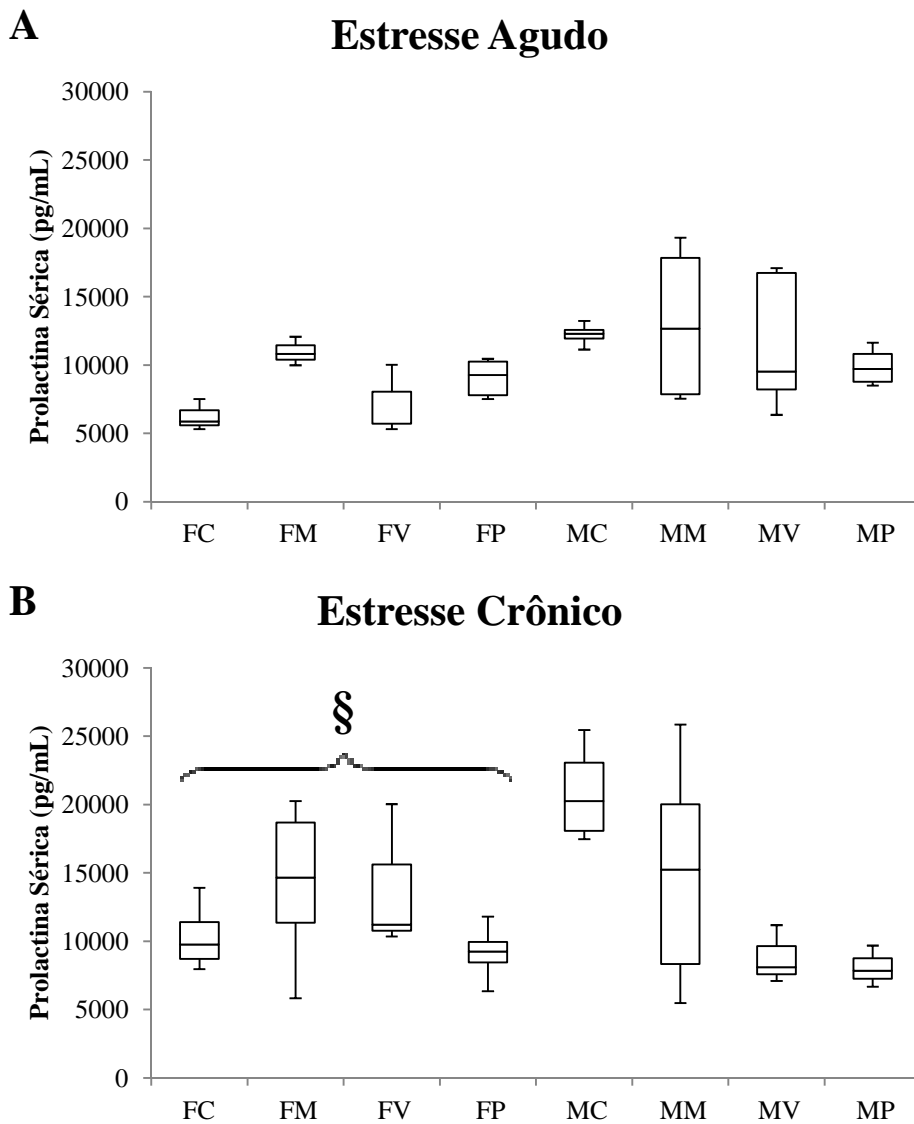


Figura 14 – Efeito agudo e crônico da manipulação e da administração de injeções de veículo e progesterona sobre os níveis séricos de prolactina (pg/mL). §Diferente do experimento agudo. N=3-5/grupo. (F= fêmeas; M= machos; C= controle; M= manipulado; V= veículo; P= progesterona).

5. Discussão

Estudos prévios do nosso laboratório mostraram que a administração crônica de baixas doses de progesterona ocasionou um efeito antidepressivo em fêmeas em diestro submetidas ao teste do nado forçado (Andrade et al., 2010a). Com base na existência de um número de evidências cada vez maior associando a depressão com a neurodegeneração de certos circuitos cerebrais (Manji e Duman et al., 2001; Benninghoff et al., 2002; Fuchs et al., 2004, Bethea et al., 2009), além do fato de existir uma clara associação entre a fisiopatologia da depressão e os sistemas GABAérgico e serotoninérgico (Tunnicliff e Malatynska, 2003; Brambilla et al., 2003; Eser et al., 2006, Bethea et al., 2009), esse estudo foi desenhado para verificar possíveis mecanismos envolvidos no efeito da progesterona sobre o comportamento tipo-depressivo dessas fêmeas em diestro submetidas ao teste do nado forçado. As estruturas encefálicas abordadas nesse estudo foram o hipotálamo, devido à relação da neurodegeneração no hipotálamo com a depressão e devido à sua importância no funcionamento do eixo HPA (Manaye et al., 2005; Raone et al., 2007; Bao et al., 2008), e o bulbo olfatório, devido à relação do modelo de bulbectomia com a depressão (Roche et al., 2007; Wierónska et al., 2008).

O tratamento com progesterona diminuiu a expressão da procaspase-3 no hipotálamo de ratas em diestro submetidas ao teste do nado forçado. A procaspase-3 é clivada pela caspase-9, se tornando a caspase-3 ativa, que por sua vez irá clivar e ativar uma série de substratos que irão ocasionar a morte celular (Wang, 2001). A caspase-3 é considerada a caspase apoptótica efetora central e final, sendo responsável pela maior parte da apoptose biológica (Bethea et al., 2009). Assim como outros autores (Tokuyama et al., 2008), não observamos níveis detectáveis de caspase-3 ativa em nossos experimentos, mas verificamos uma redução na expressão da procaspase-3 no

hipotálamo desses animais, o que poderia indicar um efeito neuroprotetor da progesterona nessa estrutura encefálica, uma vez que a procaspase-3 é a precursora direta da caspase-3 ativa, e um aumento na expressão da caspase-3 ativa indica um aumento na apoptose (Kubera et al., 2011). Sugere-se que essa ação seria realizada através de uma redução na expressão gênica da procaspase-3, uma vez que não podemos inferir possíveis efeitos da progesterona sobre a ativação dessa enzima tendo em vista a ausência de níveis detectáveis da enzima ativa em nossos experimentos.

Além de induzir uma redução na expressão da procaspase-3, o tratamento crônico com progesterona aumentou a expressão da relação p-Akt/Akt no hipotálamo de fêmeas em diestro submetidas ao teste do nado forçado. Esse aumento, todavia, parece não corresponder a um aumento de fato na ativação da via PI3K/Akt, uma via envolvida com a promoção da sobrevivência celular e que inibe a ativação da caspase-3, uma vez que ocorreu devido a uma redução na expressão da enzima Akt, não ocorrendo alteração na expressão da p-Akt, que corresponde à porção ativa dessa enzima. Outros autores demonstraram que a administração de progesterona aumenta a atividade da Akt no hipotálamo de ratas (Guerra-Araiza et al., 2009), porém esse estudo utilizou ratas ovariectomizadas e o tratamento consistia em uma única injeção de progesterona em uma dose mais elevada, enquanto no presente estudo administramos a progesterona cronicamente em uma dose mais baixa em fêmeas em diestro. Essa dose foi escolhida por ser a menor dose capaz de produzir um efeito antidepressivo em fêmeas em diestro submetidas ao teste do nado forçado, sem, no entanto, modular o eixo HPG desses animais e alterar a regularidade do seu ciclo estral (Andrade et al., 2010a). Alguns trabalhos mostraram que a atividade da Akt está inversamente correlacionada com a atividade da caspase-3 (Tang et al., 2009, Hu et al., 2011), mas é importante notarmos que esses outros estudos utilizaram modelos de cultura de células e que nosso estudo foi

realizado em animais. O organismo de um animal apresenta interações moleculares muito mais complexas do que um ambiente controlado. Esses fatos podem estar ao menos parcialmente envolvidos com as diferenças encontradas entre esses trabalhos e o nosso estudo, onde não encontramos diferenças na ativação da via PI3K/Akt, e o significado biológico desse achado ainda necessita ser esclarecido.

Neste estudo, o tratamento com progesterona não alterou a ativação da Erk no hipotálamo e no bulbo olfatório de ratas em diestro. Alguns estudos já mostraram que a ativação da Erk inibe a ativação da caspase-3, exercendo efeitos anti-apoptóticos através da redução da atividade dessa enzima (Wang et al., 2009; Boldingh Debernard et al., 2011). Guerra-Araiza et al., (2009) mostraram que uma única injeção de progesterona aumentou a ativação da Erk no hipotálamo, no hipocampo e no cerebelo de ratas ovariectomizadas. Outro estudo também já demonstrou que a Erk é fundamental para a neuroproteção em um modelo envolvendo a toxicidade induzida por glutamato em cultura de células hipotalâmicas, de forma que a ativação dessa enzima inibe a ativação da caspase-3 (Karmarkar et al., 2011). Liu et al., (2010) verificaram que a progesterona e uma série de derivados apresentam efeitos neuroprotetores tanto *in vitro* quanto *in vivo* em células progenitoras neurais e em células hipocampais, e esses efeitos seriam dependentes da ativação da Erk. Todavia, não encontramos alteração na ativação dessa enzima em quaisquer dos nossos grupos experimentais, de forma que outras vias de sinalização intracelular estariam possivelmente envolvidas na regulação da ativação da caspase-3 neste modelo experimental.

Apesar da intensa pesquisa que vem ocorrendo na área, as teorias atuais sobre disfunções em alguns sistemas neurotransmissores não explicam completamente a natureza da depressão. Tratamentos racionais que atuem sobre os fatores causais da depressão ainda não estão disponíveis. Recentemente, foi formulada a hipótese

inflamatória e neurodegenerativa da depressão, baseada na neurodegeneração e na neurogênese reduzida em algumas áreas cerebrais que caracterizam alguns casos de depressão (Maes et al., 2009). Alguns estudos demonstraram que a neurodegeneração do hipotálamo está associada com a depressão e com transtornos bipolares (Manaye et al., 2005; Bao et al., 2008), e que a progesterona exerce efeitos neuroprotetores nessa área (Guerra-Araiza et al., 2009). Aqui, demonstramos que o tratamento crônico com progesterona reduziu a expressão da procaspase-3, indicando um possível efeito neuroprotetor desse esteróide no hipotálamo de ratas em diestro submetidas ao teste do nado forçado. Esse efeito poderia estar envolvido no efeito antidepressivo da progesterona no teste do nado forçado, apesar da ausência de correlação entre a expressão dessa enzima e o comportamento de imobilidade. Entretanto, a progesterona não alterou a expressão das enzimas Akt, Erk e procaspase-3 no bulbo olfatório desses animais. Guerra-Araiza et al., (2009) verificaram que os metabólitos da progesterona exercem uma maior regulação sobre as vias da PI3K e das MAPK no hipotálamo do que no hipocampo e no cerebelo de ratas ovariectomizadas. Diferenças regionais na expressão de receptores de progesterona de membrana (Krebs et al., 2000; Guennoun et al., 2008) e na expressão de enzimas envolvidas na conversão da progesterona em alguns de seus metabólitos como por exemplo a alopregnanolona (Garcia-Segura e Melcangi, 2006), que poderiam mediar parte dos efeitos neuroprotetores da progesterona (Ciriza et al., 2006), podem explicar os efeitos distintos da progesterona sobre a modulação da expressão das enzimas Akt e procaspase-3 no hipotálamo e no bulbo olfatório dessas ratas em diestro.

O bloqueio farmacológico do funcionamento do SERT ocasiona, através de um processo que ainda não está totalmente elucidado, uma melhora clínica significativa em vários casos de depressão (Lenox e Frazer, 2002). Em nosso estudo, entretanto, apesar

do tratamento com progesterona ter ocasionado um efeito antidepressivo em fêmeas submetidas ao teste do nado forçado, ele não foi capaz de alterar a expressão do SERT. Alguns estudos já demonstraram que os níveis circulantes de estrógeno e progesterona são capazes de modular a ação de fármacos que atuam sobre o SERT (Benmansour et al., 2009). Todavia, ainda são controversos os relatos acerca da ação direta da progesterona sobre a expressão do SERT. Aparentemente o tempo de tratamento parece ser fundamental dentro desse contexto. Smith et al., (2004) demonstraram que ao passo que 1 mês de tratamento com estrógeno e progesterona não alterou a expressão do SERT no cérebro de macacas, o tratamento de 5 meses com esses mesmos compostos foi capaz de alterar a expressão dessa proteína. Em nosso estudo, apesar de termos utilizado um tratamento crônico com progesterona, esse tratamento durou apenas 10 dias, e esse fator pode ter sido preponderante na ausência de alteração na expressão do SERT no hipotálamo e no bulbo olfatório de ratas em diestro. A dose utilizada em nosso estudo também é uma dose considerada baixa conforme previamente discutido, e esse também é um fator a ser levado em consideração. Entretanto, outros componentes do sistema serotoninérgico como, por exemplo, alguns subtipos de receptores, como os receptores 5HT1A, 5HT2A e 5HT2C, além das enzimas triptofano hidroxilase e monoamina oxidase também se relacionam com a depressão e poderiam ser modulados pela ação da progesterona dentro desse contexto (Gundlah et al., 2002; Sanchez et al., 2005; Birzniece et al., 2006; Bethea et al., 2009), sendo alvos em potencial para os próximos estudos.

No presente estudo, demonstramos que a administração crônica de baixas doses de progesterona aumentou a expressão da subunidade $\alpha 4$ do receptor GABA_A no hipotálamo e no bulbo olfatório direito de ratas em diestro submetidas ao teste do nado forçado. Os efeitos da administração da progesterona e dos seus metabólitos sobre a

expressão dessa subunidade são controversos. Enquanto alguns estudos observaram um aumento na expressão da subunidade $\alpha 4$ após três dias de tratamento com progesterona ou alopregnanolona (Gulinello et al., 2001; Hsu et al., 2003), outro estudo mostrou que a administração intrahipocampal aguda de doses mais baixas de alopregnanolona não alterou a expressão dessa subunidade (Nim et al., 2008). Modelos de retirada de progesterona já se mostraram efetivos em promover um aumento na expressão da subunidade $\alpha 4$ no hipocampo de ratos (Smith et al., 1998). Pierson et al., (2005) demonstraram que a administração tanto de estradiol como de progesterona durante sete dias aumentou a expressão do mRNA da subunidade $\alpha 4$ em um modelo de cultura de células, semelhante aos resultados encontrados em nosso estudo.

Alguns estudos mostram que o sistema GABA exerce efeitos inibitórios no SNC por meio de dois mecanismos: a inibição fásica, que ocorre nas sinapses através do mecanismo de neurotransmissão química clássica e envolve moléculas de receptores GABA_A acopladas à membrana pós-sináptica caracterizadas pela expressão principalmente da subunidade $\gamma 2$ associada a duas subunidades α e duas subunidades β , e a inibição tônica, que ocorre fora das sinapses, em receptores perisinápticos e extrasinápticos, caracterizados pela expressão da subunidade δ associada a duas subunidades α e duas subunidades β (Farrant e Nusser, 2005). A subunidade $\alpha 4$ pode estar presente tanto em receptores GABA_A sinápticos (Chandra et al., 2006) quanto extrasinápticos (Liang et al., 2006), de forma que mudanças nas correntes sinápticas e extrasinápticas teriam implicações funcionais distintas. Ao passo que alterações nas correntes sinápticas seriam importantes para a sensibilidade do canal (Smith e Chapin, 1996) e para a retroalimentação negativa mediada pela ativação de aferências excitatórias (Hsu e Smith, 2003), alterações na inibição tônica exerceriam um impacto sobre o limiar para que a célula dispare um potencial de ação (Brickley et al., 2001;

Shen et al., 2007). Essas mudanças seriam fundamentais dentro do funcionamento do sistema GABA no sistema nervoso central e poderiam ser importantes dentro da fisiopatologia da depressão, embora não tenhamos observado correlações significativas entre a expressão dessa subunidade e o tempo de imobilidade dos animais no teste do nado forçado.

Curiosamente, em contraste com o aumento na expressão da subunidade $\alpha 4$ no bulbo olfatório direito, o tratamento com progesterona reduziu a expressão dessa subunidade no bulbo olfatório esquerdo desses animais, criando uma assimetria em relação à expressão dessa subunidade no bulbo olfatório. Ainda é escasso o número de estudos avaliando diferenças no funcionamento dos diferentes hemisférios em relação ao comportamento. Estudos recentes realizados em humanos apontam para diferenças sexuais em relação ao processamento de emoções entre os dois hemisférios cerebrais (Tranel e Bechara, 2009). O sistema GABA também apresenta assimetria em relação a sua composição, sendo que se verificou a existência de um número maior de sítios de ligação do GABA em estruturas como o hipocampo, o córtex cerebral, o estriado e o cerebelo no hemisfério esquerdo em relação ao hemisfério direito (Guarneri et al., 1988). Nim et al., (2008) demonstraram que a administração de alopregnanolona, um metabólito da progesterona, ocasionou assimetria em relação à expressão do mRNA da subunidade $\gamma 2$ do receptor $GABA_A$, com uma maior expressão dessa subunidade no hipocampo direito em relação ao hipocampo esquerdo. Outros estudos do nosso laboratório apontaram a existência de uma assimetria em relação à expressão da subunidade $\alpha 1$ do receptor $GABA_A$ no córtex pré-frontal de ratas em diestro submetidas ao teste do nado forçado e uma correlação negativa entre a expressão do mRNA dessa subunidade no córtex pré-frontal direito e o tempo de imobilidade dos animais no teste do nado forçado (Andrade, 2010b), corroborando a presença de uma assimetria em

relação ao funcionamento do sistema GABA em uma série de estruturas encefálicas e a sua relevância dentro da modulação do comportamento tipo depressivo.

O sistema GABA também apresenta uma relação importante com as vias de sinalização intracelular no SNC. Alguns estudos verificaram que um aumento na neurotransmissão GABAérgica poderia gerar efeitos neuroprotetores em casos de isquemia cerebral (Galeffi et al., 2000; Green et al., 2000). Também, outros estudos demonstraram que agonistas dos receptores GABA_A e GABA_B ocasionam efeitos neuroprotetores em modelos animais de isquemia cerebral (Ito et al., 1999; Kulinskii e Mikhel'son, 2000; Cozzi et al., 2002), e esses efeitos seriam mediados pela via da PI3K, com um aumento da ativação da Akt (Xu et al., 2008). No presente estudo, porém, não conseguiu replicar esses dados em animais sem a presença de isquemia cerebral. Em nosso trabalho, verificamos um efeito neuroprotetor da progesterona, um modulador positivo do receptor GABA_A possivelmente via alopregnanolona, através da redução da expressão da procaspase-3 no hipotálamo de ratas submetidas ao teste do nado forçado, acompanhado de mudanças na expressão da subunidade $\alpha 4$ no hipotálamo e no bulbo olfatório desses animais. Esse efeito, todavia, não parece ser mediado pela via da PI3K, uma vez que não houve alteração na ativação dessa via no hipotálamo e no bulbo olfatório desses animais. Cabe ressaltarmos que enquanto os outros estudos trabalharam com modelos de isquemia cerebral, os animais utilizados neste estudo eram animais intactos, e isso provavelmente tem uma grande influência na diferença dos resultados encontrados, uma vez que um desses estudos não observou a presença de neuroproteção induzida por agonistas GABAérgicos em animais não submetidos à isquemia cerebral (Xu et al., 2008). Xilouri e Papazafiri (2006) demonstraram que a alopregnanolona também apresenta um efeito neuroprotetor contra a neurotoxicidade induzida por NMDA em um modelo de cultura de células, e esse efeito foi acompanhado por um

aumento na expressão do mRNA das subunidades $\alpha 1$ e $\beta 2$ do receptor $GABA_A$. Uma das limitações técnicas do nosso estudo é a incapacidade de avaliarmos os aspectos funcionais da neurotransmissão GABAérgica, sendo que estudos de eletrofisiologia envolvendo o funcionamento desse receptor seriam de grande valia e nos auxiliariam na compreensão da relação desse sistema com os efeitos neuroprotetores da progesterona no hipotálamo. Todavia, parece claro que os neuroesteróides modulam a função neural através da sua influência dentro da sobrevivência e da excitabilidade neuronal e através da modulação da expressão gênica, e esses fatores podem estar diretamente relacionados com os seus efeitos sobre o comportamento.

Procedimentos de rotina como o transporte, a manipulação e a administração de injeções em animais de laboratório são eventos estressores para esses animais, todavia, são necessários na maior parte dos estudos de pesquisa básica. O estresse promovido por essas atividades pode afetar parâmetros fisiológicos em animais de laboratório e potencialmente alterar o resultado dos estudos (Drude et al., 2011). Estudos prévios realizados em nosso laboratório envolvendo um desenho experimental semelhante ao deste estudo mostraram que o estresse ocasionado por procedimentos laboratoriais de rotina e pela exposição dos animais ao teste do nado forçado pode alterar a secreção de hormônios relacionados ao estresse e a expressão de subunidades do receptor $GABA_A$ (Andrade et al., 2007; Andrade, 2010b). Dessa forma, realizamos um segundo experimento para observarmos o efeito agudo e crônico da manipulação e da administração de injeções intraperitoneais sobre os níveis séricos de hormônios relacionados ao estresse em ratos, além de observarmos o efeito da administração de progesterona sobre esses mesmos parâmetros.

O eixo HPA é a principal via efetora do sistema de resposta ao estresse, sendo que o órgão efector final desse eixo são as adrenais, que, no caso dos roedores, liberam

corticosterona em resposta ao estresse, sendo esse um marcador clássico para a avaliação do estresse em uma série de estudos (Patchev et al., 1991; Asai et al., 2004; Serra et al., 2005). No experimento agudo, envolvendo uma única contenção ou a administração de uma injeção única de veículo ou progesterona nos animais, verificamos uma maior concentração sérica de corticosterona nas fêmeas em relação aos machos. Em nosso laboratório, já demonstramos em outro experimento um aumento nos níveis de corticosterona em fêmeas em diestro após a administração aguda de DHEA em relação aos machos (Andrade et al., 2007). Outros estudos têm mostrado que as fêmeas apresentam uma resposta maior a um novo estressor do que os machos, o que teria relação com essa maior liberação de corticosterona (Jezova et al., 1996), de forma que o estresse também afeta os níveis de neurotransmissores no córtex frontal, no hipocampo e na amígdala, e essas alterações seriam dependentes do sexo (Beiko et al., 2004; Ordyan e Pivina, 2004). Já no experimento crônico, não houve diferenças sexuais ou entre os diferentes tipos de tratamento em relação aos níveis séricos de corticosterona, algo que também havia sido observado em outro experimento realizado em nosso laboratório (Andrade et al., 2007). Um fato interessante é o fato que encontramos uma redução nos níveis de corticosterona nas fêmeas no experimento crônico em relação ao experimento agudo, independente do tipo de tratamento. Isso sugere uma possível adaptação dessas fêmeas aos diferentes agentes estressores, tanto à manipulação como às injeções, o que poderia ter promovido uma redução na liberação de corticosterona das adrenais ao longo do tempo perante a exposição esse mesmo estímulo (Gadek-Michalska e Bugajski, 2003; Beiko et al., 2004). Esse mesmo fenômeno, porém, não foi reproduzido pelo grupo dos machos, possivelmente porque eles apresentaram níveis reduzidos de corticosterona no experimento agudo em relação às fêmeas, não ocorrendo nenhum tipo de adaptação significativa ao estresse ao longo

do tempo no que diz respeito a uma possível redução na liberação de corticosterona. Dessa forma, o sexo e a duração do estressor são importantes determinantes da função comportamental, neuroquímica e anatômica do estresse (Bowman et al., 2003).

A prolactina é outro hormônio estreitamente relacionado ao estresse, sendo que sua secreção aumenta em resposta a uma série de estressores, inclusive procedimentos de rotina no laboratório como a manipulação, o transporte e o estresse ocasionado por injeções, e dessa forma, a prolactina tem sido utilizada como um marcador de estresse por vários estudos (Deis et al., 1989; Franci et al., 1992; Asai et al., 2004, Balcombe et al., 2004; Jaroenporn et al., 2009). Através de estudos realizados *in vitro* em modelos de cultura de células da adrenal de ratos e *in vivo*, em um modelo de estresse por contenção, verificou-se que a prolactina estimula a secreção de corticosterona pelas adrenais, corroborando sua importância dentro da modulação da resposta hormonal ao estresse (Kan et al., 2003; Lo et al., 2006, Jaroenporn et al., 2007, Jaroenporn et al., 2009). Neste estudo, não encontramos alterações na secreção de prolactina entre os grupos tanto no experimento agudo quanto no experimento crônico, de forma que nem a manipulação e nem a administração intraperitoneal de veículo ou progesterona foram capazes de promover alterações na secreção desse hormônio. Um fato importante que poderia estar possivelmente envolvido com a ausência de alterações na secreção desse hormônio diz respeito ao tempo decorrido entre a exposição desses animais ao agente estressor e a coleta de sangue. A resposta hormonal ao estresse pode ocorrer dentro de poucos minutos, podendo ser rapidamente revertida ou permanecer alterada por horas (Radley et al., 2009). Em nosso estudo, a coleta de sangue foi feita após a eutanásia dos animais, que ocorreu 30 minutos após a exposição ao estresse da manipulação ou das injeções. Essa é uma limitação do nosso estudo, sendo que experimentos utilizando outras janelas temporais entre a exposição ao estresse e a coleta de sangue para a análise

hormonal seriam de grande valia para o melhor entendimento da regulação da secreção desses hormônios perante o estresse. Além disso, outro estudo já demonstrou a presença de um pico na secreção de prolactina 15 minutos após o estresse ocasionado por um modelo de contenção, sendo que 30 minutos após a exposição a esse agente estressor já havia uma queda considerável dos níveis circulantes desse hormônio em relação a esse pico (Jaroenporn et al., 2009), o que poderia explicar em parte os resultados observados em nosso trabalho.

Na comparação entre os experimentos agudo e crônico, todavia, observamos um aumento nos níveis séricos de prolactina nas fêmeas do experimento crônico em relação às fêmeas do experimento agudo, independente do tipo de tratamento, sendo que não houve diferença nos níveis séricos desse hormônio nos machos. Alguns estudos mostraram que a expressão do mRNA da prolactina na adenohipófise de fêmeas aumenta em resposta à exposição crônica a outros estressores como o estresse por choque nas patas após 3 dias de exposição ao estressor em relação a animais expostos apenas 1 dia ao mesmo estresse, enquanto após 14 dias de exposição a expressão do mRNA da prolactina retorna ao normal (Dave et al., 2000). Isso poderia ter uma relação direta com a maior secreção de prolactina observada nas fêmeas do experimento crônico em relação às do experimento agudo. Este resultado, entretanto, é exatamente o oposto do que foi observado em relação à secreção de corticosterona, cuja secreção foi menor nas fêmeas do experimento crônico em relação às do experimento agudo, e outros estudos indicam a presença de uma adaptação na secreção de prolactina em resposta à exposição crônica a um mesmo estressor (Martí e Armario, 1998). Dessa forma, os mecanismos envolvidos nessa maior secreção de prolactina pelas fêmeas do experimento crônico em relação às do experimento agudo ainda necessitam ser

esclarecidos, mas novamente observamos aqui uma diferença de sexo envolvida na resposta neuroendócrina ao estresse.

Nesse estudo, realizamos a administração de progesterona em ratos machos e em fêmeas ovariectomizadas, um esteróide com efeitos importantes sobre a modulação de diferentes tipos de comportamento, como, por exemplo, o comportamento tipo-depressivo e o comportamento de ansiedade, além de apresentar uma relação importante com o estresse, uma vez que também tem sua produção estimulada pela ativação do eixo HPA e pode se converter em corticosterona (Serra et al., 2008; Andrade et al., 2010a; Ren et al., 2010; Ter Horst et al., 2011). A dose administrada foi de 0,4mg/kg, uma dose mais baixa em comparação com as doses utilizadas por outros estudos (Molina-Hernandez e Téllez-Alcántara, 2002; Kaur e Kulkarni, 2002) (0,5 mg/kg, 2mg/kg e 10mg/kg), e que já apresentou um efeito antidepressivo após sua administração crônica em fêmeas em diestro no teste do nado forçado, sem alterar o funcionamento do eixo hipotálamo-hipófise-gonadal desses animais (Andrade et al., 2010a). Em relação à avaliação dos níveis séricos de progesterona, no experimento agudo, verificamos uma tendência ao aumento nos níveis desse hormônio nos animais tratados em relação aos demais grupos, sendo observada uma diferença significativa entre os machos tratados e os animais do grupo controle. Todavia, não encontramos diferença significativa entre a concentração sérica de progesterona entre os machos tratados e os grupos manipulados e veículo, assim como entre as fêmeas tratadas e os demais grupos experimentais, provavelmente devido ao fato de que a dose administrada foi uma dose relativamente baixa, e, aliada à alta variabilidade nos dados mensurados, não foi capaz de aumentar significativamente os níveis de progesterona circulantes nesses animais em relação aos demais. No experimento crônico, essa tendência de aumento nos níveis circulantes de progesterona nos animais tratados foi reduzida, apesar

de não termos encontrado diferenças significativas entre os níveis de progesterona nos animais do experimento crônico em comparação com os animais do experimento agudo devido à alta variabilidade e à distribuição não-paramétrica desses dados, e a única diferença encontrada foi entre o grupo dos machos tratados em relação ao grupo manipulado. Provavelmente, com a administração crônica desse esteróide, possa ocorrer um efeito de retroalimentação negativa relacionada à secreção de progesterona em ambos os sexos, nesse caso principalmente pelas adrenais, uma vez que as fêmeas eram ovariectomizadas, além do fato da exposição crônica à manipulação e à administração das injeções possivelmente reduzirem a ativação do eixo HPA em resposta a esses estressores (Gadek-Michalska e Bugajski, 2003; Beiko et al., 2004). Isso também reduziria os estímulos para a secreção de progesterona pelas adrenais e poderia explicar essa redução na tendência de aumento nos níveis desse hormônio nos grupos tratados em comparação com os demais grupos experimentais, apesar de, cabe novamente ressaltarmos, essa diferença não ter sido estatisticamente significativa. Por fim, interessante, apesar de a progesterona ser um hormônio conhecido principalmente por sua importância dentro do sexo feminino, não encontramos diferenças relacionadas ao sexo nos níveis circulantes desse hormônio, provavelmente devido ao fato de termos utilizado ratas ovariectomizadas nesse estudo.

6. Conclusões

Em suma, nossos resultados sugerem que o efeito neuroprotetor no hipotálamo causado pela redução na expressão da procaspase-3 seria um dos possíveis mecanismos envolvidos na ação antidepressiva da progesterona em fêmeas em diestro submetidas ao teste do nado forçado. O receptor GABA_A é outra via paralela sujeita à ação da progesterona, de forma que o aumento na expressão da subunidade $\alpha 4$ no hipotálamo, bem como a assimetria criada pela ação da progesterona na expressão dessa subunidade no bulbo olfatório também podem ter relação com o efeito antidepressivo da progesterona. Existem diferenças de sexo na resposta neuroendócrina ao estresse ocasionado por procedimentos laboratoriais de rotina e esse fato deve ser levado em consideração na interpretação dos resultados obtidos através da experimentação animal.

Referências Bibliográficas

ANDRADE, S. Efeitos da progesterona sobre o comportamento tipo-depressivo e sobre a expressão das subunidades do receptor GABA_A de ratos Wistar machos e fêmeas. Porto Alegre: UFRGS, 2010. 147p. Tese (Doutorado em Ciências Biológicas: Fisiologia) – Programa de Pós-Graduação de Ciências Biológicas: Fisiologia, Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2010b.

ANDRADE, S.; SILVEIRA, S.L.; ARBO, B.D.; BATISTA, B.A.; GOMEZ, R.; BARROS, H.M.; RIBEIRO, M.F. Sex-dependent antidepressant effects of lower doses of progesterone in rats. *Physiol Behav.* 99(5):687-90, 2010a.

ANDRADE, S.; SILVEIRA, S.L.; GOMEZ, R.; BARROS, H.M.; RIBEIRO, M.F. Gender differences of acute and chronic administration of dehydroepiandrosterone in rats submitted to the forced swimming test. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry.* 31(3):613-21, 2007.

ASAI, S.; OHTA, R.; SHIROTA, M.; WATANABE, G.; TAYA, K. Differential responses of the hypothalamo-pituitary-adrenocortical axis to acute restraint stress in Hatano high- and low-avoidance rats. *J Endocrinol.* 181(3):515-20, 2004.

ATTALI, G.; WEIZMAN, A.; GIL-AD, I.; REHAVI, M. Opposite modulatory effects of ovarian hormones on rat brain dopamine and serotonin transporters. *Brain Res.* 756(1-2):153-9, 1997.

BALCOMBE, J.P.; BARNARD, N.D.; SANDUSKY, C. Laboratory routines cause animal stress. *Contemp Top Lab Anim Sci.* 43(6):42-51, 2004.

BAO, A.M.; MEYNEN, G.; SWAAB, D.F. The stress system in depression and neurodegeneration: focus on the human hypothalamus. *Brain Res Rev.* 57(2):531-53, 2008.

BARBACCIA, M.L.; ROSCETTI, G.; TRABUCCHI, M.; PURDY, R.H.; MOSTALLINO, M.C.; CONCAS, A.; BIGGIO, G. The effects of inhibitors of GABAergic transmission and stress on brain and plasma allopregnanolone concentrations. *Br J Pharmacol.* 120(8):1582-8, 1997.

BARNARD, E.A.; SKOLNICK, P.; OLSEN, R.W.; MOHLER, H.; SIEGHART, W.; BIGGIO, G.; BRAESTRUP, C.; BATESON, A.N.; LANGER, S.Z. International Union of Pharmacology. XV. Subtypes of gamma-aminobutyric acidA receptors: classification on the basis of subunit structure and receptor function. *Pharmacol Rev.* 50(2):291-313, 1998.

BARRETT-CONNOR, E.; VON MÜHLEN, D.; LAUGHLIN, G.A.; KRIPKE, A. Endogenous levels of dehydroepiandrosterone sulfate, but not other sex hormones, are associated with depressed mood in older women: the Rancho Bernardo Study. *J Am Geriatr Soc.* 47(6):685-91, 1999.

BARROS, H.M.T. Neurofarmacologia da depressão: importância para o diagnóstico e tratamento. *R Pesq Méd.* 21(1):34-37, 1987.

BAULIEU, E.E. Neurosteroids: a novel function of the brain. *Psychoneuroendocrinology.* 23(8):963-87, 1998.

BAUR, R.; MINIER, F.; SIGEL, E. A GABA(A) receptor of defined subunit composition and positioning: concatenation of five subunits. *FEBS Lett.* 580(6):1616-20, 2006.

BECHTHOLT, A.J.; SMITH, K.; GAUGHAN, S.; LUCKI, I. Sucrose intake and fasting glucose levels in 5-HT(1A) and 5-HT(1B) receptor mutant mice. *Physiol Behav.* 93(4-5):659-65, 2008.

BECKLEY, E.H.; FINN, D.A. Inhibition of progesterone metabolism mimics the effect of progesterone withdrawal on forced swim test immobility. *Pharmacol Biochem Behav.* 87(4):412-9, 2007.

BEIKO, J.; LANDER, R.; HAMPSON, E.; BOON, F.; CAIN, D.P. Contribution of sex differences in the acute stress response to sex differences in water maze performance in the rat. *Behav Brain Res.* 151(1-2):239-53, 2004.

BENKE, D.; MICHEL, C.; MOHLER, H. GABA(A) receptors containing the alpha4-subunit: prevalence, distribution, pharmacology, and subunit architecture in situ. *J Neurochem.* 69(2):806-14, 1997.

BENMANSOUR, S.; PIOTROWSKI, J.P.; ALTAMIRANO, A.V.; FRAZER, A. Impact of ovarian hormones on the modulation of the serotonin transporter by fluvoxamine. *Neuropsychopharmacology.* 34(3):555-64, 2009.

BENNINGHOFF, J.; SCHMITT, A.; MÖSSNER, R.; LESCH, K.P. When cells become depressed: focus on neural stem cells in novel treatment strategies against depression. *J Neural Transm.* 109(5-6):947-62, 2002.

BETHEA, C.L.; REDDY, A.P.; TOKUYAMA, Y.; HENDERSON, J.A.; LIMA, F.B. Protective actions of ovarian hormones in the serotonin system of macaques. *Front Neuroendocrinol.* 30(2):212-38, 2009.

BIGGIO, G.; CONCAS, A.; FOLLESA, P.; SANNA, E.; SERRA, M. Stress, ethanol, and neuroactive steroids. *Pharmacol Ther.* 116(1):140-71, 2007.

BIRZNIECE, V.; BÄCKSTRÖM, T.; JOHANSSON, I.M.; LINDBLAD, C.; LUNDGREN, P.; LÖFGREN, M.; OLSSON, T.; RAGAGNIN, G.; TAUBE, M.; TURKMEN, S.; WAHLSTRÖM, G.; WANG, M.D.; WIHLBÄCK, A.C.; ZHU, D. Neuroactive steroid effects on cognitive functions with a focus on the serotonin and GABA systems. *Brain Res Rev.* 51(2):212-39, 2006.

BOLDINGH DEBERNARD, K.A.; AZIZ, G.; GJESVIK, A.T.; PAULSEN, R.E. Cell death induced by novel procaspase-3 activators can be reduced by growth factors. *Biochem Biophys Res Commun.* 413(2):364-9, 2011.

BOWMAN, R.E.; BECK, K.D.; LUINE, V.N. Chronic stress effects on memory: sex differences in performance and monoaminergic activity. *Horm Behav.* 43(1):48-59, 2003.

BRADFORD, M.M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem.* 72:248-54, 1976.

BRAMBILLA, P.; PEREZ, J.; BARALE, F.; SCHETTINI, G.; SOARES, J.C. GABAergic dysfunction in mood disorders. *Mol Psychiatry.* 8(8):721-37, 715, 2003.

BRICKLEY, S.G.; REVILLA, V.; CULL-CANDY, S.G.; WIDEN, W.; FARRANT, M. Adaptive regulation of neuronal excitability by a voltage-independent potassium conductance. *Nature.* 409(6816):88-92, 2001.

BRYANT, D.N.; SHELDAHL, L.C.; MARRIOTT, L.K.; SHAPIRO, R.A.; DORSA, D.M. Multiple pathways transmit neuroprotective effects of gonadal steroids. *Endocrine*. 29(2):199-207, 2006.

CAMPBELL, S.; MACQUEEN, G. An update on regional brain volume differences associated with mood disorders. *Curr Opin Psychiatry*. 19(1):25-33, 2006.

CARDONE, M.H.; ROY, N.; STENNICKE, H.R.; SALVESEN, G.S.; FRANKE, T.F.; STANBRIDGE, E.; FRISCH, S.; REED, J.C. Regulation of cell death protease caspase-9 by phosphorylation. *Science*. 282(5392):1318-21, 1998.

CHANDRA, D.; JIA, F.; LIANG, J.; PENG, Z.; SURYANARAYANAN, A.; WERNER, D.F.; SPIGELMAN, I.; HOUSER, C.R.; OLSEN, R.W.; HARRISON, N.L.; HOMANICS, G.E. GABAA receptor alpha 4 subunits mediate extrasynaptic inhibition in thalamus and dentate gyrus and the action of gaboxadol. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 103(41):15230-5, 2006.

CHOI, M.J.; LEE, H.J.; LEE, H.J.; HAM, B.J.; CHA, J.H.; RYU, S.H.; LEE, M.S. Association between Major Depressive Disorder and the -1438A/G Polymorphism of the Serotonin 2A Receptor Gene. *Neuropsychobiology*. 49(1):38-41, 2004.

CIPRIANI, A.; FURUKAWA, T.A.; GEDDES, J.R.; MALVINI, L.; SIGNORETTI, A.; MCGUIRE, H.; CHURCHILL, R.; NAKAGAWA, A.; BARBUI, C.; MANGA STUDY GROUP. Does randomized evidence support sertraline as first-line antidepressant for adults with acute major depression? A systematic review and meta-analysis. *J Clin Psychiatry*. 69(11):1732-42, 2008.

CIRIZA, I.; CARRERO, P.; FRYE, C.A.; GARCIA-SEGURA, L.M. Reduced metabolites mediate neuroprotective effects of progesterone in the adult rat

hippocampus. The synthetic progestin medroxyprogesterone acetate (Provera) is not neuroprotective. *J Neurobiol.* 66(9):916-28, 2006.

COZZI, A.; MELI, E.; CARLÀ, V.; PELLICCIARI, R.; MORONI, F.; PELLEGRINI-GIAMPIETRO, D.E. Metabotropic glutamate 1 (mGlu1) receptor antagonists enhance GABAergic neurotransmission: a mechanism for the attenuation of post-ischemic injury and epileptiform activity? *Neuropharmacology.* 43(2):119-30, 2002.

DAMY, S.B.; CAMARGO, R.S.; CHAMMAS, R.; FIGUEIREDO, L.F. Fundamental aspects on animal research as applied to experimental surgery. *Rev Assoc Med Bras.* 56(1):103-11, 2010.

DAVE, J.R.; ANDERSON, S.M.; SAVIOLAKIS, G.A.; MOUGEY, E.H.; BAUMAN, R.A.; KANT, G.J. Chronic sustained stress increases levels of anterior pituitary prolactin mRNA. *Pharmacol Biochem Behav.* 67(3):423-31, 2000.

DE BLAS, A.L. Brain GABAA receptors studied with subunit-specific antibodies. *Mol Neurobiol.* 12(1):55-71, 1996.

DEIS, R.P.; LEGUIZAMON, E.; JAHN, G.A. Feedback regulation by progesterone of stress-induced prolactin release in rats. *J Endocrinol.* 120(1):37-43, 1989.

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

DRUDE, S.; GEISLER, A.; OLFE, J.; STARKE, A.; DOMANSKA, G.; SCHUETT, C.; KIANK-NUSSBAUM, C. Side effects of control treatment can conceal experimental data when studying stress responses to injection and psychological stress in mice. *Lab Anim (NY).* 40(4):119-28, 2011.

DSM IV – Manual Diagnóstico e Estatístico de Transtornos Mentais. 4ª edição. Artmed, 2002.

DUBROVSKY, B. Neurosteroids, neuroactive steroids, and symptoms of affective disorders. *Pharmacol Biochem Behav.* 84(4):644-55, 2006.

DUMAN, C.H.; SCHLESINGER, L.; KODAMA, M.; RUSSELL, D.S.; DUMAN, R.S. A role for MAP kinase signaling in behavioral models of depression and antidepressant treatment. *Biol Psychiatry.* 61(5):661-70, 2007.

ESER, D.; SCHULE, C.; ROMEO, E.; BAGHAI, T.C.; DI MICHELE, F.; PASINI, A.; ZWANZGER, P.; PADBERG, F.; RUPPRECHT, R. Neuropsychopharmacological properties of neuroactive steroids in depression and anxiety disorders. *Psychopharmacology (Berl).* 186(3):373-87, 2006.

ESTRADA-CAMARENA, E.; CONTRERAS, C.M.; SAAVEDRA, M.; LUNA-BALTAZAR, I.; LÓPEZ-RUBALCAVA, C. Participation of the lateral septal nuclei (LSN) in the antidepressant-like actions of progesterone in the forced swimming test (FST). *Behav Brain Res.* 134(1-2):175-83, 2002.

FABIAN, T.J.; DEW, M.A.; POLLOCK, B.G.; REYNOLDS, C.F. 3RD.; MULSANT, B.H.; BUTTERS, M.A.; ZMUDA, M.D.; LINARES, A.M.; TROTTINI, M.; KROBOTH, P.D. Endogenous concentrations of DHEA and DHEA-S decrease with remission of depression in older adults. *Biol Psychiatry.* 50(10):767-74, 2001.

FAN, Y.; CHEN, H.; QIAO, B.; LUO, L.; MA, H.; LI, H.; JIANG, J.; NIU, D.; YIN, Z. Opposing effects of ERK and p38 MAP kinases on HeLa cell apoptosis induced by dipyrithione. *Mol Cells.* 23(1):30-8, 2007.

FARRANT, M.; NUSSER, Z. Variations on an inhibitory theme: phasic and tonic activation of GABA(A) receptors. *Nat Rev Neurosci.* 6(3):215-29, 2005.

FATEMI, S.H.; STARY, J.M.; EARLE, J.A.; ARAGHI-NIKNAM, M.; EAGAN, E. GABAergic dysfunction in schizophrenia and mood disorders as reflected by decreased levels of glutamic acid decarboxylase 65 and 67 kDa and Reelin proteins in cerebellum. *Schizophr Res.* 72(2-3):109-22, 2005.

FOLLESA, P.; MOSTALLINO, M.C.; BIGGIO, F.; GORINI, G.; CARIA, S.; BUSONERO, F.; MURRU, L.; MURA, M.L.; SANNA, E.; BIGGIO, G. Distinct patterns of expression and regulation of GABA receptors containing the delta subunit in cerebellar granule and hippocampal neurons. *J Neurochem.* 94(3):659-71, 2005.

FRANCI, C.R.; ANSELMO-FRANCI, J.A.; MCCANN, S.M. The role of endogenous atrial natriuretic peptide in resting and stress-induced release of corticotropin, prolactin, growth hormone, and thyroid-stimulating hormone. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 89(23):11391-5, 1992.

FREEMAN, E.W.; SAMMEL, M.D.; LIU, L.; GRACIA, C.R.; NELSON, D.B.; HOLLANDER, L. Hormones and menopausal status as predictors of depression in women in transition to menopause. *Arch Gen Psychiatry.* 61(1):62-70, 2004.

FREICHEL, C.; POTSCHKA, H.; EBERT, U.; BRANDT, C.; LÖSCHER, W. Acute changes in the neuronal expression of GABA and glutamate decarboxylase isoforms in the rat piriform cortex following status epilepticus. *Neuroscience.* 141(4):2177-94, 2006.

FRYE, C.A. Progesterone attenuates depressive behavior of younger and older adult C57/BL6, wildtype, and progesterone receptor knockout mice. *Pharmacol Biochem Behav.* 99(4):525-31, 2011.

FRYE, C.A.; WALF, A.A.; RHODES, M.E.; HARNEY, J.P. Progesterone enhances motor, anxiolytic, analgesic, and antidepressive behavior of wild-type mice, but not those deficient in type 1 5 alpha-reductase. *Brain Res.* 1004(1-2):116-24, 2004.

FUCHS, E.; CZÉH, B.; KOLE, M.H.; MICHAELIS, T.; LUCASSEN, P.J. Alterations of neuroplasticity in depression: the hippocampus and beyond. *Eur Neuropsychopharmacol.* 14(Suppl 5):S481-90, 2004.

GADEK-MICHALSKA, A.; BUGAJSKI, J. Repeated handling, restraint, or chronic crowding impair the hypothalamic-pituitary-adrenocortical response to acute restraint stress. *J Physiol Pharmacol.* 54(3):449-59, 2003.

GALEFFI, F.; SINNAR, S.; SCHWARTZ-BLOOM, R.D. Diazepam promotes ATP recovery and prevents cytochrome c release in hippocampal slices after in vitro ischemia. *J Neurochem.* 75(3):1242-9, 2000.

GARCIA-SEGURA, L.M.; MELCANGI, R.C. Steroids and glial cell function. *Glia.* 54(6):485-98, 2006.

GLASOW, A.; BREIDERT, M.; HAIDAN, A.; ANDEREGG, U.; KELLY, P.A.; BORNSTEIN, S.R. Functional aspects of the effect of prolactin (PRL) on adrenal steroidogenesis and distribution of the PRL receptor in the human adrenal gland. *J Clin Endocrinol Metab.* 81(8):3103-11, 1996.

GOODNICK, P.J.; CHAUDRY, T.; ARTADI, J.; ARCEY, S. Women's issues in mood disorders. *Expert Opin Pharmacother.* 1(5):903-16, 2000.

GREEN, A.R.; HAINSWORTH, A.H.; JACKSON, D.M. GABA potentiation: a logical pharmacological approach for the treatment of acute ischaemic stroke. *Neuropharmacology.* 39(9):1483-94, 2000.

GRIFFITHS, J.L.; LOVICK, T.A. GABAergic neurones in the rat periaqueductal grey matter express alpha4, beta1 and delta GABAA receptor subunits: plasticity of expression during the estrous cycle. *Neuroscience.* 136(2):457-66, 2005.

GRIFFITHS, J.; LOVICK, T. Withdrawal from progesterone increases expression of alpha4, beta1, and delta GABA(A) receptor subunits in neurons in the periaqueductal gray matter in female Wistar rats. *J Comp Neurol.* 486(1):89-97, 2005.

GUARNERI, P.; GUARNERI, R.; LA BELLA, V.; SCONDOTTO, S.; SCOPPA, F.; PICCOLI, F. Lateral differences in GABA binding sites in rat brain. *Neurochem Res.* 13(3):209-11, 1988.

GUERRA-ARAIZA, C.; AMORIM, M.A.; PINTO-ALMAZÁN, R.; GONZÁLEZ-ARENAS, A.; CAMPOS, M.G.; GARCIA-SEGURA, L.M. Regulation of the phosphoinositide-3 kinase and mitogen-activated protein kinase signaling pathways by progesterone and its reduced metabolites in the rat brain. *J Neurosci Res.* 87(2):470-81, 2009.

GUENNOUN, R.; MEFFRE, D.; LABOMBARDA, F.; GONZALEZ, S.L.; DENISELLE, M.C.; STEIN, D.G.; DE NICOLA, A.F.; SCHUMACHER, M. The membrane-associated progesterone-binding protein 25-Dx: expression, cellular

localization and up-regulation after brain and spinal cord injuries. *Brain Res Rev.* 57(2):493-505, 2008.

GULINELLO, M.; GONG, Q.H.; LI, X.; SMITH, S.S. Short-term exposure to a neuroactive steroid increases alpha4 GABA(A) receptor subunit levels in association with increased anxiety in the female rat. *Brain Res.* 910(1-2):55-66, 2001.

GUNDLAH, C.; LU, N.Z.; BETHEA, C.L. Ovarian steroid regulation of monoamine oxidase-A and -B mRNAs in the macaque dorsal raphe and hypothalamic nuclei. *Psychopharmacology (Berl).* 160(3):271-82, 2002.

HERD, M.B.; BELELLI, D.; LAMBERT, J.J. Neurosteroid modulation of synaptic and extrasynaptic GABA(A) receptors. *Pharmacol Ther.* 116(1):20-34, 2007.

HINDMARCH, I. Beyond the monoamine hypothesis: mechanisms, molecules and methods. *Eur Psychiatry.* 17 Suppl 3:294-9, 2002.

HSU, F.C.; SMITH, S.S. Progesterone withdrawal reduces paired-pulse inhibition in rat hippocampus: dependence on GABA(A) receptor alpha4 subunit upregulation. *J Neurophysiol.* 89(1):186-98, 2003.

HSU, F.C.; WALDECK, R.; FABER, D.S.; SMITH, S.S. Neurosteroid effects on GABAergic synaptic plasticity in hippocampus. *J Neurophysiol.* 89(4):1929-40, 2003.

HU, W.; SHEN, T.; WANG, M.H. Cell cycle arrest and apoptosis induced by methyl 3,5-dicaffeoyl quinate in human colon cancer cells: Involvement of the PI3K/Akt and MAP kinase pathways. *Chem. Biol. Interact.* 194:48-57, 2011.

HUNSBERGER, J.; AUSTIN, D.R.; HENTER, I.D.; CHEN, G. The neurotrophic and neuroprotective effects of psychotropic agents. *Dialogues Clin Neurosci.* 11(3):333-48, 2009.

ITO, H.; WATANABE, Y.; ISSHIKI, A.; UCHINO, H. Neuroprotective properties of propofol and midazolam, but not pentobarbital, on neuronal damage induced by forebrain ischemia, based on the GABAA receptors. *Acta Anaesthesiol Scand.* 43(2):153-62, 1999.

JAROENPORN, S.; NAGAOKA, K.; OHTA, R.; WATANABE, G.; TAYA, K. Direct effects of prolactin on adrenal steroid release in male Hatano high-avoidance (HAA) rats may be mediated through Janus kinase 2 (Jak2) activity. *J Reprod Dev.* 53(4):887-93, 2007.

JAROENPORN, S.; NAGAOKA, K.; OHTA, R.; WATANABE, G.; TAYA, K. Prolactin induces phosphorylation of the STAT5 in adrenal glands of Hatano rats during stress. *Life Sci.* 85(3-4):172-7, 2009.

JEZOVÁ, D.; JURÁNKOVÁ, E.; MOSNÁROVÁ, A.; KRISKA, M.; SKULTÉYOVÁ, I. Neuroendocrine response during stress with relation to gender differences. *Acta Neurobiol Exp (Wars).* 56(3):779-85, 1996.

KAMINSKA, B.; CIERESZKO R.E.; OPALKA, M.; DUSZA, L. Prolactin signaling in porcine adrenocortical cells: involvement of protein kinases. *Domest Anim Endocrinol.* 23(4):475-91, 2002.

KAN, S.F.; KAU, M.M.; LOW-TONE HO L., WANG, P.S. Inhibitory effects of bromocriptine on corticosterone secretion in male rats. *Eur J Pharmacol.* 468(2):141-9, 2003.

KARMAKAR, S.W.; BOTTUM, K.M.; KRAGER, S.L.; TISCHKAU, S.A. ERK/MAPK is essential for endogenous neuroprotection in SCN2.2 cells. *PLoS One*. 6(8):e23493, 2011.

KAUR, G.; KULKARNI, S.K. Evidence for serotonergic modulation of progesterone-induced hyperphagia, depression and algesia in female mice. *Brain Res*. 943(2):206-15, 2002.

KAUR, P.; JODHKA, P.K.; UNDERWOOD, W.A.; BOWLES, C.A.; DE FIEBRE, N.C.; DE FIEBRE, C.M.; SINGH, M. Progesterone increases brain-derived neurotrophic factor expression and protects against glutamate toxicity in a mitogen-activated protein kinase- and phosphoinositide-3 kinase-dependent manner in cerebral cortical explants. *J Neurosci Res*. 85(11):2441-9, 2007.

KESSLER, R.C.; MCGONAGLE, K.A.; ZHAO, S.; NELSON, C.B.; HUGHES, M.; ESHLEMAN, S.; WITTCHEN, H.U.; KENDLER, K.S. Life-time and 12 month prevalence of DSM-iii-r psychiatric disorders in the United States. *Arch Gen Psychiatry*. 51:8-19, 1994.

KIM, N.H.; KIM, K.; PARK, W.S.; SON, H.S.; BAE, Y. PKB/Akt inhibits ceramide-induced apoptosis in neuroblastoma cells by blocking apoptosis-inducing factor (AIF) translocation. *J. Cell. Biochem*. 102:1160-1170, 2007.

KOOY, A.; DE GREEF, W.J.; VREEBURG, J.T.; HACKENG, W.H.; OOMS, M.P.; LAMBERTS, S.W.; WEBER, R.F. Evidence for the involvement of corticotropin-releasing factor in the inhibition of gonadotropin release induced by hyperprolactinemia. *Neuroendocrinology*. 51(3):261-6, 1990.

KRAJNAK, K.; ROSEWELL, K.L.; DUNCAN, M.J.; WISE P.M. Aging, estradiol and time of day differentially affect serotonin transporter binding in the central nervous system of female rats. *Brain Res.* 990(1-2):87-94, 2003.

KRAM, M.L.; KRAMER, G.L.; STECIUK, M.; RONAN, P.J.; PETTY, F. Effects of learned helplessness on brain GABA receptors. *Neurosci Res.* 38(2):193-8, 2000.

KREBS, C.J.; JARVIS, E.D.; CHAN, J.; LYDON, J.P.; OGAWA, S.; PFAFF, D.W. A membrane-associated progesterone-binding protein, 25-Dx, is regulated by progesterone in brain regions involved in female reproductive behaviors. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 97(23):12816-21, 2000.

KUBERA, M.; OBUCHOWICZ, E.; GOEHLER, L.; BRZESZCZ, J.; MAES, M. In animal models, psychosocial stress-induced (neuro)inflammation, apoptosis and reduced neurogenesis are associated to the onset of depression. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry.* 35(3):744-59, 2011.

KULINSKII, V.I.; MIKHEL'SON, G.V. Additivity and independence of neuroprotective effects of GABAA and GABAB receptor agonists in complete global cerebral ischemia. *Bull Exp Biol Med.* 130(8):772-4, 2000.

LABRUTO, F.; VAAGE, J.; LI, G.; VALEN, G. Intraperitoneal injection induces a delayed preconditioning-like effect in mice. *Lab Anim.* 39(3):298-307, 2005.

LAURIE, D.J.; SEEBURG, P.H.; WISDEN, W. The distribution of 13 GABAA receptor subunit mRNAs in the rat brain. II. Olfactory bulb and cerebellum. *J Neurosci.* 12(3):1063-76, 1992.

LENOX, R.H.; FRAZER, A. Mechanism of Action of Antidepressants and Mood-Stabilizers. Lippincott Williams & Wilkins: Philadelphia.

LIANG, J.; ZHANG, N.; CAGETTI, E.; HOUSER, C.R.; OLSEN, R.W.; SPIGELMAN, I. Chronic intermittent ethanol-induced switch of ethanol actions from extrasynaptic to synaptic hippocampal GABAA receptors. *J Neurosci.* 26(6):1749-58, 2006.

LIU, L.; ZHAO, L.; SHE, H.; CHEN, S.; WANG, J.M.; WONG, C.; MCCLURE, K.; SITRUK-WARE, R.; BRINTON, R.D. Clinically relevant progestins regulate neurogenic and neuroprotective responses in vitro and in vivo. *Endocrinology.* 151(12):5782-94, 2010.

LOGIN, I.S.; PAL, S.N.; ADAMS, D.T.; GOLD, P.E. Muscimol increases acetylcholine release by directly stimulating adult striatal cholinergic interneurons. *Brain Res.* 779(1-2):33-40, 1998.

LO, M.J.; KAU, M.M.; WANG, P.S. Effect of aging on corticosterone secretion in diestrous rats. *J Cell Biochem.* 97(2):351-8, 2006.

LO, M.J.; WANG, P.S. Relative and combined effects of estradiol and prolactin on corticosterone secretion in ovariectomized rats. *Chin J Physiol.* 46(3):103-9, 2003.

LU, N.Z.; ESHLEMAN, A.J.; JANOWSKY, A.; BETHEA, C.L. Ovarian steroid regulation of serotonin reuptake transporter (SERT) binding, distribution, and function in female macaques. *Mol Psychiatry.* 8(3):353-60, 2003.

MAES, M.; YIRMYIA, R.; NORABERG, J.; BRENE, S.; HIBBELN, J.; PERINI, G.; KUBERA, M.; BOB, P.; LERER, B.; MAJ, M. The inflammatory & neurodegenerative

(I&ND) hypothesis of depression: leads for future research and new drug developments in depression. *Metab Brain Dis.* 24(1):27-53, 2009.

MANAYE, K.F.; LEI, D.L.; TIZABI, Y.; DÁVILA-GARCÍA, M.I.; MOUTON, P.R.; KELLY, P.H. Selective neuron loss in the paraventricular nucleus of hypothalamus in patients suffering from major depression and bipolar disorder. *J Neuropathol Exp Neurol.* 64(3):224-9, 2005.

MANI, S. Progesterin receptor subtypes in the brain: the known and the unknown. *Endocrinology.* 149(6):2750-6, 2008.

MANJI, H.K.; DUMAN, R.S. Impairments of neuroplasticity and cellular resilience in severe mood disorders: implications for the development of novel therapeutics. *Psychopharmacol Bull.* 35(2):5-49, 2001.

MARGOLIS, E.B.; MITCHELL, J.M.; HJELMSTAD, G.O.; FIELDS, H.L. A novel opioid receptor-mediated enhancement of GABAA receptor function induced by stress in ventral tegmental area neurons. *J Physiol.* 589(Pt 17):4229-42, 2011.

MARTÍ, O.; ARMARIO, A. Anterior pituitary response to stress: time-related changes and adaptation. *Int J Dev Neurosci.* 16(3-4):241-60, 1998.

MARTÍNEZ-MOTA, L.; CONTRERAS, C.M.; SAAVEDRA, M. Progesterone reduces immobility in rats forced to swim. *Arch Med Res.* 30(4):286-9, 1999.

MCDONOUGH, L.B.; EWIG, J.E. Immunocytochemical localization of prolactin binding sites in mouse adrenal gland. *Comp Biochem Physiol A Comp Physiol.* 72(1):259-61, 1982.

MCQUEEN, J.K.; WILSON, H.; FINK, G. Estradiol-17 beta increases serotonin transporter (SERT) mRNA levels and the density of SERT-binding sites in female rat brain. *Brain Res Mol Brain Res.* 45(1):13-23, 1997.

MENDELSON, S.D.; MCKITTRICK, C.R.; MCEWEN, B.S. Autoradiographic analyses of the effects of estradiol benzoate on [3H]paroxetine binding in the cerebral cortex and dorsal hippocampus of gonadectomized male and female rats. *Brain Res.* 601(1-2):299-302, 1993.

MINISTÉRIO DA SAÚDE – Dados epidemiológicos. Disponível em: http://portal.saude.gov.br/saude/visualizar_texto.cfm?idtxt=19108. Acesso em: 08 de set. 2009.

MILLAN, M.J. Dual- and triple-acting agents for treating core and co-morbid symptoms of major depression: novel concepts, new drugs. *Neurotherapeutics.* 6(1):53-77, 2009.

MILLAN, M.J. Multi-target strategies for the improved treatment of depressive states: Conceptual foundations and neuronal substrates, drug discovery and therapeutic application. *Pharmacol Ther.* 110(2):135-370, 2006.

MOLINA-HERNÁNDEZ, M.; CONTRERAS, C.M.; TÉLLEZ-ALCÁNTARA, P. Antidepressant-like effects of pregnancy and progesterone in Wistar rats as measured in the differential reinforcement of the low-rate 72 s task. *Psychopharmacology (Berl).* 151(4):306-11, 2000.

MOLINA-HERNÁNDEZ, M.; TÉLLEZ-ALCÁNTARA, N.P. Antidepressant-like actions of pregnancy, and progesterone in Wistar rats forced to swim. *Psychoneuroendocrinology.* 26(5):479-91, 2001.

MORROW, A.L. Recent developments in the significance and therapeutic relevance of neuroactive steroids--Introduction to the special issue. *Pharmacol Ther.* 116(1):1-6, 2007.

NAIR, V.D.; OLANOW, C.W. Differential modulation of Akt/glycogen synthase kinase-3beta pathway regulates apoptotic and cytoprotective signaling responses. *J Biol Chem.* 283(22):15469-78, 2008.

NEMEROFF, C.B. The corticotropin-releasing factor (CRF) hypothesis of depression: new findings and new directions. *Mol Psychiatry.* 1(4):336-42, 1996.

NIN, M.S.; SALLES, F.B.; AZEREDO, L.A.; FRAZON, A.P.; GOMEZ, R.; BARROS, H.M. Antidepressant effect and changes of GABAA receptor gamma2 subunit mRNA after hippocampal administration of allopregnanolone in rats. *J Psychopharmacol.* 22(5):477-85. 2008.

OLFE, J.; DOMANSKA, G.; SCHUETT, C.; KIANK, C. Different stress-related phenotypes of BALB/c mice from in-house or vendor: alterations of the sympathetic and HPA axis responsiveness. *BMC Physiol.* 10:2, 2010.

OLSEN, R.W.; HANCHAR, H.J.; MEERA, P.; WALLNER, M. GABAA receptor subtypes: the "one glass of wine" receptors. *Alcohol.* 41(3):201-9, 2007.

ONTÉNIENTE, B.; SIMON, H.; TAGHZOUTI, K.; GEFFARD, M.; LE MOAL, M.; CALAS, A. Dopamine-GABA interactions in the nucleus accumbens and lateral septum of the rat. *Brain Res.* 421(1-2):391-6, 1987.

ORDAZ, S.; LUNA, B. Sex differences in physiological reactivity to acute psychosocial stress in adolescence. *Psychoneuroendocrinology.* Jan 24, 2012 [Epub ahead of print].

ORDYAN, N.E.; PIVINA, S.G. Characteristics of the behavior and stress-reactivity of the hypophyseal-adrenal system in prenatally stressed rats. *Neurosci Behav Physiol.* 34(6):569-74, 2004.

OUHTIT, A.; MOREL, G.; KELLY, P.A. Visualization of gene expression of short and long forms of prolactin receptor in the rat. *Endocrinology.* 133(1):135-44, 1993.

PATCHEV, V.; FELSZEGHY, K.; KORÁNYI, L. Neuroendocrine and neurochemical consequences of long-term sleep deprivation in rats: similarities to some features of depression. *Homeost Health Dis.* 33(3):97-108, 1991.

PAUL, I.A. Excitatory amino acid signaling, major depression and the action of antidepressants. *Pharmaceutical News.* 8:33-44.

PELUSO, E.T.; BLAY, S.L. Public perception of depression in the city of São Paulo. *Rev Saude Publica.* 42(1):41-8, 2008.

PIERSON, R.C.; LYONS, A.M.; GREENFIELD, L.J. JR. Gonadal steroids regulate GABAA receptor subunit mRNA expression in NT2-N neurons. *Brain Res Mol Brain Res.* 138(2):105-15, 2005.

PLASSART-SCHIESS, E.; BAULIEU, E.E. Neurosteroids: recent findings. *Brain Res Rev.* 37:133-140, 2001.

PLUCHINO, N.; LUISI, M.; LENZI, E.; CENTOFANTI, M.; BEGLIUMINI, S.; FRESCHI, L.; NINNI, F.; GENAZZANI, A.R. Progesterone and progestins: effects on brain, allopregnanolone and beta-endorphin. *J Steroid Biochem Mol Biol.* 102(1-5):205-13, 2006.

PORSOLT, R.D.; LE PICHON, M.; JALFRE, M. Depression: a new animal model sensitive to antidepressant treatments. *Nature*. 266(5604):730-2, 1977.

RADLEY, J.J.; GOSSELINK, K.L.; SAWCHENKO, P.E. A discrete GABAergic relay mediates medial prefrontal cortical inhibition of the neuroendocrine stress response. *J Neurosci*. 29(22):7330-40, 2009.

RAONE, A.; CASSANELLI, A.; SCHEGGI, S.; RAUGGI, R.; DANIELLI, B.; DE MONTIS, M.G. Hypothalamus-pituitary-adrenal modifications consequent to chronic stress exposure in an experimental model of depression in rats. *Neuroscience*. 146(4):1734-42, 2007.

REIS, F.M.; ALBRECHET-SOUZA, L.; FRANCI, C.R.; BRANDÃO, M.L. Risk assessment behaviors associated with corticosterone trigger the defense reaction to social isolation in rats: Role of the anterior cingulate cortex. *Stress*. Oct 12, 2011 [Epub ahead of print].

REN, L.; LI, X.; WENG, Q.; TRISOMBOON, H.; YAMAMOTO, T.; PAN, L.; WATANABE, G.; TAYA, K. Effects of acute restraint stress on sperm motility and secretion of pituitary, adrenocortical and gonadal hormones in adult male rats. *J Vet Med Sci*. 72(11):1501-6, 2010.

ROCHE, M.; HARKIN, A.; KELLY, J.P. Chronic fluoxetine treatment attenuates stressor-induced changes in temperature, heart rate, and neuronal activation in the olfactory bulbectomized rat. *Neuropsychopharmacology*. 32(6):1312-20, 2007.

RUPPRECHT, R. Neuroactive steroids: mechanisms of action and neuropsychopharmacological properties. *Psychoneuroendocrinology*. 28(2):139-68, 2003.

SANCHEZ, R.L.; REDDY, A.P.; CENTENO, M.L.; HENDERSON, J.A.; BETHEA, C.L. A second tryptophan hydroxylase isoform, TPH-2 mRNA, is increased by ovarian steroids in the raphe region of macaques. *Brain Res Mol Brain Res.* 135(1-2):194-203, 2005.

SCHMIDT, P.J.; HAQ, N.; RUBINOW, D.R. A longitudinal evaluation of the relationship between reproductive status and mood in perimenopausal women. *Am J Psychiatry.* 161(12):2238-44, 2004.

SCHUMACHER, M.; AKWA, Y.; GUENNOUN, R.; ROBERT, F.; LABOMBARDA, F.; DESARNAUD, F.; ROBEL, P.; DE NICOLA, A.F.; BAULIEU, E.E. Steroid synthesis and metabolism in the nervous system: trophic and protective effects. *J Neurocytol.* 29:307-326, 2000.

SERRA, M.; PISU, M.G.; FLORIS, I.; BIGGIO, G. Social isolation-induced changes in the hypothalamic-pituitary-adrenal axis in the rat. *Stress.* 8(4):259-64, 2005.

SERRA, M.; PISU, M.G.; LITTERA, M.; PAPI, G.; SANNA, E.; TUVERI, F.; USALA, L.; PURDY, R.H.; BIGGIO, G. Social isolation-induced decreases in both the abundance of neuroactive steroids and GABA(A) receptor function in rat brain. *J Neurochem.* 75(2):732-40, 2000.

SERRA, M.; PISU, M.G.; MOSTALLINO, M.C.; SANNA, E.; BIGGIO, G. Changes in neuroactive steroid content during social isolation stress modulate GABAA receptor plasticity and function. *Brain Res Rev.* 57(2):520-30, 2008.

SHEN, H.; GONG, Q.H.; AOKI, C.; YUAN, M.; RUDERMAN, Y.; DATTILO, M.; WILLIAMS, K.; SMITH, S.S. Reversal of neurosteroid effects at alpha4beta2delta GABAA receptors triggers anxiety at puberty. *Nat Neurosci.* 10(4):469-77, 2007.

SHEN, H.; GONG, Q.H.; YUAN, M.; SMITH, S.S. Short-term steroid treatment increases delta GABAA receptor subunit expression in rat CA1 hippocampus: pharmacological and behavioral effects. *Neuropharmacology*. 49(5):573-86, 2005.

SHORS, T.J.; LEUNER, B. Estrogen-mediated effects on depression and memory formation in females. *J Affective Disorders*. 74:85-96, 2003.

SILVA, E.J.; FELICIO, L.F.; NASELLO, A.G.; ZAIDAN-DAGLI, M.; ANSELMO-FRANCI, J.A. Prolactin induces adrenal hypertrophy. *Braz J Med Biol Res*. 37(2):193-9, 2004.

SIMPKINS, J.W.; YANG, S.H.; WEN, Y.; SINGH, M. Estrogens, progestins, menopause and neurodegeneration: basic and clinical studies. *Cell Mol Life Sci*. 62(3):271-80, 2005.

SINGH, M.; SUMIEN, N.; KYSER, C.; SIMPKINS, J.W. Estrogens and progesterone as neuroprotectants: what animal models teach us. *Front Biosci*. 13:1083-9, 2008.

SKOLNICK, P.; POPIK, P.; JANOWSKY, A.; BEER, B.; LIPPA, A.S. "Broad spectrum" antidepressants: is more better for the treatment of depression? *Life Sci*. 73(25):3175-9, 2003.

SMITH, L.J.; HENDERSON, J.A.; ABELL, C.W.; BETHEA, C.L. Effects of ovarian steroids and raloxifene on proteins that synthesize, transport, and degrade serotonin in the raphe region of macaques. *Neuropsychopharmacology*. 29(11):2035-45, 2004.

SMITH, S.S.; CHAPIN, J.K. The estrous cycle and the olivo-cerebellar circuit. II. Enhanced selective sensory gating of responses from the rostral dorsal accessory olive. *Exp Brain Res*. 111(3):385-92, 1996.

SMITH, S.S.; GONG, Q.H.; HSU, F.C.; MARKOWITZ, R.S.; FRENCH-MULLEN, J.M.; LI, X. GABA(A) receptor alpha4 subunit suppression prevents withdrawal properties of an endogenous steroid. *Nature*. 392(6679):926-30, 1998.

SMITH, S.S.; SHEN, H.; GONG, Q.H.; ZHOU, X. Neurosteroid regulation of GABA(A) receptors: Focus on the alpha4 and delta subunits. *Pharmacol Ther*. 116(1):58-76, 2007.

STAHL, S.M. *Psicofarmacologia – Depressão e Transtornos Bipolares*. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2000.

STEWART, D.E.; ROLFE, D.E.; ROBERTSON, E. Depression, estrogen, and the Women's Health Initiative. *Psychosomatics*. 45(5):445-7, 2004.

STOFFEL, E.C.; CRAFT, R.M. Ovarian hormone withdrawal-induced "depression" in female rats. *Physiol Behav*. 83(3):505-13, 2004.

STOFFEL-WAGNER, B. Neurosteroid biosynthesis in the human brain and its clinical implications. *Ann N Y Acad Sci*. 1007:64-78, 2003.

SUMNER, B.E.; GRANT, K.E.; ROSIE, R.; HEGELE-HARTUNG, C.; FRITZEMEIER, K.H.; Fink G. Effects of tamoxifen on serotonin transporter and 5-hydroxytryptamine(2A) receptor binding sites and mRNA levels in the brain of ovariectomized rats with or without acute estradiol replacement. *Brain Res Mol Brain Res*. 1999 Nov 10;73(1-2):119-28.

SWAAB, D.F.; BAO, A.M.; LUCASSEN, P.J. The stress system in the human brain in depression and neurodegeneration. *Ageing Res Rev*. 4(2):141-94, 2005.

TANG, C.; LU, Y.H.; XIE, J.H.; WANG, F.; ZOU, J.N.; YANG, J.S.; XING, Y.Y.; XI, T. Downregulation of survivin and activation of caspase-3 through the PI3K/Akt pathway in ursolic acid-induced HepG2 cell apoptosis. *Anticancer Drugs*. 20(4):249-58, 2009.

TER HORST, J.P.; DE KLOET, E.R.; SCHÄCHINGER, H.; OITZL, M.S. Relevance of Stress and Female Sex Hormones for Emotion and Cognition. *Cell Mol Neurobiol*. Nov 24, 2011 [Epub ahead of print].

TOKUYAMA, Y.; REDDY, A.P.; BETHEA, C.L. Neuroprotective actions of ovarian hormones without insult in the raphe region of rhesus macaques. *Neuroscience*. 154(2):720-31, 2008.

TRANEL, D.; BECHARA, A. Sex-related functional asymmetry of the amygdala: preliminary evidence using a case-matched lesion approach. *Neurocase*. 23:1-18, 2009.

TUNNICLIFF, G.; MALATYNSKA, E. Central GABAergic systems and depressive illness. *Neurochem Res*. 28(6):965-76, 2003.

WAFFORD, K.A.; THOMPSON, S.A.; THOMAS, D.; SIKELA, J.; WILCOX, A.S.; WHITING, P.J. Functional characterization of human gamma-aminobutyric acidA receptors containing the alpha 4 subunit. *Mol Pharmacol*. 50(3):670-8, 1996.

WALF, A.A.; SUMIDA, K.; FRYE, C.A. Inhibiting 5alpha-reductase in the amygdala attenuates antianxiety and antidepressive behavior of naturally receptive and hormone-primed ovariectomized rats. *Psychopharmacology (Berl)*. 186(3):302-11, 2006.

WANG, B.; FENG, Y.; SONG, X.; LIU, Q.; NING, Y.; OU, X.; YANG, J.; ZHANG, X.; WEN, F. Involvement of ERK, Bcl-2 family and caspase 3 in recombinant human activin A-induced apoptosis in A549. *Toxicology*. 258(2-3):176-83, 2009.

WANG, Q.; LIU, L.; PEI, L.; JU, W.; AHMADIAN, G.; LU, J.; WANG, Y.; LIU, F.; WANG, Y.T. Control of synaptic strength, a novel function of Akt. *Neuron*. 38(6):915-28, 2003.

WANG, X. The expanding role of mitochondria in apoptosis. *Genes Dev*. 15:2922-33, 2001.

WALLNER, M.; HANCHAR, H.J.; OLSEN, R.W. Ethanol enhances alpha 4 beta 3 delta and alpha 6 beta 3 delta gamma-aminobutyric acid type A receptors at low concentrations known to affect humans. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 100(25):15218-23, 2003.

WEBER, R.F.; CALOGERO, A.E. Prolactin stimulates rat hypothalamic corticotropin-releasing hormone and pituitary adrenocorticotropin secretion in vitro. *Neuroendocrinology*. 54(3):248-53, 1991.

WEISSMAN, M.M.; BLAND, R.C.; CANINO, G.J.; FARAVELLI, C.; GREENWALD, S.; HWU, H.G.; JOYCE, P.R.; KARAM, E.G.; LEE, C.K.; LELLOUCH, J.; LEPINE, J.P.; NEWMAN, S.C.; RUBIO-STIPEC, M.; WELLS, J.E.; WICKRAMARATNE, P.J.; WITTCHEN, H.; YEH, E.K. Cross-national epidemiology of major depression and bipolar disorder. *JAMA*. 276(4):293-9, 1996.

WIEROŃSKA, J.M.; LEGUTKO, B.; DUDYS, D.; PILC, A. Olfactory bulbectomy and amitriptyline treatment influences mGlu receptors expression in the mouse brain hippocampus. *Pharmacol Rep*. 60(6):844-55, 2008.

WISDEN, W.; LAURIE, D.J.; MONYER, H.; SEEBURG, P.H. The distribution of 13 GABAA receptor subunit mRNAs in the rat brain. I. Telencephalon, diencephalon, mesencephalon. *J Neurosci.* 12(3):1040-62, 1992.

WU, J.L.; WU, R.S.; YANG, J.G.; HUANG, C.C.; CHEN, K.B.; FANG, K.H.; TSAI H.D. Effects of sleep deprivation on serum testosterone concentrations in the rat. *Neurosci Lett.* 494(2):124-9, 2011.

XILOURI, M.; AVLONITIS, N.; CALOGEROPOULOU, T.; PAPAZAFIRI, P. Neuroprotective effects of steroid analogues on P19-N neurons. *Neurochem Int.* 50(4):660-70, 2007.

XILOURI, M.; PAPAZAFIRI, P. Anti-apoptotic effects of allopregnanolone on P19 neurons. *Eur J Neurosci.* 23(1):43-54, 2006.

XU, J.; LI, C.; YIN, X.H.; ZHANG, G.Y. Additive neuroprotection of GABA A and GABA B receptor agonists in cerebral ischemic injury via PI-3K/Akt pathway inhibiting the ASK1-JNK cascade. *Neuropharmacology.* 54(7):1029-40, 2008.

YONKERS, K.A.; BRAWMAN-MINTZER, O. The pharmacologic treatment of depression: is gender a critical factor? *J Clin Psychiatry.* 63(7):610-5, 2002.

ZANARDI, R.; ROSSINI, D.; MAGRI, L.; MALAGUTI, A.; COLOMBO, C.; SMERALDI, E. Response to SSRIs and role of the hormonal therapy in post-menopausal depression. *Eur Neuropsychopharmacol.* 17(6-7):400-5, 2007.

ZHOU, W.; KOLDZIC-ZIVANOVIC, N.; CLARKE, C.H.; DE BEUN, R.; WASSERMANN, K.; BURY, P.S.; CUNNINGHAM, K.A.; THOMAS, M.L. Selective

estrogen receptor modulator effects in the rat brain. *Neuroendocrinology*. 75(1):24-33, 2002.

**Effect of progesterone on intracellular signaling pathways in the hypothalamus
and in the olfactory bulb of female rats exposed to the forced swimming test**

Bruno D. Arbo^a, Susie Andrade^a, Gabriela Osterkamp^a, Helena M. T. Barros^b, Maria Flávia M. Ribeiro^a.

^aDepartament of Physiology, ICBS - Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), Sarmiento Leite, 500, Porto Alegre, RS, 90050-170, Brazil

^bDivision of Pharmacology, Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre (UFCSPA), Sarmiento Leite, 245, Porto Alegre, RS, 90050-170, Brazil

Abstract

Depression is a mood disorder with a high prevalence in the population, which is higher in women than in men. Previous studies showed that the chronic administration of low doses of progesterone in diestrus female rats has an antidepressive effect in the forced swimming test (FST). Depression is associated with the neurodegeneration and the cell death of some brain circuits and progesterone is a neuroprotective steroid that could at least partially prevent this neurodegeneration. The aim of this study was to verify the effect of progesterone in the protein expression and activation of Akt, Erk and caspase-3 in the hypothalamus and in the olfactory bulb of diestrus female rats exposed to the forced swimming test (FST). Diestrus female rats (n = 8/group) were randomly selected to receive a daily injection of progesterone (0.4 mg/kg) or vehicle, during two complete female estrous cycles (8-10 days). On the experiment day, the animals were euthanized 30 min after the FST. The treatment decreased the expression of procaspase-3 in the hypothalamus, without changing the activation of Akt and Erk in this structure. Progesterone did not change the activation and the expression of these proteins in the olfactory bulb. There was not significant correlation between the expression of these enzymes and the immobility behavior of these animals in the FST. In summary, our findings indicate that progesterone decrease the expression of procaspase-3 in the hypothalamus of diestrus female rats. This neuroprotective effect could partially explain the antidepressive effect of progesterone in these animals on the FST. The pathways involved in the regulation of the expression of these enzymes remain to be clarified.

Keywords: progesterone, depression, hypothalamus, Akt, caspase-3, forced swimming test.

1. Introduction

Major depression is a psychopathology that has a higher prevalence among women than in men (Gorman, 2006; Rouillon, 2008). This higher prevalence is more evident between the puberty and the end of reproductive age, and the gonadal hormones are at least partially involved with this difference (Steiner et al., 2003; Freeman et al., 2004; Zanardi et al., 2007). Previous studies had shown that the administration of progesterone, at low doses, decreases the immobility behavior of female rats exposed to the forced swimming test (FST), a predictive assay of depressive behavior in rodents (Martínez-Mota et al., 1999; Molina-Hernández and Téllez-Alcántara, 2001; Andrade et al., 2010).

Several brain areas are involved in the physiopathology of depression. The hypothalamus is a structure localized ventrally in the diencephalon and is related to the control of the hypophysis and the neurovegetative system. Some studies had shown that the neurodegeneration of the hypothalamus and its role in the function of the hypothalamus-pituitary-adrenal (HPA) axis are associated to depression and bipolar disorders (Manaye et al., 2005; Raone et al., 2007; Bao et al., 2008). The olfactory bulb is a structure derived from telencephalon that is localized in the anterior portion of the encephalon also related to the physiopathology of depression, once the olfactory bulbectomy is a classical model of depression in rodents (Roche et al., 2007; Wierónska et al., 2008).

Neurodegeneration is usually thought of in the context of deficits in motor or cognitive function. However, it has been suggested that the psychopathologies may also involve functional degeneration of critical central neural systems (Benninghoff et al., 2002; Bethea et al., 2009). Traditionally, depression and mood disorders have been

viewed as neurochemical deficits, but there is increasing evidence that depression is accompanied by marked changes in the size or number of neurons and glia in different brain regions (Manji and Duman et al., 2001; Campbell and MacQueen, 2006). Stressful events are related to atrophy and increased apoptosis in hippocampus, and antidepressant treatment could reverse this increased apoptosis (Fuchs et al., 2004).

A large body of literature indicates that the ovarian hormones are neuroprotective (Simpkins et al., 2005; Singh et al., 2008). Progesterone increases the activity of some signaling pathways involved with pro-survival stimuli in different brain areas, promoting the phosphorylation of Akt and the phosphorylation of extracellular-signal regulated kinase (Erk), components of the phosphoinositide-3 kinase (PI3K) and mitogen-activated protein kinase (MAPK) pathways (Kaur et al., 2007; Guerra-Araiza et al., 2009). Moreover, progesterone may reduce the activity of caspase-3, which is considered the central and final apoptotic effector caspase responsible for much of biological apoptosis, in serotonin neurons located in the dorsal raphe of macaques (Tokuyama et al., 2008). However, these neuroprotective effects of progesterone and its connection with depression are not fully understood, since they could be species and dose-dependent and may modulate neuron survival just in some specific brain areas. Therefore, the aim of this study was to evaluate the effect of progesterone in the activation and in the expression of enzymes Akt, Erk and Caspase-3 in the hypothalamus and in the olfactory bulb and its correlation with the immobility behavior of female rats exposed to the FST.

2. Experimental Procedure

2.1. Animals

Female adult Wistar rats (250-300 g), born and reared in the animal facility of Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre (UFCSPA), Brazil, were housed in polypropylene cages (40x33x17cm), four per cage, under standard environmental conditions, such as a room temperature of $22 \pm 2^\circ\text{C}$ and 12-hour light-dark cycle (7 a.m. to 7 p.m.). All rats had free access to food and water. Our experimental protocol was carried out in accordance with the National Institute of Health Guide for the Care and Use of Laboratory Animals and in accordance with the Brazilian Law for the Scientific Use of Animals, after its approval by the Ethical Committee for Animal Experimentation at UFCSPA and by the Ethical Commission in the Use of Animals at UFRGS (CEUA/UFRGS). All efforts were made to minimize animal suffering and to use only the number of animals necessary to produce reliable scientific data.

2.2. Drugs and experimental procedures

Progesterone (4-Pregnene-3,20-dione, Sigma, St. Louis, MO, USA) was dispersed in 0.1% Tween 80 and dissolved in saline. Female rats ($n = 8/\text{group}$) were randomly selected to receive a daily administration of 0.4 mg/kg of progesterone or vehicle, via intraperitoneal, for 8 to 10 days, during two complete female estrous cycles. This dose was chosen because it changes depressive-like behavior and does not alter the estrous cycle in female rats (Andrade et al., 2010). To determine the estrous cycle of the female rats, vaginal smears were performed throughout the treatment period by a trained researcher. Only female rats that had two regular 4-5 day cycles and were in the diestrus phase on the day of the experiment were included in this study (Andrade et al., 2007). This phase of the estrous cycle was chosen because it presents a hormonal

correlation with the premenstrual phase in women, which in turn may be related to a higher risk for depression (Amin et al., 2006; Kornstein, 2010), and because this phase was the most responsive to the progesterone treatment in a previous study performed by our group (Andrade et al., 2010). On the experiment day, the animals were exposed to the FST. This behavioral test for screening of antidepressant drugs was proposed by Porsolt et al., (1978) and described in details by Andrade et al., (2010). In this test the rats are forced to swim in an inescapable pool (22x22x35cm) filled with 27 cm of cool water (25 °C). All behaviors were recorded and data has been previously published (Andrade et al., 2010). In our experimental protocol, rats were euthanized by decapitation thirty minutes after the end of the FST. The hypothalamus and both right and left olfactory bulb were quickly removed, frozen in liquid nitrogen, and then kept in a freezer (-80° C) for posterior analysis of the effect of progesterone treatment on the protein expression of enzymes p-Akt, Akt, p-Erk, Erk and caspase-3 by Western Blotting.

2.3 Western Blotting

All the samples were homogenized with lysis buffer, pH = 7.4, as previous described by Janner et al., (2010). The protein levels were measured by the method of Bradford (1976). Electrophoresis and protein transference were performed as described elsewhere (Jacob et al., 2008; Laemmli et al., 1970). The nitrocellulose membranes were processed for immunodetection using rabbit polyclonal antibodies for p-Akt (Ser 473) (60Kda) (1:500 dilution), Akt (60Kda) (isoform Akt 1) (1:500), p-Erk (Tyr 177) (42-44Kda) (1:750), Erk (42-44Kda) (isoforms 1 and 2) (1:1000) and a mouse monoclonal antibody for Caspase-3 (procaspase-3 - 38Kda; cleaved caspase-3 – 17Kda) (1:250) (Santa Cruz Biotechnology). The bound primary antibodies were detected using

sheep anti-rabbit and goat anti-mouse peroxidase-conjugate secondary antibodies (1:10000) (Millipore) and membranes were revealed for chemiluminescence. The autoradiographies generated were quantitatively analyzed for the protein levels with the image software ImageJ. The molecular weights of the bands were determined by reference to a standard molecular weight marker (Full-Range Rainbow, GE Healthcare Life Sciences, São Paulo, Brazil). The results from each membrane were normalized to β -tubulin or GAPDH where indicated. To minimize interassay variations, samples from all experimental groups were processed in parallel. Protein expression values were expressed as arbitrary densitometric units.

2.4. Statistical Analysis

Student's T-test was performed to compare the data obtained in the hypothalamus samples (control vs. treated group). We performed a two-way analysis of variance (two-way ANOVA) to evaluate the protein expression in the right and in the left olfactory bulb considering treatment and hemisphere as factors. When appropriate, ANOVA was followed by the Student-Newman-Keuls (SNK) post hoc test. We performed a Pearson test to correlate the protein expressions and immobility behaviors observed in the FST. All results were expressed as mean \pm standard error. In all tests, the level of statistical significance was $P < 0.05$.

3. Results

The treatment with progesterone increased the expression of the ratio p-Akt/Akt in the hypothalamus of diestrus females vs. the control group ($t = 4.446$, $P < 0.001$) (Figure 1) through a reduction in the expression of Akt ($t = 2.795$, $P = 0,016$) (Figure 2B), without

changing the expression of p-Akt (Figure 2A). We did not observe any difference in the expression and in the activation of Akt in the olfactory bulb of these animals (Figures 3 and 4).

The effect of progesterone in the expression of the enzyme Erk is reported in Figures 5-8. The treatment with progesterone did not change the expression of the ratio p-Erk/Erk in the hypothalamus and in the right and left olfactory bulb of diestrus females exposed to the FST.

The treatment with progesterone decreased the expression of procaspase-3 (38Kda) in the hypothalamus of diestrus females ($t= 2.502$, $P= 0.046$) (Figure 9A), but did not alter the expression of this enzyme in the olfactory bulb of this animals (Figure 9B). The active cleaved caspase-3 has a molecular weight of 17Kda, but we saw no detectable levels of this enzyme in any of our groups.

We did not find any correlation between the expression of these proteins and the immobility of the females in the FST.

4. Discussion

A previous work of our group showed that the chronic administration of progesterone at low doses had an antidepressant effect in diestrus female rats exposed to the FST (Andrade et al., 2010). Based on the fact that there is increasing evidence associating depression with the neurodegeneration of some brain circuits (Manji and Duman et al., 2001; Benninghoff et al., 2002; Fuchs et al., 2004, Bethea et al., 2009) this study was designed to verify the effect of progesterone in the activation and in the expression of three enzymes that play a key role in the cell survival and cell death

intracellular signaling pathways - Akt, Erk and Caspase-3 – and its possible relation with the depressive-like behavior observed in the FST.

The treatment with progesterone decreased the expression of procaspase-3 in the hypothalamus of female rats exposed to the FST. Procaspase-3 is cleaved by active caspase-9, becoming active and cleaving and activating many substrates that commit the cell to death (Wang, 2001). Caspase-3 is considered the central and final apoptotic effector caspase responsible for much of biological apoptosis (Bethea et al., 2009). As others (Tokuyama et al., 2008), we did not detect any levels of active caspase-3 in our blots, but the decrease in the expression of procaspase-3 could indicate a neuroprotective effect of progesterone in the hypothalamus of these diestrus females, once that procaspase-3 is the direct precursor of cleaved active caspase-3, and that increasing caspase-3 indicates increased apoptosis (Kubera et al., 2011).

Akt is a serine/threonine kinase of the PI3K pathway that is an important mediator of cell survival (Bryant et al., 2006). When activated, this enzyme stimulates pro-survival and inactivates pro-apoptotic substrates, such as Bad and caspase-9, inhibiting the apoptosis and contributing to the cell survival (Cardone et al., 1998, Kim et al., 2007; Nair and Olanow, 2008). In the present study, the treatment with progesterone increased the expression of the ratio p-Akt/Akt in the hypothalamus of diestrus females. However, this increase did not seem to be associated with an increase in the activation of the PI3K/Akt pathway, once that it happened through a decrease in the expression of Akt, and not by a change in the expression of p-Akt, the active form of this enzyme. Other authors have shown that the administration of progesterone increases the activity of Akt in the hypothalamus of female rats (Guerra-Araiza et al., 2009), but in this study the rats were ovariectomized and received a single injection of a higher dose of progesterone, while we administered progesterone chronically at a lower dose in diestrus female rats. Some

papers have shown that the activity of Akt is inversely correlated with the activity of caspase-3 (Tang et al., 2009; Hu et al., 2011), but it is important to note that these other studies worked with models of cell culture and that our study was realized *in vivo*. The organism of an animal has much more complex molecular interactions than a controlled *in vitro* environment. This fact might be at least partially involved with the differences between these results and ours, and the biological meaning of this finding remains to be clarified.

Erk is a kinase of MAPK pathway that is preferentially activated by mitogenic stimuli such as growth factors, cytokines and phorbol esters, playing a major role in the regulation of cell growth, survival and differentiation (Fan et al., 2007). Guerra-Araiza et al., (2009) showed that a single injection of progesterone increased the activation of Erk in the hypothalamus, in the hippocampus and in the cerebellum of ovariectomized female rats. Also, it has already been show that some antidepressants target the MAPK pathway and promote neurogenesis and neuronal process growth (Hunsberger et al., 2009), and that the acute blockade of this pathway produces depressive-like behaviors and counteracts the behavioral effects of antidepressants (Duman et al., 2007). In our study, the progesterone treatment did not change the activation of Erk in the hypothalamus and in the olfactory bulb of diestrus female rats. However, as already cited, the differences between our protocol and others (Guerra-Araiza et al., 2009) could be involved in the absence of effect of the treatment in the expression of this enzyme.

Despite extensive research, the current theories on dysfunctions in some neurotransmitter systems do not provide sufficient explanations for the nature of depression. Rational treatments aimed at causal factors of depression are not available yet. Recently, the inflammatory and neurodegenerative hypothesis of depression was formulated, with basis on the neurodegeneration and on the reduced neurogenesis in some

brain areas that characterize some cases of depression (Maes et al., 2009). Some studies had shown that the neurodegeneration of the hypothalamus are associated to depression and bipolar disorders (Manaye et al., 2005; Bao et al., 2008), and that progesterone has neuroprotective effects in this area (Guerra-Araiza et al., 2009). Here, we demonstrated that progesterone decreased the expression of procaspase-3, indicating a possible neuroprotective effect of this steroid in the hypothalamus of diestrus female rats exposed to the FST. This effect could be involved in the antidepressant effect of the progesterone in the FST, despite the absence of correlation between the expression of this enzyme and the immobility behavior. However, progesterone did not change the expression of Akt, Erk and procaspase-3 in the olfactory bulb of these animals. Guerra-Araiza et al., (2009) had already verified that the metabolites of progesterone exert a stronger regulation of the PI3K and MAPK pathways in the hypothalamus than in the hippocampus and cerebellum of female rats. Regional differences in the expression of membrane progesterone receptors (Krebs et al., 2000; Guennoun et al., 2008) and in the expression of the enzymes involved in the conversion of progesterone into some of its metabolites such as allopregnanolone (Garcia-Segura and Melcangi, 2006), that could mediate part of the neuroprotective effects of progesterone, may explain the different effect of progesterone in the expression of procaspase-3 and Akt in the hypothalamus and in the olfactory bulb of these diestrus female rats.

In summary, our findings indicate that progesterone decrease the expression of procaspase-3 in the hypothalamus of diestrus female rats. This neuroprotective effect could partially explain the antidepressive effect of progesterone in these animals on the FST. The pathways involved in the regulation of the expression of these enzymes remain to be clarified.

References

- [1] Z. Amin, G.F. Mason, I. Cavus, J.H. Krystal, D.L. Rothman, C.N. Epperson, The interaction of neuroactive steroids and GABA in the development of neuropsychiatric disorders in women, *Pharmacol. Biochem. Behav.* 84 (2006) 635-43.
- [2] S. Andrade, S.L. Silveira, B.D. Arbo, B.A. Batista, R. Gomez, H.M. Barros, M.F. Ribeiro, Sex-dependent antidepressant effects of lower doses of progesterone in rats, *Physiol. Behav.* 99 (2010) 687-690.
- [3] S. Andrade, S.L. Silveira, R. Gomez, H.M. Barros, M.F. Ribeiro, Gender differences of acute and chronic administration of dehydroepiandrosterone in rats submitted to the forced swimming test, *Prog. Neuropsychopharmacol. Biol. Psychiatry* 31 (2007) 613-621.
- [4] A.M. Bao, G. Meynen, D.F. Swaab, The stress system in depression and neurodegeneration: focus on the human hypothalamus, *Brain Res. Rev.* 57 (2008) 531-553.
- [5] J. Benninghoff, A. Schmitt, R. Mössner, K.P. Lesch, When cells become depressed: focus on neural stem cells in novel treatment strategies against depression, *J. Neural. Transm.* 109 (2002) 947-962.
- [6] C.L. Bethea, A.P. Reddy, Y. Tokuyama, J.A. Henderson, F.B. Lima, Protective actions of ovarian hormones in the serotonin system of macaques, *Front. Neuroendocrinol.* 30 (2009) 212-238.

- [7] M.M. Bradford, A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding, *Anal. Biochem.* 72 (1976) 248–254.
- [8] D.N. Bryant, L.C. Sheldahl, L.K. Marriott, R.A. Shapiro, D.M. Dorsa, Multiple pathways transmit neuroprotective effects of gonadal steroids, *Endocrine* 29 (2006) 199-207.
- [9] S. Campbell, G. Macqueen, An update on regional brain volume differences associated with mood disorders, *Curr. Opin. Psychiatry* 19 (2006) 25-33.
- [10] M.H. Cardone, N. Roy, H.R. Stennicke, G.S. Salvesen, T.F. Franke, E. Stanbridge, S. Frisch, J.C. Reed, Regulation of cell death protease caspase-9 by phosphorylation, *Science* 282 (1998) 1318-1321.
- [11] C.H. Duman, L. Schlesinger, M. Kodama, D.S. Russell, R.S. Duman, A role for MAP kinase signaling in behavioral models of depression and antidepressant treatment, *Biol. Psychiatry* 61 (2007) 661-670.
- [12] Y. Fan, H. Chen, B. Qiao, L. Luo, H. Ma, H. Li, J. Jiang, D. Niu, Z. Yin, Opposing effects of ERK and p38 MAP kinases on HeLa cell apoptosis induced by dipyrithione, *Mol. Cells.* 23 (2007) 30-38.
- [13] E.W. Freeman, M.D. Sammel, L. Liu, C.R. Gracia, D.B. Nelson, L. Hollander, Hormones and menopausal status as predictors of depression in women in transition to menopause, *Arch. Gen. Psychiatry* 61 (2004) 62-70.

- [14] E. Fuchs, B. Czéh, M.H. Kole, T. Michaelis, P.J. Lucassen. Alterations of neuroplasticity in depression: the hippocampus and beyond. *Eur. Neuropsychopharmacol.* 14 (Suppl 5) (2004) S481-S490.
- [15] L.M. Garcia-Segura, R.C. Melcangi, Steroids and glial cell function, *Glia* 54 (2006) 485-498.
- [15] J.M. Gorman, Gender differences in depression and response to psychotropic medication, *Gend. Med.* 3 (2006) 93-109.
- [16] R. Guennoun, D. Meffre, F. Labombarda, S.L. Gonzalez, M.C. Deniselle, D.G. Stein, A.F. De Nicola, M. Schumacher, The membrane-associated progesterone-binding protein 25-Dx: expression, cellular localization and up-regulation after brain and spinal cord injuries, *Brain Res. Rev.* 57 (2008) 493-505.
- [17] C. Guerra-Araiza, M.A. Amorim, R. Pinto-Almazán, A. González-Arenas, M.G. Campos, L.M. Garcia-Segura, Regulation of the phosphoinositide-3 kinase and mitogen-activated protein kinase signaling pathways by progesterone and its reduced metabolites in the rat brain, *J. Neurosci. Res.* 87 (2009) 470-481.
- [18] J. Hunsberger, D.R. Austin, I.D. Henter, G. Chen, The neurotrophic and neuroprotective effects of psychotropic agents, *Dialogues Clin. Neurosci.* 11 (2009) 333-348.
- [19] W. Hu, T. Shen, M.H. Wang. Cell cycle arrest and apoptosis induced by methyl 3,5-dicaffeoyl quinate in human colon cancer cells: Involvement of the PI3K/Akt and MAP kinase pathways, *Chem. Biol. Interact.* 194 (2011) 48-57.

- [20] M.H.V.M. Jacob, D.R. Janner, A. Bello-Klein, S.F. Llesuy, M.F.M. Ribeiro, Dehydroepiandrosterone modulates antioxidant enzymes and Akt signaling in healthy Wistar rat hearts, *J. Steroid. Biochem. Mol. Biol.* 112 (2008) 138–144.
- [21] D. da R. Janner, M.H. Jacob, M.P. Jahn, L.C. Kucharski, M.F. Ribeiro, Dehydroepiandrosterone effects on Akt signaling modulation in central nervous system of young and aged healthy rats, *J. Steroid. Biochem. Mol. Biol.* 122 (2010) 142-148.
- [22] P. Kaur, P.K. Jodhka, W.A. Underwood, C.A. Bowles, N.C. de Fiebre, C.M. de Fiebre, M. Singh, Progesterone increases brain-derived neurotrophic factor expression and protects against glutamate toxicity in a mitogen-activated protein kinase- and phosphoinositide-3 kinase-dependent manner in cerebral cortical explants, *J. Neurosci. Res.* 85 (2007) 2441-2449.
- [23] N.H. Kim, K. Kim, W.S. Park, H.S. Son, Y. Bae, PKB/Akt inhibits ceramide-induced apoptosis in neuroblastoma cells by blocking apoptosis-inducing factor (AIF) translocation, *J. Cell. Biochem.* 102 (2007) 1160-1170.
- [24] S.G. Kornstein, Gender issues and DSM-V. *Arch. Women. Ment. Health.* 13 (2010) 11-13.
- [25] C.J. Krebs, E.D. Jarvis, J. Chan, J.P. Lydon, S. Ogawa, D.W. Pfaff, A membrane-associated progesterone-binding protein, 25-Dx, is regulated by progesterone in brain regions involved in female reproductive behaviors, *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* 97 (2000) 12816-12821.

- [26] M. Kubera, E. Obuchowicz, L. Goehler, J. Brzeszcz, M. Maes, In animal models, psychosocial stress-induced (neuro)inflammation, apoptosis and reduced neurogenesis are associated to the onset of depression, *Prog. Neuropsychopharmacol. Biol. Psychiatry* 35 (2011) 744-759.
- [27] U.K. Laemmli, Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4, *Nature* 227 (1970) 680–685.
- [28] M. Maes, R. Yirmiya, J. Norberg, S. Brene, J. Hibbeln, G. Perini, M. Kubera, P. Bob, B. Lerer, M. Maj, The inflammatory & neurodegenerative (I&ND) hypothesis of depression: leads for future research and new drug developments in depression, *Metab. Brain Dis.* 24 (2009) 27-53.
- [29] K.F. Manaye, D.L. Lei, Y. Tizabi, M.I. Dávila-García, P.R. Mouton, P.H. Kelly, Selective neuron loss in the paraventricular nucleus of hypothalamus in patients suffering from major depression and bipolar disorder, *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* 64 (2005) 224-229.
- [30] H.K. Manji, R.S. Duman, Impairments of neuroplasticity and cellular resilience in severe mood disorders: implications for the development of novel therapeutics, *Psychopharmacol. Bull.* 35 (2001) 5-49.
- [31] L. Martínez-Mota, C.M. Contreras, M. Saavedra, Progesterone reduces immobility in rats forced to swim, *Arch. Med. Res.* 30 (1999) 286-289.
- [32] M. Molina-Hernández, N.P. Téllez-Alcántara, Antidepressant-like actions of pregnancy, and progesterone in Wistar rats forced to swim, *Psychoneuroendocrinology* 26 (2001) 479-491.

- [33] V.D. Nair, C.W. Olanow, Differential modulation of Akt/glycogen synthase kinase-3beta pathway regulates apoptotic and cytoprotective signaling responses, *J. Biol. Chem.* 283 (2008) 15469-15478.
- [34] R.D. Porsolt, G. Anton, N. Blavet, M. Jalfre, Behavioural despair in rats: a new model sensitive to antidepressant treatments, *Eur. J. Pharmacol.* 47 (1978) 379-391.
- [35] A. Raone, A. Cassanelli, S. Scheggi, R. Rauggi, B. Danielli, M.G. De Montis, Hypothalamus-pituitary-adrenal modifications consequent to chronic stress exposure in an experimental model of depression in rats, *Neuroscience* 146 (2007) 1734-1742.
- [36] M. Roche, A. Harkin, J.P. Kelly, Chronic fluoxetine treatment attenuates stressor-induced changes in temperature, heart rate, and neuronal activation in the olfactory bulbectomized rat, *Neuropsychopharmacology* 32 (2007) 1312-1320.
- [37] F. Rouillon, Epidemiology of mood disorders, *Rev. Prat.* 58 (2008) 361-365.
- [38] J.W. Simpkins, S.H. Yang, Y. Wen, M. Singh, Estrogens, progestins, menopause and neurodegeneration: basic and clinical studies, *Cell. Mol. Life. Sci.* 62 (2005) 271-280.
- [39] M. Singh, N. Sumien, C. Kyser, J.W. Simpkins, Estrogens and progesterone as neuroprotectants: what animal models teach us, *Front. Biosci.* 13 (2008) 1083-1089.
- [40] M. Steiner, E. Dunn, L. Born, Hormones and mood: from menarche to menopause and beyond, *J. Affect. Disord.* 74 (2003) 67-83.

- [41] C. Tang, Y.H. Lu, J.H. Xie, F. Wang, J.N. Zou, J.S. Yang, Y.Y. Xing, T. Xi, Downregulation of survivin and activation of caspase-3 through the PI3K/Akt pathway in ursolic acid-induced HepG2 cell apoptosis, *Anticancer Drugs* 20 (2009) 249-258.
- [42] Y. Tokuyama, A.P. Reddy, C.L. Bethea, Neuroprotective actions of ovarian hormones without insult in the raphe region of rhesus macaques, *Neuroscience* 154 (2008) 720-731.
- [43] X. Wang, The expanding role of mitochondria in apoptosis, *Genes Dev.* 15 (2001) 2922-2933.
- [44] J.M. Wierónska, B. Legutko, D. Dudys, A. Pilc, Olfactory bulbectomy and amitriptyline treatment influences mGlu receptors expression in the mouse brain hippocampus, *Pharmacol. Rep.* 60 (2008) 844-855.
- [45] R. Zanardi, D. Rossini, L. Magri, A. Malaguti, C. Colombo, E. Smeraldi, Response to SSRIs and role of the hormonal therapy in post-menopausal depression, *Eur. Neuropsychopharmacol.* 17 (2007) 400-405.

Legend of figures:

Figure 1. Effect of progesterone (0.4 mg/kg, i.p.) on the expression of the ratio p-Akt/Akt (densitometric arbitrary units) in the hypothalamus of diestrus female Wistar rats exposed to the FST. n = 7/group. Results expressed as mean \pm standard error (one representative gel of Western Blotting experiments showing two bands for each experiment group). *Different from vehicle. P < 0.001 (Student's T-test).

Figure 2. Effect of progesterone (0.4 mg/kg, i.p.) on the expression p-Akt (A) and Akt (B) (densitometric arbitrary units) in the hypothalamus of diestrus female Wistar rats exposed to the FST. n = 7/group. Results expressed as mean \pm standard error (one representative gel of Western Blotting experiments showing two bands for each experiment group). *Different from vehicle. P = 0.016 (Student's T-test).

Figure 3. Effect of progesterone (0.4 mg/kg, i.p.) on the expression of the ratio p-Akt/Akt (densitometric arbitrary units) in the olfactory bulb of diestrus female Wistar rats exposed to the FST. n = 4-5/group. Results expressed as mean \pm standard error (one representative gel of Western Blotting experiments showing two bands for each experiment group).

Figure 4. Effect of progesterone (0.4 mg/kg, i.p.) on the expression p-Akt (A) and Akt (B) (densitometric arbitrary units) in the olfactory bulb of diestrus female Wistar rats exposed to the FST. n = 4-5/group. Results expressed as mean \pm standard error (one representative gel of Western Blotting experiments showing two bands for each experiment group).

Figure 5. Effect of progesterone (0.4 mg/kg, i.p.) on the expression p-Erk/Erk (densitometric arbitrary units) in the hypothalamus of diestrus female Wistar rats exposed to the FST. n = 4/group. Results expressed as mean \pm standard error (one representative gel of Western Blotting experiments showing two bands for each experiment group).

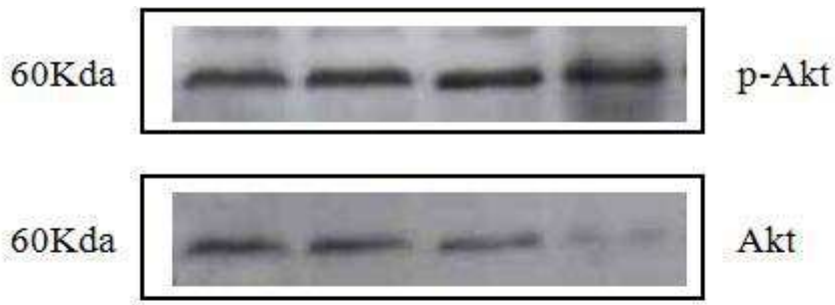
Figure 6. Effect of progesterone (0.4 mg/kg, i.p.) on the expression p-Erk (A) and Erk (B) (densitometric arbitrary units) in the hypothalamus of diestrus female Wistar rats exposed to the FST. n = 4/group. Results expressed as mean \pm standard error (one representative gel of Western Blotting experiments showing two bands for each experiment group).

Figure 7. Effect of progesterone (0.4 mg/kg, i.p.) on the expression p-Erk/Erk (densitometric arbitrary units) in the olfactory bulb of diestrus female Wistar rats exposed to the FST. n = 3-5/group. Results expressed as mean \pm standard error (one representative gel of Western Blotting experiments showing two bands for each experiment group).

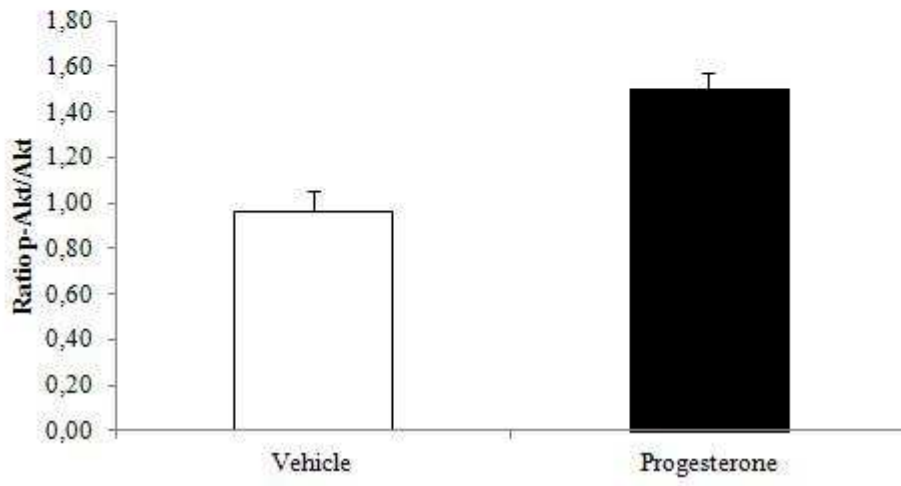
Figure 8. Effect of progesterone (0.4 mg/kg, i.p.) on the expression p-Erk (A) and Erk (B) (densitometric arbitrary units) in the olfactory bulb of diestrus female Wistar rats exposed to the FST. n = 3-5/group. Results expressed as mean \pm standard error (one representative gel of Western Blotting experiments showing two bands for each experiment group).

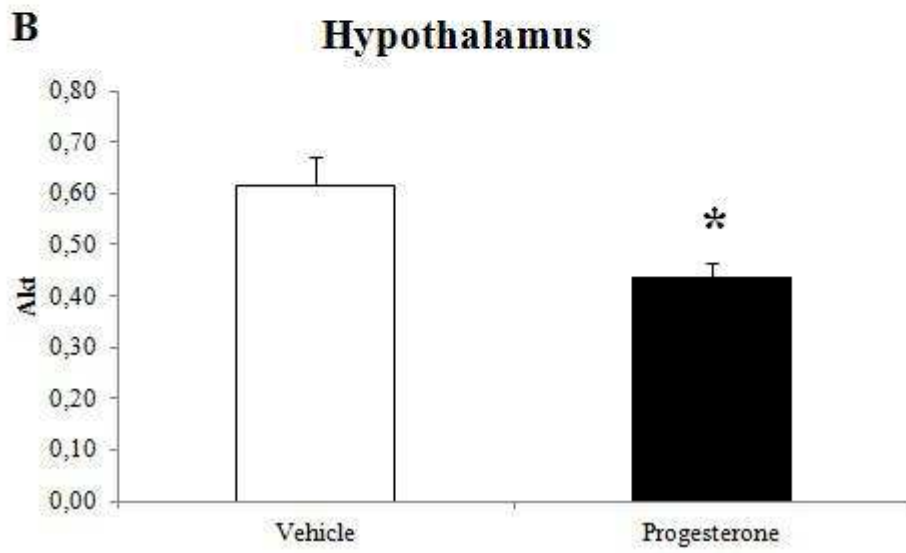
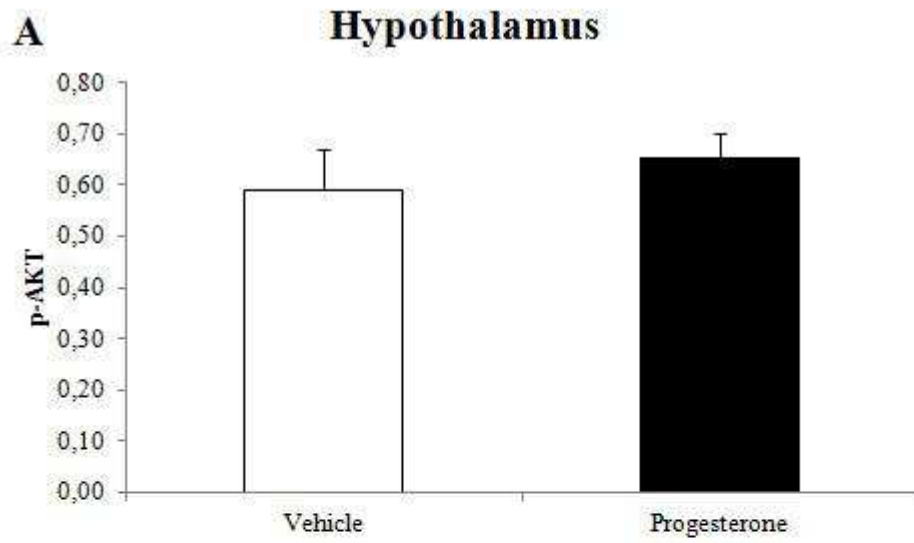
Figure 9. Effect of progesterone treatment (0.4 mg/kg, i.p.) on the expression of the procaspase-3 in the hypothalamus (A) and in the olfactory bulb (B) (densitometric

arbitrary units) of diestrus female Wistar rats exposed to the FST. n = 3-4/group. Results expressed as mean \pm standard error (one representative gel of Western Blotting experiments showing two bands for each experiment group). *Different from vehicle. P < 0.05 (Student's T-test).



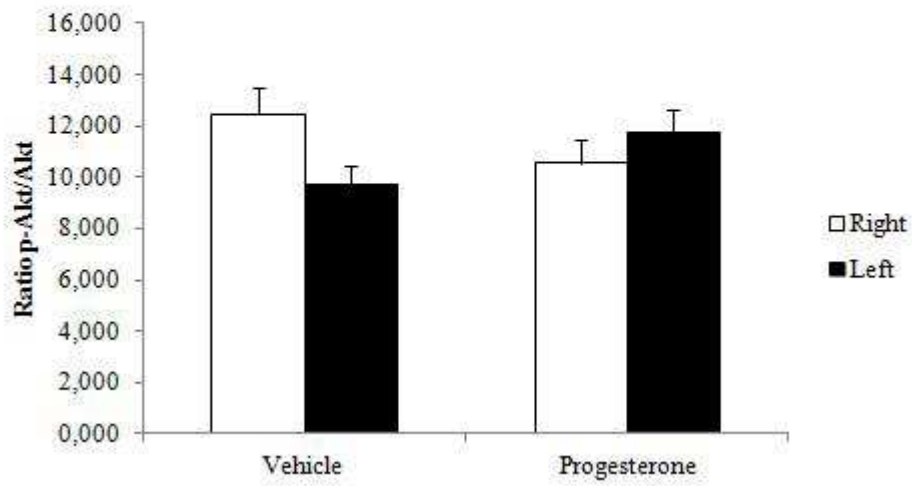
Hypothalamus

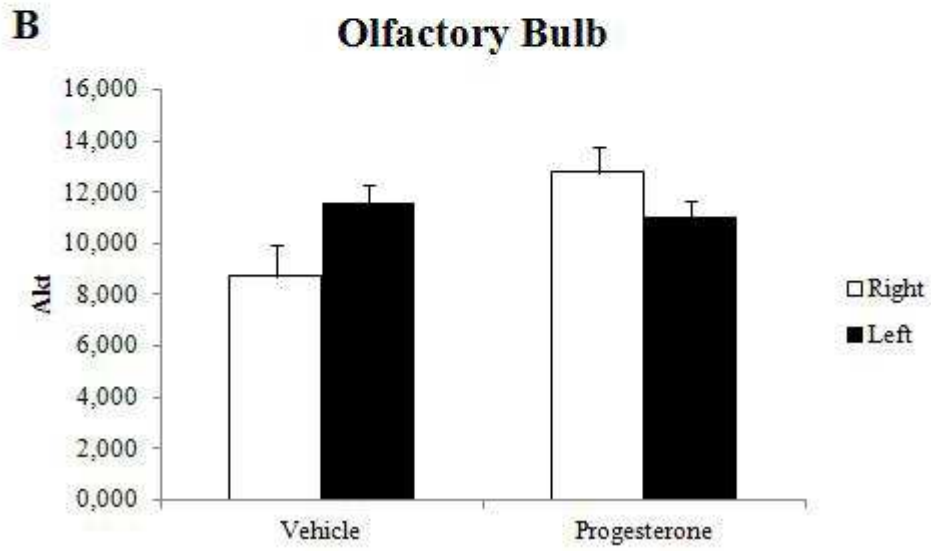
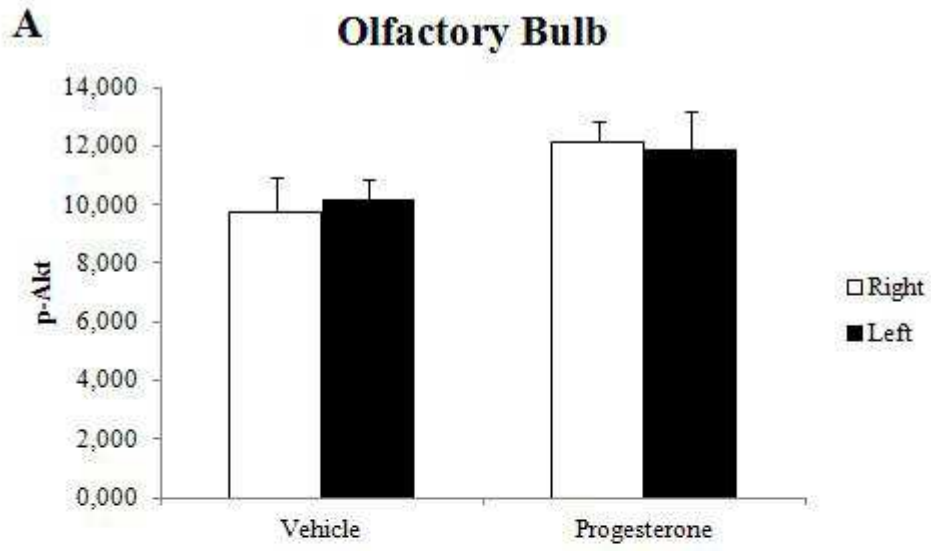


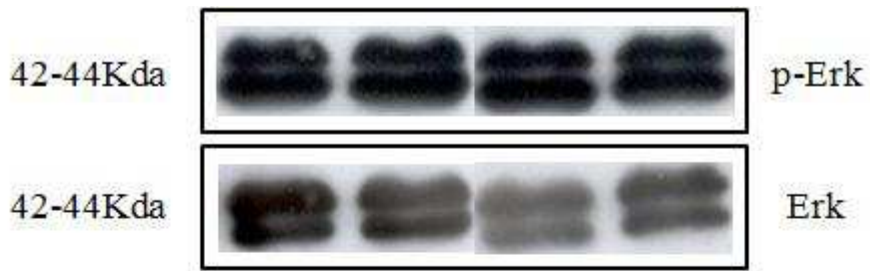




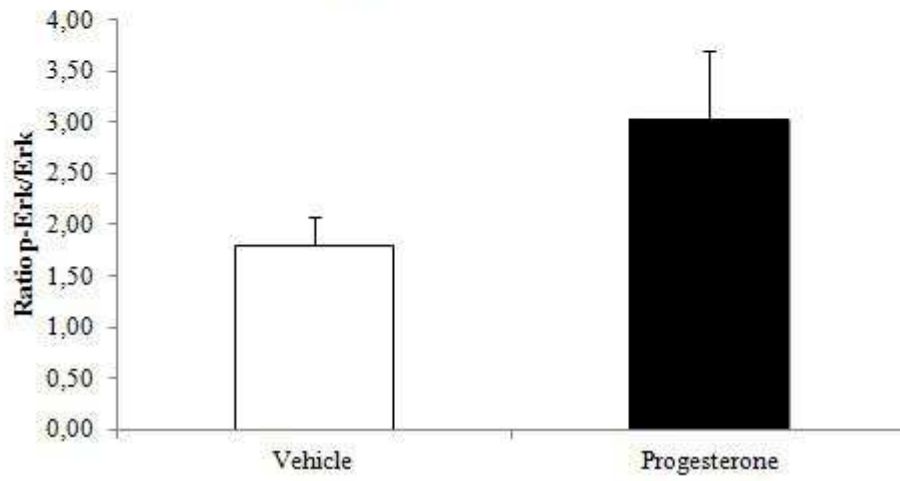
Olfactory Bulb

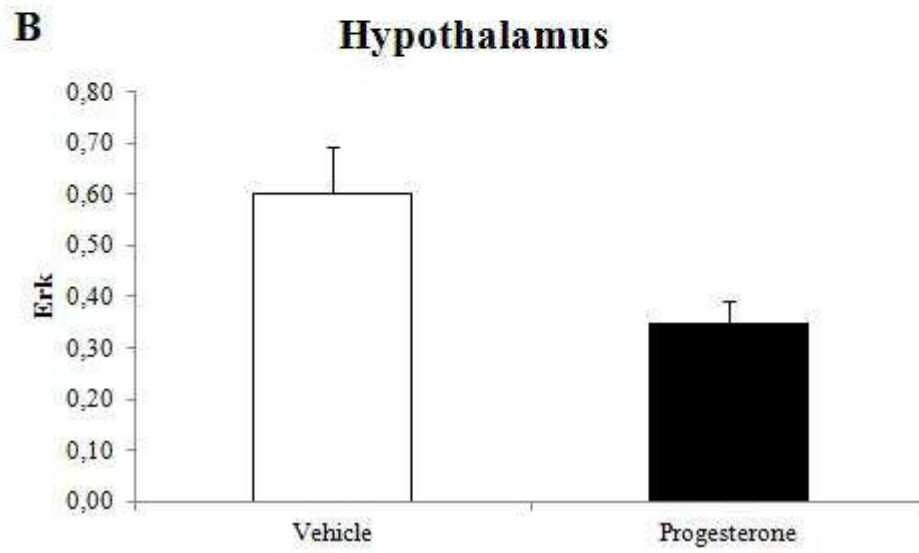
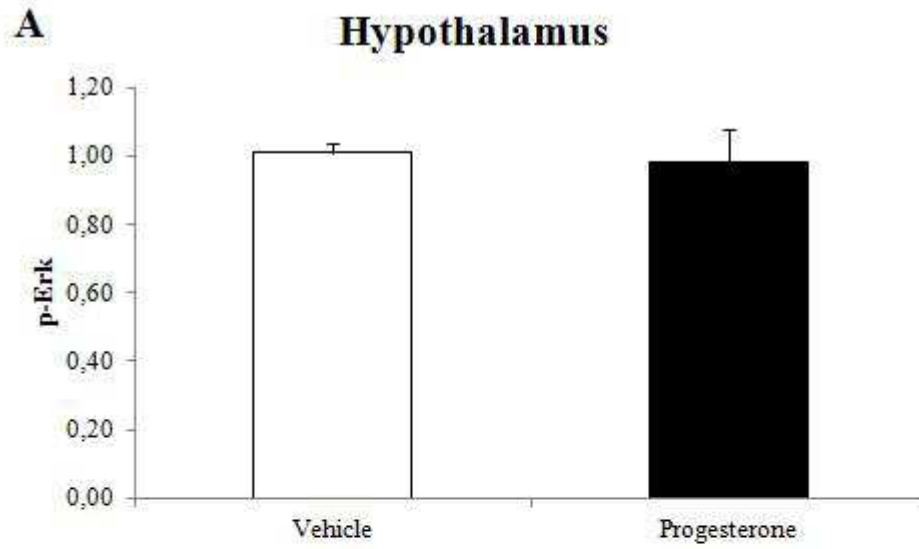


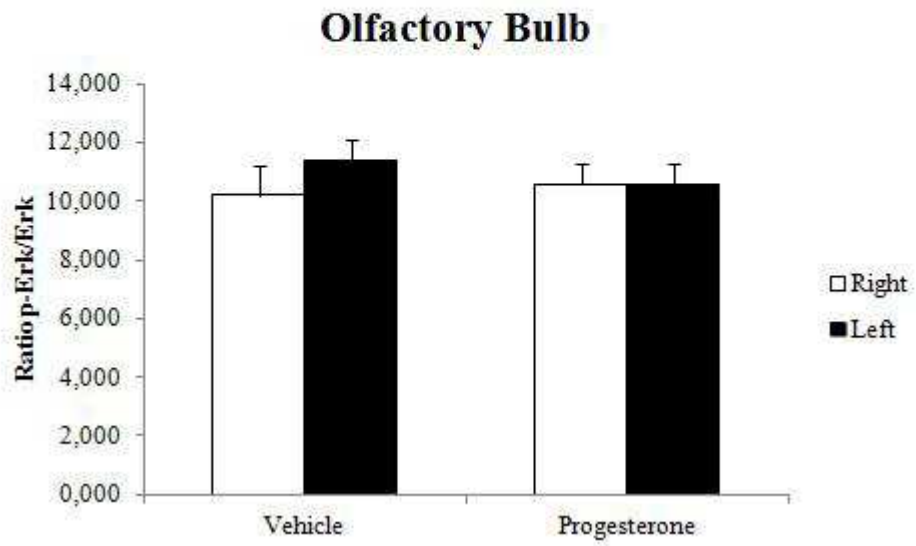
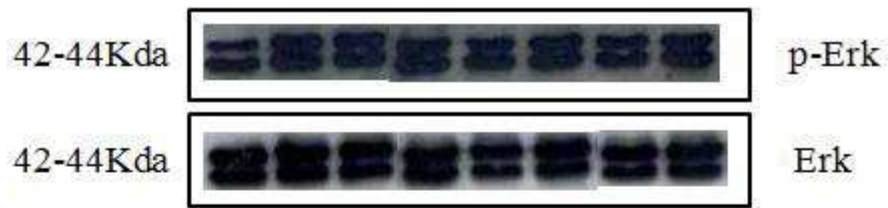


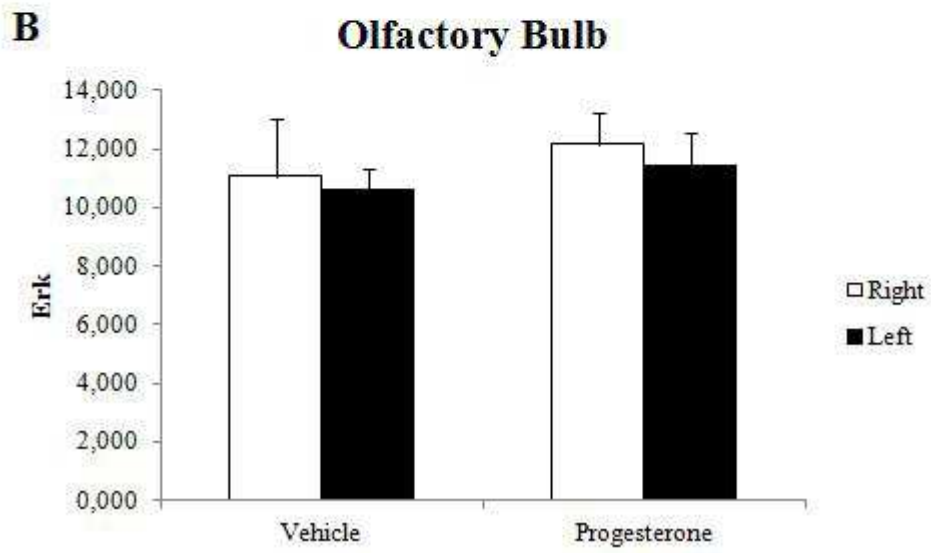
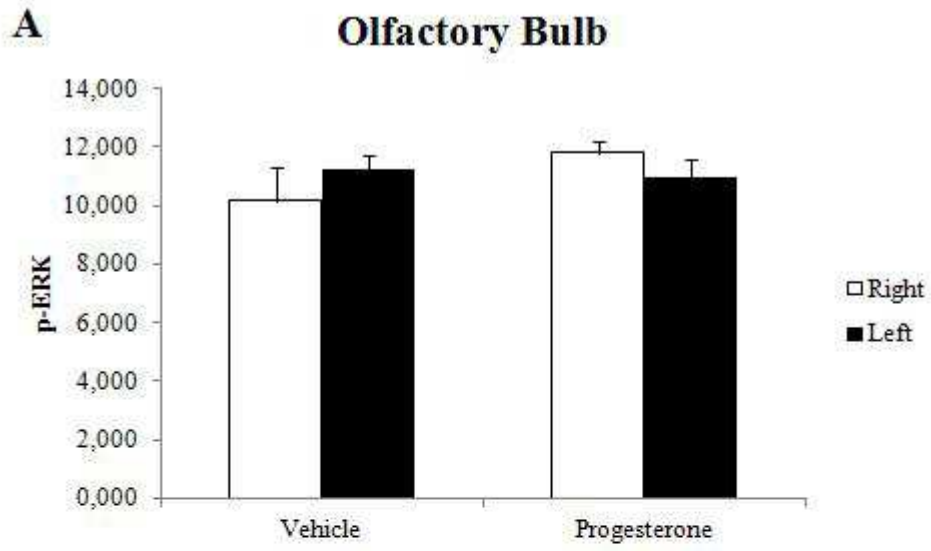


Hypothalamus



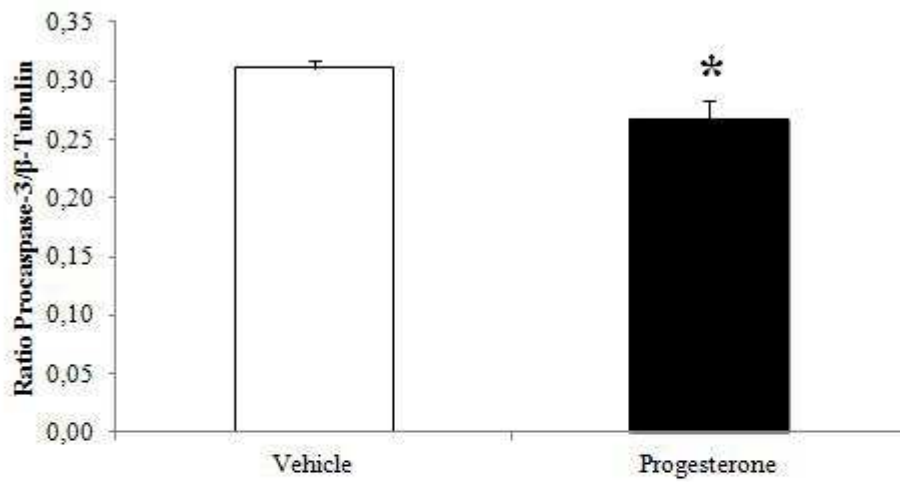








A Hypothalamus



B Olfactory Bulb

