



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

Bruna Caroline Pierone

**AVALIAÇÃO DE ASPECTOS EMOCIONAIS E MECANISMOS DE AUTOFAGIA
EM CAMUNDONGOS FÊMEAS SUBMETIDAS A UM MODELO DE ESTRESSE
PSICOSSOCIAL**

Florianópolis
2024

Bruna Caroline Pierone

**AVALIAÇÃO DE ASPECTOS EMOCIONAIS E MECANISMOS DE AUTOFAGIA
EM CAMUNDONGOS FÊMEAS SUBMETIDAS A UM MODELO DE ESTRESSE
PSICOSSOCIAL**

Tese submetida ao Programa de Pós-Graduação
em Bioquímica da Universidade Federal de Santa
Catarina para a obtenção do Título de Doutora em
Bioquímica.

Orientadora: Prof^ª. Dr^ª. Manuella Pinto Kaster

Florianópolis

2024

Pierone, Bruna Caroline

AVALIAÇÃO DE ASPECTOS EMOCIONAIS E MECANISMOS DE
AUTOFAGIA EM CAMUNDONGOS FÊMEAS SUBMETIDAS A UM MODELO DE
ESTRESSE PSICOSSOCIAL / Bruna Caroline Pierone ;
orientadora, Manuella Pinto Kaster, 2024.

100 p.

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Santa
Catarina, Centro de Ciências Biológicas, Programa de Pós-
Graduação em Bioquímica, Florianópolis, 2024.

Inclui referências.

1. Bioquímica. 2. Neuroquímica. 3. Neurociências. 4.
Estresse. I. Kaster, Manuella Pinto. II. Universidade
Federal de Santa Catarina. Programa de Pós-Graduação em
Bioquímica. III. Título.

Bruna Caroline Pierone

**AVALIAÇÃO DE ASPECTOS EMOCIONAIS E MECANISMOS DE AUTOFAGIA EM
CAMUNDONGOS FÊMEAS SUBMETIDAS A UM MODELO DE ESTRESSE
PSICOSSOCIAL**

O presente trabalho em nível de Doutorado foi avaliado e aprovado, em 18 de dezembro de 2023, pela banca examinadora composta pelos seguintes membros:

Dra. Priscila Batista da Rosa
Universidade de Linköping

Profa. Dra. Jade de Oliveira
Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Prof. Dr. Alexandre Pastoris Muller
Universidade Federal de Santa Catarina

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

Coordenação do Programa de Pós-Graduação
Prof. Dr. Marcelo Farina

Profa. Dra. Manuela Pinto Kaster
Orientador(a)

Florianópolis, 2024.

Dedico este estudo a todas as pessoas que sofrem ou já sofreram de algum tipo de transtorno psiquiátrico.

AGRADECIMENTOS

Agradeço aos meus pais, Patrícia e William, por terem me criado com todo amor e carinho e por sempre me estimularam a estudar. Ao meu irmão, Matheus, por ser o melhor irmão que alguém poderia ter e por sempre me encher de alegria.

À família que eu escolhi para mim, o meu namorado Caibe e a minha coelhinha Pitanga. Caibe, obrigada por ser meu companheiro em todos os momentos! Por sempre me apoiar, por ter paciência comigo e me dar tanto amor. Obrigada por toda a sua contribuição científica a esse estudo, teria sido muito mais difícil sem você. À Pitanguinha eu agradeço por me mostrar o quanto animais são inteligentes e preciosos! E por ser minha coelhinha de suporte emocional.

À minha orientadora, Profa. Manuella Kaster, por ter me acolhido desde o dia que nos conhecemos, pela orientação, por ter comprado as minhas ideias e acreditado que eu era capaz.

Aos membros da banca, os professores Jade, Alexandre, Priscila, Vivian e Ana Lúcia, por terem gentilmente aceitado o convite de avaliar e contribuir com este trabalho.

Aos amigos do Laboratório de Neurociência Translacional, os antigos e os novos, pelas risadas, conversas, conselhos e por toda ajuda na realização deste estudo. Agradeço especialmente a Fernanda e a Nicolle por terem me acolhido quando eu cheguei e a Haruna e o Leonardo por me ajudaram a analisar muitos e muitos vídeos de comportamento no final do Doutorado. Vocês são maravilhosos!

À Profa. Patrícia Brocardo e algumas gerações de membros do Laboratório de Neuroplasticidade, especialmente a Evelini, a Priscila, a Cláudia e a Anelise que são amigas que eu levarei para a vida toda.

À Profa. Joana Gaspar pelas parcerias e por ter feito a Luisinha acompanhar e ajudar nos meus experimentos, em meio a derrota social nasceu uma amizade muito especial.

À Marina, pela amizade sincera, por todas as conversas, risadas, e conselhos mesmo de longe. Obrigada por sempre acreditar e torcer por mim.

Aos meus amigos tão queridos de Londrina, principalmente à Mariana, Michelle e Daniele, por sempre arranjam um tempinho para me ver toda vez que volto para a minha terra.

Aos meus amigos da Inedita Bio, Vivi, Fer e Zé, por me apoiarem durante essa fase final de escrita da tese e por fazerem os dias de trabalho mais leves e divertidos.

Aos professores e funcionários do Departamento de Bioquímica e do Centro de Ciências Biológicas.

A todas as pessoas que não foram aqui citadas, mas que contribuíram, direta ou indiretamente, para realização deste trabalho.

A todos os animais utilizados para o desenvolvimento deste estudo.

Às agências de fomento, CAPES e CNPq.

*“Live in the present, make the most of it,
it's all you've got.”*

(Margaret Atwood –
The Handmaid's tale)

RESUMO

A autofagia é um processo de degradação e reciclagem de componentes intracelulares pelos lisossomos, como agregados proteicos e organelas danificadas. Este processo é fundamental para manutenção e sobrevivência celular, principalmente em células que não se dividem, como os neurônios. Recentemente, foi proposto que alterações na via da autofagia estão relacionadas a fisiopatologia dos transtornos mentais comuns, como depressão e ansiedade. Portanto, este estudo teve como objetivo investigar o papel da autofagia nas respostas emocionais ao estresse e na fisiopatologia dos transtornos mentais comuns. Este estudo foi dividido em dois capítulos. No primeiro capítulo foi apresentado um artigo de revisão da literatura que sumarizou as alterações da autofagia encontradas em modelos de estresse em animais e em indivíduos com transtornos psiquiátricos. Já no segundo capítulo foi apresentado os resultados da padronização de um modelo de estresse crônico de derrota social (ECDS) em camundongos fêmeas e os efeitos deste modelo nas respostas emocionais e no mecanismo de autofagia. Neste estudo, o estímulo utilizado para desencadear o comportamento agressivo dos camundongos machos *Swiss* direcionado aos camundongos fêmeas C57BL/6 foi aplicação de urina de camundongos machos C57BL/6 nas fêmeas antes das sessões de confronto físico. Em resumo, as fêmeas foram expostas a 10 dias de ECDS seguido pelos testes de interação social, campo aberto e labirinto em cruz elevado. Após o término dos testes, as fêmeas foram submetidas a eutanásia para coleta das amostras de hipocampo que foram utilizadas para quantificação dos níveis das proteínas autofágicas por *Western blot*. Foi observado que o ECDS induziu respostas comportamentais características de comportamento tipo-ansioso, mas não o comportamento de esquiva social. Além disso, as fêmeas expostas ao ECDS apresentaram redução dos níveis de beclina-1 e p62 no hipocampo, sugerindo que o estresse comprometeu a via da autofagia. Adicionalmente, foi associado um estresse agudo de derrota social (EADS) com o tratamento com um inibidor autofágico para investigar se o bloqueio da autofagia potencializaria os efeitos do estresse nas respostas emocionais das fêmeas. Entretanto, foi observado-se que o EADS induziu comportamento de esquiva social que não foi potencializado pela inibição da autofagia. Em resumo, este estudo demonstrou que o modelo ECDS descrito promoveu comportamento tipo-ansioso robusto e alterações das proteínas autofágicas nos camundongos fêmeas, podendo ser utilizado para investigar o papel da autofagia nas respostas ao estresse crônico psicossocial. Já o modelo de EADS comprometeu o comportamento de interação social, sem alterar as respostas emocionais associadas a ansiedade. Além disso, o inibidor autofágico no regime de tratamento adotado não afetou as respostas emocionais avaliadas. Logo, mais estudos são necessários para elucidar o papel da autofagia nas respostas ao estresse psicossocial e nos transtornos mentais comuns.

Palavras-chave: transtorno mentais comuns, ansiedade, derrota social, estresse crônico, proteínas autofágicas.

ABSTRACT

Autophagy is a process of degradation and recycling of intracellular components by lysosomes, such as protein aggregates and damaged organelles. This process is essential for cell maintenance and survival, especially in cells that do not divide, such as neurons. Recently, changes in the autophagy pathway were associated with the pathophysiology of common mental disorders, such as depression and anxiety. Thus, this study aimed to investigate the role of autophagy in emotional responses to stress and in the pathophysiology of common mental disorders. The study was divided into two chapters. The first chapter presents a literature review summarizing autophagy changes found in animal models of stress and individuals with psychiatric disorders. The second chapter presents the results of the standardization of a model of chronic social defeat stress (CSDS) in female mice and the effects on emotional responses and autophagy mechanisms. To trigger the aggressive behavior of male Swiss mice towards female C57BL/6 mice, male C57BL/6 mice urine was applied to the female mice before each defeat session. Briefly, female mice were exposed to 10 days of CSDS followed by social interaction, open field, and elevated plus maze tests. Female mice were submitted to euthanasia and the hippocampus was collected to quantify autophagic proteins by Western blot. The CSDS induced anxiety-like behavior responses but not social avoidance. Moreover, female mice exposed to the CSDS had reduced levels of beclin-1 and p62 in the hippocampus, suggesting dysregulation of the autophagic pathway. Additionally, acute social defeat stress (ASDS) was associated with a treatment with an autophagy inhibitor to investigate if blocking autophagy could potentiate the stress effect on the emotional responses in female mice. However, the ASDS-induced social avoidance was not potentiated by autophagy inhibition. In summary, this study showed that the CSDS model induced a robust anxiety-like behavior with alteration on autophagic proteins in female mice, and could be used to investigate the role of autophagy on the responses to psychosocial stress. Additionally, the ASDS model produced a social avoidance behavior, with no alteration of emotional responses associated with anxiety. Furthermore, the autophagic inhibitor, in the treatment schedule applied, did not affect the emotional responses. Therefore, more studies are needed to elucidate the role of autophagy in the responses to psychosocial stress and common mental disorders.

Keywords: common mental disorders, anxiety, social defeat, chronic stress, autophagic proteins.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Mecanismo e maquinário da autofagia.....	19
Figura 2. Autophagy process and principal findings of clinical and preclinical studies	10
Figura 3. Representação esquemática do delineamento experimental do modelo de ECDS	44
Figura 4. Representação esquemática do delineamento experimental do modelo de EADS associado a inibição autofágica.....	46
Figura 5. Imagens ilustrativas das etapas do protocolo de ECDS.....	48
Figura 6. Foto representativa do aparato e das etapas do teste de interação social	52
Figura 7. Foto representativa do teste do labirinto em cruz elevado	53
Figura 8. Foto representativa do teste do campo aberto.....	54
Figura 9. Células vaginais características de cada fase do ciclo estral.....	55
Figura 10. Caracterização das interações físicas entre os camundongos machos residentes e as fêmeas intrusas e alterações do peso corporal durante o ECDS.....	59
Figura 11. Caracterização das estratégias de enfrentamento adotadas pelas fêmeas durante as sessões de ECDS.	60
Figura 12. Avaliação de associações entre as fases do ciclo estral e os comportamentos emocionais avaliados após o ECDS.....	62
Figura 13. Avaliação das respostas comportamentais das fêmeas C57BL/6 expostas ao ECDS no TIS.....	63
Figura 14. Avaliação do comportamento tipo-ansioso em fêmeas expostas ao ECDS no TCA.....	65
Figura 15. Avaliação do comportamento tipo-ansioso em fêmeas expostas ao ECDS no LCE.	66
Figura 16. Avaliação dos níveis de proteínas autofágicas no hipocampo de fêmeas expostas ao ECDS.....	67
Figura 17. Avaliação dos níveis de mtor e p-mtor no hipocampo de fêmeas expostas ao ECDS.	68
Figura 18. Avaliação das respostas comportamentais das fêmeas expostas ao EADS e tratadas com um inibidor autofágico no TIS.	69
Figura 19. Avaliação do comportamento tipo-ansioso em fêmeas expostas ao EADS e tratadas com um inibidor autofágico no TCA.....	70

Figura 20. Avaliação do comportamento tipo-ansioso em fêmeas expostas ao EADS e tratadas com um inibidor autofágico no LCE.....71

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Preclinical findings associating changes in autophagy-related mechanisms in animal models of mood disorders.....	27
Tabela 2. Clinical findings associating changes in autophagy-related mechanisms in mood disorders.....	32
Tabela 3. Anticorpos primários e secundários utilizados no <i>Western blot</i>	57

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	14
1.1	O PAPEL DO ESTRESSE NA ETIOLOGIA E PROGRESSÃO DOS TRANSTORNOS MENTAIS COMUNS	14
1.2	MECANISMOS DE AUTOFAGIA NO SISTEMA NERVOSO CENTRAL (SNC) E EM TRANSTORNOS MENTAIS COMUNS	17
1.3	JUSTIFICATIVA	21
	CAPÍTULO I. ARTIGO DE REVISÃO DA LITERATURA	23
	CAPÍTULO II. PADRONIZAÇÃO DO MODELO DE ESTRESSE CRÔNICO DE DERROTA SOCIAL E AVALIAÇÃO DA AUTOFAGIA EM CAMUNDONGOS FÊMEAS	37
1	INTRODUÇÃO	38
1.1	ESTRESSE CRÔNICO DE DERROTA SOCIAL	38
1.2	DERROTA SOCIAL E AUTOFAGIA	40
1.3	HIPÓTESES	41
2	OBJETIVOS	42
2.1	OBJETIVO GERAL	42
2.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	42
3	MATERIAL E MÉTODOS	43
3.1	ANIMAIS E ASPECTOS ÉTICOS	43
3.2	DELINEAMENTO EXPERIMENTAL	43
3.2.1	Padronização do modelo de ECDS e caracterização das respostas emocionais	43
3.2.2	Modelo de Estresse Agudo de Derrota Social (EADS) associado a inibição autofágica	45
3.3	MODELOS DE ESTRESSE	46
3.3.1	Seleção de camundongos machos residentes	46
3.3.2	Coleta de urina dos machos	47
3.3.3	Protocolo de ECDS	47

3.3.4	Avaliação do comportamento agressivo dos camundongos residentes	49
3.3.5	Avaliação das estratégias de enfrentamento das fêmeas expostas ao ECDS	50
3.3.6	Protocolo de EADS.....	50
3.4	TESTES COMPORTAMENTAIS E CICLO ESTRAL.....	50
3.4.1	Teste de interação social (TIS).....	51
3.4.2	Labirinto em cruz elevado (LCE).....	52
3.4.3	Teste do campo aberto (TCA).....	53
3.4.4	Avaliação do ciclo estral.....	54
3.5	ANÁLISE DE PROTEÍNAS AUTOFÁGICAS POR WESTERN BLOT	55
3.6	ANÁLISES ESTATÍSTICAS.....	57
4	RESULTADOS.....	58
4.1	PADRONIZAÇÃO DE UM MODELO DE ESTRESSE DE DERROTA SOCIAL EM CAMUNDONGOS FÊMEAS	58
4.2	AVALIAÇÃO DA AUTOFAGIA EM CAMUNDONGOS FÊMEAS EXPOSTAS AO ECDS	66
4.3	AVALIAÇÃO DO EFEITO DO EADS ASSOCIADO A ADMINISTRAÇÃO DE UM INIBIDOR AUTOFÁGICO	68
5	DISCUSSÃO	72
5.1	PADRONIZAÇÃO DE UM MODELO DE ESTRESSE PSICOSSOCIAL EM CAMUNDONGOS FÊMEAS.....	72
5.2	AVALIAÇÃO DA AUTOFAGIA EM CAMUNDONGOS FÊMEAS EXPOSTAS AO ECDS	78
5.3	AVALIAÇÃO DO EFEITO DO EADS ASSOCIADO A ADMINISTRAÇÃO DE UM INIBIDOR AUTOFÁGICO	81
6	CONCLUSÃO	84
	REFERÊNCIAS.....	85
	ANEXO A – Certificado de Aprovação do CEUA	100

1 INTRODUÇÃO

1.1 O PAPEL DO ESTRESSE NA ETIOLOGIA E PROGRESSÃO DOS TRANSTORNOS MENTAIS COMUNS

Estima-se que uma a cada oito pessoas ao redor do mundo é afetada por perturbações cognitivas, emocionais e comportamentais características de transtornos psiquiátricos. Os transtornos mentais comuns, que incluem depressão e ansiedade, estão entre as principais causas de incapacidade no mundo (ORMEL & VONKORFF, 2021). Atualmente, o transtorno depressivo maior (TDM) e os transtornos de ansiedade são considerados a primeira e sexta causa de incapacidade civil mundial representando, respectivamente, 5,6% e 3,4% de todos os anos vividos com incapacidade. Somados a outros transtornos, geram um gasto anual de cerca de 2,5 trilhões de dólares para economia global, podendo chegar a 6 trilhões até 2030 (WHO, 2022).

O TDM apresenta uma prevalência de 4,0% ao redor do mundo, afetando mais de 298 milhões de pessoas (WHO, 2022). Os principais sintomas do TDM são alterações de humor, perda de interesse e motivação, baixa autoestima, cansaço, disfunção cognitiva e alterações de sono e apetite (VILLANUEVA, 2013). Além disso, pacientes com TDM apresentam um maior risco de morte por suicídio e de desenvolver doenças cardiovasculares, obesidade, diabetes mellitus, câncer, isquemia cerebral e comorbidades psiquiátricas (PENNINX et al., 2013; WHOOLEY & WONG, 2013).

Os transtornos de ansiedade consistem em um grupo heterogêneo de transtornos psiquiátricos caracterizados por ansiedade patológica, associada a sentimentos de angústia, tensão, medo e nervosismo proveniente de algo desconhecido, podendo alterar o funcionamento do sistema nervoso, cardíaco e gastrointestinal (PENNINX et al., 2021). Os transtornos de ansiedade apresentam uma prevalência mundial de 4,2%, ou seja, cerca 374 milhões de pessoas apresentam algum tipo de transtorno de ansiedade (WHO, 2022).

Além disso, os transtornos de ansiedade são comumente associados a diferentes transtornos psiquiátricos, sendo comorbidades frequentes do TDM (THIBAUT, 2017). Estima-se que metade a dois terços dos indivíduos diagnosticados com um transtorno de ansiedade também são diagnosticados com TDM (LAMERS et

al., 2011). A ocorrência concomitante destes transtornos aumenta a severidade e a duração dos sintomas e prejudica a resposta ao tratamento (PENNINX et al., 2011).

Os transtornos de ansiedade e depressão compartilham muitos aspectos neurobiológicos, sintomas clínicos e fatores de risco. Embora tenham sido feitos muitos avanços no entendimento da neurobiologia destes transtornos, eles apresentam etiologia heterogênea. Além disso, ainda não foram estabelecidos mecanismos capazes de explicar todos os aspectos comportamentais e alterações clínicas encontradas em pacientes.

Segundo dados epidemiológicos, transtornos depressivos e ansiosos são mais prevalentes em mulheres (WHO, 2017). Além disso, mulheres com TDM apresentam início precoce dos sintomas, baixa qualidade de vida e alta prevalência de comorbidade com transtornos de ansiedade (BANGASSER & CUARENTA, 2021). Neste sentido, um estudo demonstrou que existem diferenças nos genes transcritos no córtex pré-frontal de homens e mulheres com TDM (LABONTÉ et al., 2017).

Sabe-se que os transtornos mentais comuns são condições multifatoriais, nas quais ocorrem alterações em circuitos neuronais, estruturas encefálicas, sistemas de neurotransmissão, e em sistemas que medeiam a resposta ao estresse, como o sistema nervoso autônomo, o eixo hipotálamo-pituitária-adrenal (HPA) e o sistema imunológico (KUPFER et al., 2012; OTTE et al., 2016). Embora ocorra influência de fatores genéticos, os eventos estressores são os principais fatores ambientais associados a gênese e progressão dos transtornos mentais comuns (MONROE & HARKNESS, 2005; PLIEGER et al., 2015). A ocorrência de eventos de estresse psicossocial, como perda de emprego, exposição a violência, descoberta de doenças graves ou crônicas, separação ou luto são frequentemente relatados por pacientes anteriormente ao primeiro episódio depressivo (KESSLER, 1997). Entretanto, ressalta-se que nem todos os indivíduos expostos a eventos estressores desenvolvem alterações de humor e ansiedade persistentes, indicando que existem características individuais que conferem resiliência ou suscetibilidade ao estresse (MÉNARD et al., 2017).

Resiliência é a capacidade de um indivíduo em adaptar-se e recuperar-se de condições adversas. Ressalta-se que resiliência não é sinônimo de resistência ao estresse, ou seja, o indivíduo resiliente experiencia os efeitos do estresse, porém apresenta mecanismos adaptativos que permitem que sua recuperação ocorra mais

rapidamente (DANTZER et al., 2018; FLESHNER et al., 2011). Apesar dos mecanismos capazes de gerar resiliência ainda serem pouco entendidos, acredita-se que se trata de um processo ativo, envolvendo alterações comportamentais, ativação de mecanismos genéticos, epigenéticos, neuroquímicos e modificações de plasticidade em diferentes áreas encefálicas (CATHOMAS et al., 2019).

A resposta ao estresse agudo envolve a ativação do sistema simpático-adrenomedular e do HPA, culminando na produção de catecolaminas e glicocorticoides (GC) e na preparação do organismo para responder ao estímulo estressor (ULRICH-LAI & HERMAN, 2009). Contudo, sabe-se que o estresse crônico está relacionado com a hiperativação do eixo HPA, uma alteração frequentemente observada em pacientes com TDM, caracterizada por níveis elevados de cortisol (KNORR et al., 2010; NEMEROFF & VALE, 2005; STETLER & MILLER, 2011), redução da função dos receptores de GC e disfunção do mecanismo regulatório de retroinibição do próprio eixo HPA (MCQUADE & YOUNG, 2000). Adicionalmente, a hiperativação do eixo HPA também já foi observada em subpopulações de indivíduos com transtornos de ansiedade e em modelos animais de estresse e ansiedade (ROOZENDAAL et al., 2009; TAFET & NEMEROFF, 2020).

Diferentes áreas límbicas e corticais, associadas à regulação do comportamento emocional e cognição, são afetadas pela desregulação do eixo HPA. A formação hipocampal compreende estruturas localizadas nos lobos temporais, associadas com a formação e consolidação da memória, navegação espacial e integração de estímulos sensoriais, cognitivos e comportamentos emocionais (KNIERIM, 2015). Esta região possui um grande número de receptores de GC, e seus neurônios são particularmente sensíveis a aumentos nos níveis de cortisol. A hiperativação prolongada do eixo HPA é capaz de gerar modificações no funcionamento e morfologia da formação hipocampal, como redução da neurogênese, do tamanho e número das arborizações e espinhas dendríticas e atrofia dos neurônios piramidais (DUMAN, 2004; LEE et al., 2002; TROUBAT et al., 2021). Contudo, os efeitos do estresse crônico vão além de prejuízos no eixo HPA, podendo afetar mecanismos celulares envolvidos na plasticidade hipocampal, respostas imunológicas, processos de autofagia e renovação celular, culminando em prejuízos no controle cognitivo e emocional.

1.2 MECANISMOS DE AUTOFAGIA NO SISTEMA NERVOSO CENTRAL (SNC) E EM TRANSTORNOS MENTAIS COMUNS

A autofagia é um processo de degradação e reciclagem de proteínas e organelas citoplasmáticas. Existem três tipos de autofagia que são conhecidas como macroautofagia, microautofagia e autofagia mediada por chaperonas. Embora estes três processos apresentem mecanismos distintos, todos resultam na degradação de componentes celulares por meio da ação dos lisossomos (CAO et al., 2021; YANG & KLIONSKY, 2010).

Dentre estes, a macroautofagia é o mecanismo melhor compreendido. A macroautofagia (que será referida a partir daqui apenas como autofagia) é caracterizada pela formação de vesículas, chamadas de autofagossomos, que capturam porções do citoplasma e, posteriormente, se fusionam com os lisossomos para que ocorra a degradação e reciclagem dos componentes celulares sequestrados (KLIONSKY & EMR, 2012). Este processo ocorre constitutivamente em um nível basal, porém pode ser induzido como uma resposta adaptativa a condições estressantes, como por exemplo, a depleção de nutrientes necessários para a sobrevivência celular (YORIMITSU & KLIONSKY, 2005).

A autofagia é responsável por fazer o controle de qualidade dos componentes celulares, por meio da eliminação seletiva de proteínas e organelas danificadas ou excedentes, que poderiam ser tóxicas para a célula (VARGAS et al., 2023). Adicionalmente, a autofagia também desempenha um importante papel durante o processo de diferenciação celular e desenvolvimento, bem como consiste em uma das primeiras linhas de defesa do sistema imunológico contra microrganismos patogênicos (YIN et al., 2016). Portanto, a autofagia é considerada um mecanismo citoprotetor e sua disfunção está associada a diversas doenças, como câncer, doenças cardíacas, pulmonares, metabólicas e neurodegenerativas (PARZYCH & KLIONSKY, 2014).

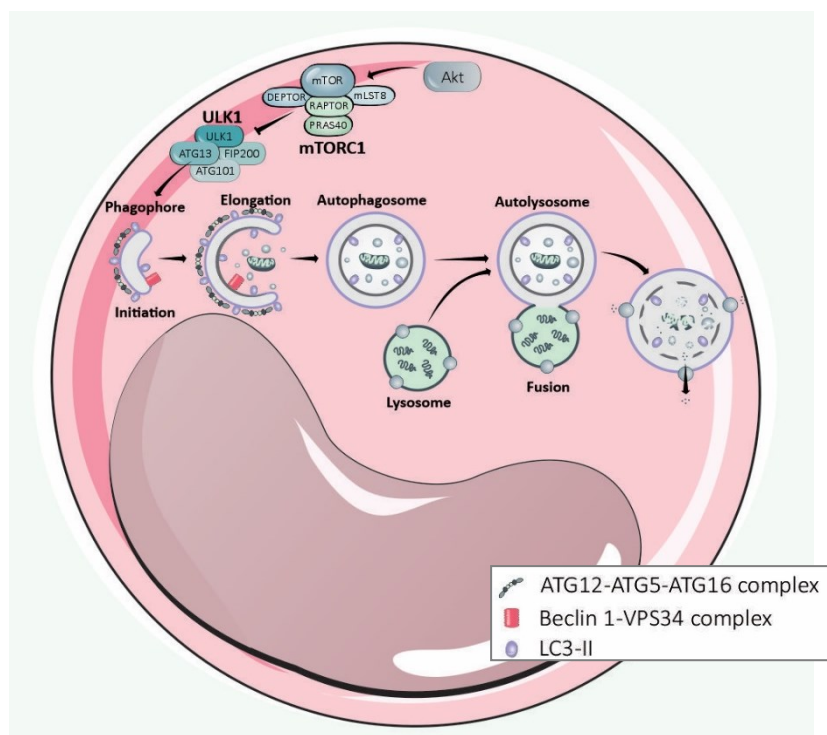
Por outro lado, em algumas situações, a autofagia pode causar a degradação de componentes citoplasmáticos indispensáveis para a sobrevivência celular ou facilitar a ativação dos mecanismos de morte celular programada e assim estar relacionada a patogênese de algumas doenças (MARIÑO et al., 2014; YORIMITSU & KLIONSKY, 2005).

O processo de autofagia (Figura 1) se inicia a partir da formação de uma dupla membrana de isolamento, inicialmente chamada de fagóforo, por meio da ativação do complexo ULK1 (*UNC-51-like kinase1*), FIP200 (*focal adhesion kinase family interacting protein of 200 kD*), ATG13 (*autophagy-related protein 13*) e ATG101 que fosforila e ativa o complexo VPS34 (*vacuolar protein sorting 34*)-Beclina-1. Este último complexo é responsável pelo processo de nucleação, isto é, a mobilização de moléculas ao local de montagem do fagóforo. Em situações em que há disponibilidade de nutrientes e ausência de estímulos estressantes, o complexo ULK1 é inibido pela mTORC1 (*mammalian target of rapamycin* complexo 1) que consiste em um regulador negativo chave da autofagia (YIN et al., 2016).

Após formado, o fagóforo passará por um processo de expansão da membrana que é dependente de dois sistemas conjugados semelhantes a ubiquitina. O primeiro é o complexo ATG12-ATG5-ATG16, que durante a expansão localiza-se na membrana externa do fagóforo, mas dissocia-se antes do fechamento da membrana. E o segundo é a conjugação da proteína LC3-I (*protein light chain 3*) com fosfatidiletanolamina via ATG7 e ATG3, formando a proteína LC3-II, que permanece ligada a membrana mesmo após o término do processo de formação do fagóforo. Quando a membrana se fecha o fagóforo passa a ser chamado de autofagossomo. Adicionalmente, a marcação de LC3-II é amplamente empregada em ensaios de autofagia para identificação de autofagossomos e autofagolisossomos (NIKOLETOPOULOU et al., 2015; YAMAMOTO & YUE, 2014).

Por fim, ocorre a fusão da membrana externa do autofagossomo com o lisossomo, formando o autofagolisossomo, que é mediada por diversas proteínas, principalmente proteínas tipo SNARE (*soluble N-ethylmaleimide-sensitive factor attachment*) (MARIÑO et al., 2014). No autofagolisossomo, a membrana interna do autofagossomo, bem como seu conteúdo serão degradados pela ação de hidrolases (YIN et al., 2016). A seguir, as macromoléculas remanescentes são transportadas por meio de permeases para o citosol, onde são reutilizadas (YANG et al., 2006).

Figura 1. Mecanismo e maquinário da autofagia



Legenda: A figura representa o mecanismo de formação de um autofagolisossomo em uma célula do sistema imunológico periférico (monócito). Observa-se que para que ocorra o processo de autofagia, o complexo ULK1 deve ser ativado dando início a formação do fagóforo. Então, a membrana do fagóforo se alonga em torno das proteínas e organelas que devem ser degradadas e por fim, se fecha formando o autofagossomo. Posteriormente, o autofagossomo se funde com o lisossomo formando o autofagolisossomo, estrutura responsável pela degradação do conteúdo que foi englobado e a liberação das macromoléculas remanescentes. Um dos principais inibidores do mecanismo de autofagia é a mTORC1. Fonte: Adaptado de Pierone et al. (2020).

Os neurônios são células pós-mitóticas compostas por estruturas altamente especializadas que fazem comunicação intercelular. Por serem células que não possuem a capacidade de se replicar, os neurônios são mais sensíveis a alterações da autofagia, podendo levar ao acúmulo de proteínas tóxicas e organelas danificadas e ao comprometimento da função neuronal (SON et al., 2012). Ainda não se sabe ao certo se existem diferenças na regulação da autofagia em células neuronais quando comparadas as células não neuronais. Acredita-se que a autofagia é ativa constitutivamente em níveis basais no SNC e que este processo é crucial para funcionamento neuronal (NIKOLETOPOULOU et al., 2015; SIDIBE et al., 2022).

Estudos em animais geneticamente modificados, que não expressavam proteínas essenciais para que ocorra a autofagia, evidenciaram a importância deste processo no SNC. Foi demonstrado que animais com depleção de ATG5 ou ATG7 nos neurônios apresentaram acúmulo intracelular de agregados proteicos resultando

em morte neuronal (HARA et al., 2006; KOMATSU et al., 2006). Essas alterações são características de doenças neurodegenerativas, como a doença de Alzheimer e a doença de Parkinson (JIA & LE, 2015). Além disso, alterações da autofagia têm sido relacionadas à patogênese dos transtornos mentais comuns.

A hipótese do envolvimento da autofagia na neurobiologia dos transtornos mentais comuns surgiu a partir de estudos pré-clínicos e clínicos que demonstraram associações entre o tratamento com antidepressivos e a expressão de marcadores autofágicos. O estudo conduzido por Gassen e colaboradores (2014) demonstrou uma correlação positiva entre a expressão de beclina-1 nas células sanguíneas mononucleares periféricas de pacientes com TDM ou transtorno bipolar durante episódio depressivo e a resposta clínica a antidepressivos. Posteriormente, Alcocer-Gómez e colaboradores (2017) observaram um aumento na transcrição de LC3 e beclina-1 também nas células mononucleares de pacientes com TDM tratados com antidepressivos. Contraditoriamente, o estudo conduzido por He e colaboradores (2019) correlacionou níveis basais altos de beclina-1 em células periféricas com baixa resposta a antidepressivos em pacientes com TDM.

Diversos estudos conduzidos em roedores demonstraram alterações em marcadores autofágicos em resposta ao estresse crônico que foram revertidas pelo tratamento com antidepressivos clássicos ou substâncias que possuem efeitos antidepressivos (HUANG et al., 2018; LI et al., 2016; PATEL et al., 2016; WANG et al., 2019; ZHAO et al., 2017). Por exemplo, recentemente foi demonstrado que a cetamina, um fármaco que apresenta efeito antidepressivo rápido, reverteu o comportamento tipo-depressivo e aumentou a ativação da autofagia nas células da microglia no córtex pré-frontal e hipocampo de ratos expostos ao estresse crônico de contenção (LYU et al., 2022).

Neste contexto, esses estudos sugerem que a exposição ao estresse causa uma redução da ativação da autofagia que estaria associada a alterações das respostas emocionais que são revertidas pelo reestabelecimento da autofagia por meio de substâncias com efeitos antidepressivos. Por outro lado, alguns estudos também conduzidos em roedores, demonstraram o aumento de marcadores autofágicos em resposta a exposição ao estresse crônico imprevisível leve e ao estresse de contenção pré-natal (WANG, et al., 2018; XIAO et al., 2018; ZHANG et al., 2017), sugerindo que a ativação excessiva da autofagia estaria relacionada ao

prejuízo das respostas emocionais nestes modelos. Os resultados obtidos nestes estudos reforçam a necessidade de se elucidar o papel que a autofagia desempenha na regulação das respostas emocionais ao estresse, envolvidas na fisiopatologia dos transtornos mentais comuns.

1.3 JUSTIFICATIVA

Estima-se que no mundo pós-pandemia existam 298 milhões de pessoas sofrendo de TDM e 374 milhões de pessoas sofrendo de algum tipo de transtorno de ansiedade (WHO, 2022). Além disso, existe 57% de chance de TDM e os transtornos de ansiedade ocorrerem concomitantemente (KRUEGER & FINGER, 2001; MINEKA et al., 1998).

O diagnóstico dos transtornos mentais comuns é feito por meio de entrevistas e questionários que visam identificar os sintomas clínicos, geralmente baseados nos critérios estabelecidos pela 5ª edição do Manual Diagnóstico e Estatístico de Transtornos Mentais (DSM-5) (APA, 2013). Entretanto, a avaliação das manifestações clínicas não leva em consideração a heterogeneidade biológica destes transtornos (LILIENFELD & TREADWAY, 2017), o que dificulta o desenvolvimento de planos de tratamento eficientes e individualizados (LOPRESTI et al., 2014).

Estima-se que 30% a 50% dos pacientes com TDM tratados com os antidepressivos de primeira linha atualmente disponíveis na clínica não respondam adequadamente ao tratamento (HODES et al., 2014; MÉNARD et al., 2017) e cerca de 67% não atingem a remissão completa dos sintomas (WARDEN et al., 2009). Estes dados indicam que os tratamentos farmacológicos disponíveis não abrangem as respostas patológicas secundárias, comorbidades ou a causalidade do TDM.

O tratamento dos transtornos de ansiedade também é pouco eficiente, estimando-se que um terço dos pacientes não atingem a remissão completa dos sintomas quando tratados com os medicamentos de primeira linha (POLLACK et al., 2008). Além disso, os medicamentos prescritos apresentam muitos efeitos adversos, podendo causar dependência e síndrome de abstinência quando o tratamento é interrompido (DAVIDSON et al., 2010; HUFFMAN & ALPERT, 2010).

Embora o TDM e os transtornos de ansiedade sejam duas vezes mais prevalentes em mulheres (KESSLER et al., 2012; WHO, 2017), ainda existem poucos

estudos investigando os mecanismos fisiopatológicos destes transtornos em modelos experimentais que utilizam fêmeas.

Assim, o principal obstáculo enfrentado para o desenvolvimento de novos fármacos e métodos de diagnóstico é a falta de entendimento dos mecanismos fisiopatológicos dos transtornos mentais comuns, bem como as diferenças dependentes do sexo. Deste modo, este estudo teve como objetivo investigar o papel da autofagia, uma via metabólica importante para manutenção e sobrevivência celular, nas repostas ao estresse e na fisiopatologia dos transtornos mentais comuns.

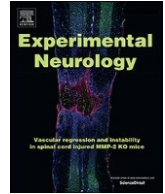
Esta tese foi dividida em dois capítulos. O capítulo I apresenta um artigo de revisão da literatura que sumariza os achados de alterações da autofagia em roedores expostos a modelos de estresse e em indivíduos diagnosticados com transtornos psiquiátricos. Já o capítulo II apresenta a padronização de um modelo de estresse psicossocial em camundongos fêmeas que foi utilizado para investigar os efeitos do estresse nas respostas emocionais e no mecanismo de autofagia.

Por fim, ressalta-se que o estabelecimento de modelos de estresse psicossocial em fêmeas e entendimento do mecanismo de autofagia pode contribuir para compreensão da neurobiologia de transtornos de depressão e ansiedade, bem como as diferenças dependentes do sexo. Além disso, este conhecimento pode ser utilizado para o desenvolvimento de terapias farmacológicas e ferramentas diagnósticas mais eficazes.

CAPÍTULO I. ARTIGO DE REVISÃO DA LITERATURA

Como parte dos resultados obtidos durante o desenvolvimento desta tese de Doutorado foi publicado um artigo de revisão da literatura intitulado “Stress and signaling pathways regulating autophagy: From behavioral models to psychiatric disorders” na revista *Experimental Neurology* no ano de 2020.

O artigo teve como objetivo sumarizar e discutir os achados de alterações na via da autofagia em modelos pré-clínicos de estresse e em pacientes com transtornos psiquiátricos. O artigo na íntegra se encontra abaixo.



Review Article

Stress and signaling pathways regulating autophagy: From behavioral models to psychiatric disorders



Bruna C. Pierone, Caibe A. Pereira, Michelle L. Garcez, Manuella P. Kaster*

Department of Biochemistry, Federal University of Santa Catarina (UFSC), Florianópolis, Santa Catarina, Brazil

ARTICLE INFO

Keywords:

Macroautophagy
Major Depressive Disorder
Bipolar Disorder
Animal Models Stress

ABSTRACT

Autophagy is a process of degradation and recycling of cytoplasmic components by the lysosomes. In the central nervous system (CNS), autophagy is involved in cell surveillance, neuroinflammation, and neuroplasticity. Neuropsychiatric conditions are associated with functional disturbances at molecular and cellular levels, causing significant impairments in cell homeostasis. Additionally, emerging evidence supports that dysfunctions in autophagy contribute to the pathophysiology of neurological diseases. However, the studies on autophagy in psychiatric disorders are highly heterogeneous and have several limitations, mainly to assess causality and determine the autophagy flux in animals and human samples. Besides, the role of this mechanism in non-neuronal cells in the CNS is only recently being explored. Thus, this review summarizes and discusses the changes in the autophagy pathway in animal models of psychiatric disorders and the limitations underlying the significant findings. Moreover, we compared these findings with clinical studies. Understanding the involvement of autophagy in psychiatric conditions, and the limitation of our current models may contribute to the development of more effective research approaches and possibly pharmacological therapies.

1. Introduction

Mammalian cells intracellular components undergo continuous renovation, remodeling, and recycling. These functions are essential for homeostasis during changes in the cellular environment and during the normal cell lifespan (Mizushima and Komatsu 2011). We do not entirely understand how this phenomenon occurs in different cell types or the significance behind such intricate events in physiological and pathological conditions. However, it is well recognized that in order to adapt to changes in nutrient levels, after stressful stimuli, or even after immune activation and infection, the degradation of pre-existing molecules and organelles and the synthesis of new components are essential for cellular renovation (Kroemer et al. 2010).

The discovery of the lysosome, by Christian de Duve, was the first important step towards identifying the mechanisms responsible for the cellular renovation. These organelles wrapping acid phosphatases and hydrolytic enzymes have lytic functions and were primarily associated with protein degradation (de Duve et al. 1955; de Duve 1963). The first process described was heterophagy (now endocytosis). In this pathway, materials from outside the cell are first taken up into a phagosome, before being fused with the lysosome for degradation and re-cycling (Mahapatra et al. 2019).

The idea that degradation of intracellular components also occurs appeared later in the literature, when irregularly shaped vacuoles containing portions of the cytoplasm and organelles, but without hydrolytic enzymes, were identified. These structures, formed before the

Abbreviations: ATG, autophagy-related; A β , amyloid beta; BDI, Beck Depression Inventory; CNS, central nervous system; CUMS, chronic unpredictable mild stress; DSM-IV, Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders; EPM, elevated plus maze; FAST, Functioning Assessment Short Test; FIP200, focal adhesion kinase family interacting protein of 200 kDa; FST, forced swim test; GAF, Global Assessment of Functioning; HC, hippocampus; HDRS, Hamilton Depression Rating Scale; i.c.v., intracerebroventricular; i.p., intraperitoneal; LC3, protein light chain 3; LH, Learned helplessness; LPS, lipopolysaccharide; MADRS, Montgomery-Åsberg Depression Rating Scale; MDD, Major depressive disorder; MDMA, 3,4-methylenedioxymethamphetamine; MINI, Mini-International Neuropsychiatric Interview; mTOR, mammalian target of rapamycin; MWM, Morris water maze; NAc, nucleus accumbens; NSF, novelty-suppressed feeding; OFT, open field test; p.o., oral administration; PA task, passive avoidance step-through task; PBMC, peripheral blood mononuclear cell; PFC, prefrontal cortex; PI3K, phosphatidylinositol 3 kinase; PI3P, phosphatidylinositol 3-phosphate; PTSD, Post-traumatic stress disorder; SADS-L, Schedule for Affective Disorders and Schizophrenia: lifetime version; SCID, Structured Clinical Interview for DSM-IV Psychiatric Disorders; SCL-90-R, Symptom Distress Checklist; SNRI, serotonin-norepinephrine reuptake inhibitor; SPS, single prolonged stress; SPT, sucrose preference test; SQSTM1, sequestosome 1; SSRI, selective serotonin reuptake inhibitor; STZ, streptozotocin; TST, tail suspension test; ULK, Unc-51-like kinase family; Vps34, vacuolar protein sorting 34; YM, Y maze; YMRS, Young Mania Rating Scale

* Corresponding author.

E-mail address: manuella.kaster@ufsc.br (M.P. Kaster).

<https://doi.org/10.1016/j.expneurol.2020.113485>

Received 15 May 2020; Received in revised form 21 August 2020; Accepted 24 September 2020

fusion with the lysosomes, are called autophagosomes. This mode of degradation of cytoplasmic materials was termed “autophagy” (from the Greek for self-eating) (Yang and Klionsky 2010a).

1.1. Autophagy: an overview of the molecular machinery

Autophagy is highly conserved in eukaryotes. In mammalian cells, three distinct types of autophagy can occur, microautophagy, chaperone-mediated autophagy, and macroautophagy. All three types are responsible for the degradation and recycling of cytosolic components by the lysosomes (Yang and Klionsky 2010b). In the microautophagy, cytosolic components are directly captured in a non-selective manner by invaginations or protrusions of the lysosomal membranes (Marzella et al. 1981; Mijaljica et al. 2011). On the other hand, chaperone-mediated autophagy is a highly specific process that targets KFERQ amino acid sequences, which are pentapeptide motifs present in some cytosolic proteins (Dice 1988). When chaperone-mediated autophagy is activated, the KFERQ motifs are recognized by a complex of cytosolic chaperones and cochaperones that deliver the substrate protein to the lysosomal membrane, where the protein is unfolded and translocated to the lysosomal lumen for degradation (Orenstein and Cuervo 2010).

Lastly, macroautophagy can be separated into two distinct pathways, classical and alternative. On both pathways, the cytosolic components are sequestered within a double-membrane vesicle termed autophagosome. These structures fuse to the lysosomes, forming the autolysosomes, and their content is degraded and recycled. However, the alternative pathway occurs independently of ATG5/ATG7, it has no association with protein light chain 3 (LC3) modifications, and the initial autophagic vacuole is formed in the Golgi complex, in a process mediated by Rab9 proteins (Nishida et al. 2009; Arakawa et al. 2017). In this review, we will discuss the specific machinery, regulation, and roles of classical macroautophagy (hereafter referred to as autophagy) in mammalian cells and their possible involvement in psychiatric disorders.

The process of autophagy can be summarized in the following events: induction, nucleation, elongation, closure/maturation, fusion, and cargo degradation/recycling. The first step is the formation of the initial sequestering membrane, called phagophore. Autophagy induction involves the complex of the Unc-51-like kinase family (ULK1 or ULK2), the mammalian homolog of ATG13, the protein FIP200 (focal adhesion kinase family interacting protein of 200 kDa), and the ATG101, which interacts with ATG13 (Hara et al. 2008; Hosokawa et al. 2009; Mercer et al. 2009). When autophagy is not needed, this complex is associated with the mammalian target of rapamycin complex 1 (mTORC1), in a phosphatidylinositol 3 kinase (PI3K)/Akt dependent cascade, which inhibits autophagy by phosphorylation of ULK1/2 and ATG13 (Ganley et al. 2009; Heras-Sandoval et al. 2014).

In the second step occurs the mobilization of a group of molecules to the phagophore site, called nucleation, which involves the class PI3K complex. This complex is composed of the vacuolar protein sorting 34 (Vps34), Beclin-1, p150, and ATG14L, and it generates phosphatidylinositol 3-phosphate (PI3P) to recruit the PI3P binding proteins (Burman and Ktistakis 2010; Itakura and Mizushima 2010). Then, the phagophore membrane expands and surrounds the cargo by the action of two conjugation systems involving ubiquitin-like proteins. The first system is formed by ATG12 and ATG5 conjugation via ATG7 and ATG10, an E1, and E2-like enzymes, respectively (Mizushima et al. 1998). Further, the ATG12-ATG5 conjugate binds to ATG16L, forming the ATG12-ATG5-ATG16L complex. This complex is associated with the outer membrane, but it dissociates when the autophagosome is completed (Mizushima et al. 2001, 2003). The second system is formed by the LC3 protein, which is cleaved by ATG4, generating the cytosolic form of LC3-I. LC3-I is conjugated with phosphatidylethanolamine (PE) by ATG7 and ATG3, forming LC3-II, its lipidated form (Geng and Klionsky 2008). LC3-II remains attached to the autophagosomes and autolysosomes membranes. Therefore, it is used as a marker in assays for

autophagy evaluation (Mariño et al. 2014).

It is believed that the autophagosome is made *de novo*. However, the source of the phagophore membrane is not known for sure (Kim et al. 2002; Noda et al. 2002). ATG9 is a transmembrane protein located in the trans-Golgi network and endosomes that seems essential for phagophore formation. It was observed that when autophagy is activated by starvation, ATG9 is found at the site of phagophore formation (Young et al. 2006). Therefore, ATG9 has been suggested as responsible for delivering membrane components to the forming phagophore (Orsi et al. 2011; Yamamoto et al. 2012).

Finally, the phagophore membrane closes, forming the autophagosome. The fusion of the outer membrane of the autophagosome with the lysosome generates the autolysosome. Most details about this process are not well understood, but it has been suggested that SNARE-like proteins may be involved in this fusion (Mariño et al. 2014). In the final step, the cytosolic components are degraded by lysosomal enzymes, and the remaining molecules, such as amino acids and lipids, are transported back to the cytoplasm by permeases (Yin et al. 2016).

Autophagy can be either a selective or non-selective pathway. Non-selective autophagy degrades random cytosolic components to provide energy in response to nutrient deprivation. On the other hand, selective autophagy degrades labeled cargos, such as damaged mitochondria, aggregated, or misfolded proteins (Lamark et al. 2017). The sequestosome 1 (SQSTM1), also known as p62, is an autophagy receptor required for selective autophagy. It acts as a receptor for proteins and organelles labeled with ubiquitin and delivers these selected cargos to the autophagosome by directly binding to LC3-II in the inner membrane (Sánchez-Martín and Komatsu 2018). The p62 receptors remain associated with LC3-II and are mostly degraded by the autophagic process. Thus, p62 levels are used to evaluate autophagic flux (Ichimura and Komatsu 2010; Yoshii and Mizushima 2017).

Autophagy is also regulated by epigenetic mechanisms, including histone acetylation and deacetylation. Deacetylation of autophagy-related genes by Sirtuins (SIRT1) occurs in response to different stress conditions. For instance, starvation increases the levels of SIRT1, which deacetylates Atg5, Atg7, and LC3 and subsequently induces autophagy (Lee 2019). However, a recent study showed that corticosterone exposure *in vitro* causes a dose-dependent decrease in SIRT1 and an increase in LC3II/I expression (Jiang et al. 2019). Thus, the role of epigenetic regulation in autophagy under chronic stress needs to be further explored.

1.2. Autophagy in the central nervous system

As post-mitotic cells, neurons are particularly vulnerable to autophagy deficiency and largely rely on constitutive levels of autophagy for survival. The depletion of autophagy proteins in neurons is sufficient to induce neuronal death (Hara et al. 2006; Komatsu et al. 2006, 2007; Nishiyama et al. 2007). *In vitro* studies suggest that different neuronal types may have distinctive capacities to degrade autophagy substrates. This property might be associated with the sensitivity of these cells to neurodegeneration (Tsvetkov et al. 2013).

In the CNS, besides protecting against neurodegeneration, autophagy also regulates neuronal development and neuroplasticity (Menziez et al. 2017; Stavoe and Holzbaaur 2019). During development, neuronal autophagy plays an essential role in processes such as neural tube closure, axonal development, and synapse formation (Menziez et al. 2017). Moreover, autophagy pathways regulate the clustering of synaptic vesicles in presynaptic compartments and facilitate postsynaptic maturation and synaptic pruning (Tan et al. 2014; Glatigny et al. 2019; Lee and Kim 2019; Liang 2019). Autophagy-related proteins are highly expressed in neurogenic progenitors from the subventricular zone and the hippocampal dentate gyrus from adult mice, regulating self-renewal, survivor, and maturation of the neural stem cells (Yazdankhah et al. 2014; Xi et al. 2016).

In microglial cells, the role of autophagy machinery in physiological

and pathological conditions just started to be elucidated. Recent data suggest that there is a functional overlap between autophagy and microglial phagocytosis (Plaza-Zabala et al. 2017). However, recent discoveries point to autophagy modulation in these cells as a mechanism that suppresses the activation of inflammasomes and inflammasome-dependent cytokine production, with functional consequences to neuroinflammation (Shibutani et al. 2015; Houtman et al. 2019). Additionally, by removing damaged mitochondria, autophagy prevents the accumulation of cytosolic mitochondrial DNA and reactive oxygen species (ROS) overproduction, preventing inflammasome activation (Nakahira et al. 2011; Zhou et al. 2011). Moreover, it has recently been suggested that the depletion of autophagy-related genes reduces microglial synaptic pruning, influencing synaptic function and brain wiring, with behavioral consequences associated with autism spectrum disorders (Kim et al. 2017).

Relatively little is understood about autophagic mechanisms in astrocytes. It was demonstrated that ATG5 regulates astrocytic differentiation in the mouse cortex during development (Wang et al. 2014a). Moreover, the downregulation of ATG7 and p62 inhibits astrocytes differentiation from neural stem cells (Wang et al. 2018a). In response to starvation, autophagy is more robustly activated in primary cultures of astrocytes as compared to neurons (Kulkarni et al. 2019). It was observed that fluoxetine promotes astrocytic autophagy that eliminates damaged mitochondria, suggesting that astrocytic autophagy may be involved in the mechanism of antidepressant drugs (Shu et al. 2019). Likewise, amitriptyline facilitated autophagosome formation and increased LC3-II levels in primary astrocytes (Zschocke et al. 2011).

Thus, beyond the capacity of autophagy machinery to induce the clearance of aggregate-prone proteins and damaged organelles in multiple CNS cells, these proteins also modulate immunity and inflammation, the refinement of synaptic connections, and γ -neuroplasticity. Therefore, autophagy can play an essential role in stress-related conditions like psychiatric disorders, which have neuroinflammation, oxidative stress, and neuroplasticity changes as major contributors to disease progression.

2. Autophagy in psychiatric disorders: towards a mechanistic interpretation

2.1. Preclinical evidence

There are several animal models used to study psychiatric disorders. They are mostly based on acute and chronic stress exposure, early-life or gestational stress, pharmacological or surgical interventions, and models associated with metabolic or neurodegenerative comorbidities. These models are designed to mimic different and heterogeneous aspects of the etiology of psychiatric disorders. Table 1 presents 34 pre-clinical studies that evaluate the role of proteins related to autophagy in different animal models that induce behavioral alterations. It is important to highlight that several preclinical studies evaluated signaling pathways controlling autophagy and depressive-like, anhedonic (Abelaira et al. 2014; Pilar-Cúellar et al. 2014) and manic-like behavior (Yu et al. 2010; Valvassori et al. 2017). However, this review is focused on changes in direct autophagy markers in the different rodent models. We first analyzed models wherein the stressor was applied during the gestational or early postnatal period, but the behavioral and autophagic changes were assessed during adulthood. When the stressor was applied during the gestational period, behavioral alterations were accompanied by changes in the hippocampus (HC), including increased levels of Beclin-1, ATG7, LC3II/LC3I and increased volume of the autolysosomes (Zhang et al. 2017). On the other hand, early in the post-natal development, maternal separation stress increased levels of Beclin-1 and LC3II/LC3I in the HC and decreased in the prefrontal cortex (PFC) (Liu et al. 2018).

Different pharmacological models were also used to evaluate the role of autophagy in depressive-like phenotype. The chronic treatment

of rodents with the glucocorticoid corticosterone is used to mimic behavior alterations resembling dysfunctions observed in depressed patients (Johnson et al. 2006; Zhao et al. 2008; Rosa et al. 2014). Zhang et al. (2017) showed that subcutaneous administration of corticosterone for 20 days induced anhedonia and increased the levels of autophagy markers in the HC of male rats. In contrast, another work showed that in female and male mice treated with corticosterone for 15 days in the drinking water, the behavioral alterations were associated with decreased formation of autophagosomes and autolysosomes and lower levels of autophagy proteins in the HC (Gulbins et al. 2018).

It is known that exposure to the bacterial endotoxin lipopolysaccharide (LPS) induces neuroinflammation and triggers anhedonia, depressive and anxiety-like behaviors in rodents (O'Connor et al. 2009; Wang et al. 2014b; Li et al. 2017). Acute administration of LPS (1 mg/kg) was sufficient to promote depressive-like behavior but did not change autophagy markers in the HC of male mice (Chen et al. 2019). However, in female CD300f knockout mice, the administration of a higher dose of LPS (2 mg/kg) induced a pronounced anhedonic-like behavior compared to wild-type mice and differential expression of 23 genes of the autophagy pathway microglial cells. These results suggest that specific microglial autophagy changes might underlie behavioral alterations in mice lacking the anti-inflammatory immunoreceptor CD300f (Lago et al. 2020). When rats received repeated injections of LPS, Jiang et al. (2017) observed low levels of Beclin-1 and LC3II/LC3I in the HC. Ali et al. (2019) also showed that chronic LPS administration for five days reduced autophagy proteins in the HC and cortex of mice. Similar results were found by Ghosh et al. (2020) in mice exposed to LPS twice a week for three weeks. Together, these results suggest that the administration of repeated doses of LPS impairs autophagy. In contrast, the study of Wang et al. (2019b) showed that chronic treatment with LPS increased the number of autolysosomes and the levels of Beclin-1 and LC3II/I in the HC.

Shih et al. (2019) studied the effects of repeated treatment with 3,4-methylenedioxymethamphetamine (MDMA), the recreational drug known as Ecstasy, in autophagy machinery and behavior of male rats. They showed that MDMA administration increased the levels of LC3-II from the third dose on and reached a plateau on the serotonergic (5-HT) neurons from the dorsal raphe nucleus. Moreover, rats displayed depressive-like behavior in the FST. Interestingly, the treatment with 3-methyladenine, an autophagy inhibitor, reduced LC3-II levels, and ameliorated the depressive-like behavior.

Psychiatric disorders often occur associated with other diseases, such as neurodegenerative and metabolic diseases (Penninx and Lange 2018). Gao et al. (2019) showed that obese mice developed depressive and anxiety-like behaviors and had higher levels of autophagy markers in the HC. In another study, mice submitted to a high-fat diet and treated with streptozotocin, to induce diabetes, developed depressive-like behavior and had a decrease of Beclin-1 in the HC (Guan et al. 2016). However, in this last study, the authors did not observe alterations in other proteins, such as LC3II/I and p62, that are commonly altered when autophagy is impaired.

In rats, the central injection of A β oligomers causes neurotoxicity and memory deficits that resemble Alzheimer's Disease pathology. Besides, this model can induce anxiety and depressive-like behaviors with an associated increase in the LC3II/I and ATG12-ATG5 complex in the HC (Zare et al. 2015; Song et al. 2017). These data suggest that autophagy enhancement occurs shortly after A β injection. However, it is still unclear if autophagy activation plays a neuroprotective role or contributes to the behavior and molecular alterations observed in the A β model.

In the surgical models, rats with a hormone deficiency, induced by bilateral ovariectomy to mimic menopause, displayed anhedonia, depressive and anxiety-like behaviors, and impaired spatial memory. In these rats, it was observed increased levels of ATG5, Beclin-1, LC3 total, and LC3II on the HC and amygdala, as well as increased ATG7 levels in the HC and PFC, suggesting an enhancement of autophagy (Fang et al.

Table 1. Preclinical findings associating changes in autophagy-related mechanisms in animal models of mood disorders.

	Animal Model	Species -Strain/ Sex	Experimental Protocols	Behavioral Alterations	Stress Effect in Autophagy Markers	Treatment	Authors
Early-life or Gestational Stress	Maternal Separation	Male Wistar rats (offspring)	The offspring was separated from the mother for 6 h daily, from postnatal day 7 to 21.	Anxiety-like behavior in the EPM and OFT; Depressive-like behavior in the FST.	Beclin-1 and LC3II/LC3I decreased in the HC; Beclin-1 and LC3II/LC3I increased in the PFC.	No.	Liu et al., 2018
	Prenatal Restraint Stress	Male Wistar rats (offspring)	Pregnant rats were restraint stressed three times daily (45 min each time with interval) from gestational day 15 to 21.	Anhedonia in the SPT; Anxiety-like behavior in the OFT and EPM; Impaired spatial memory in the MWM.	Beclin-1, ATG7, LC3II/LC3I increased in the HC; Increased volume of autolysosome in the HC CA1 region.	No.	Zhang et al., 2017
Pharmacological Models	Corticosterone treatment	Male Wistar rats	Corticosterone (40 mg/kg, s.c.) for 20 days.	Anhedonia in the SPT.	Beclin-1, ATG7, LC3II/LC3I increased in the HC.	Chloroquine (20 mg/kg, i.p.) for 20 days.	Zhang et al., 2017
		Male e female C57BL/6 mice	Corticosterone was given in drinking water at 0.25 mg/mL for 15 days.	Increased latency to feeding in the NSF; Anxiety-like behavior in the OFT; Decreased time outside the box in the light/dark box test; Anhedonia in the splash test.	Decreased formation of autophagosomes and autophalysosomes in the HC; p-ULK, p-beclin-1, PI3-K/Vps34 and p62 decreased in the HC.	Amitriptyline or fluoxetine was given in drinking water (120 mg/L) for 5 or 12 days. D609 (inhibitor of sphingomyelin synthases) was given in drinking water (500 mg/L) for 3 days.	Gulbins et al., 2018
	Acute Lipopolysaccharide (LPS) treatment	Male C57BL/6 mice	LPS (1 mg/kg, i.p.) was injected 24 h before the behavioral experiments.	Depressive-like behavior in the FST and TST.	Beclin-1 and LC3II did not change in the HC of LPS mice when compared with the control group.	Alkaloids from lotus plumule (200 mg/kg, p.o.) or higenamine (50 mg/kg, p.o.) for 3 days.	Chen et al., 2019
		Female C57BL/6 wild-type and CD300f knockout.	LPS (2 mg/kg, i.p.) was injected 16 h before the RNA harvesting from microglia.	Anhedonic behavior in the sucrose splash test.	Sorted brain microglial cells of CD300f knockout mice differentially expresses 23 autophagy-related genes.	No.	Lago et al., 2020
Associated with comorbidities	Chronic LPS treatment	Male Sprague-Dawley rats	LPS (500 µg/kg, i.p) was injected every 2 days for a total of seven injections.	Anhedonia in the SPT; Depressive and anxiety-like behavior in the FST and EPM, respectively.	Beclin-1 and LC3II/LC3I decreased in the HC.	Salvianolic acid B (20 mg/kg, i.p.) for 2 weeks.	Jiang et al., 2017
		Male Swiss mice	LPS (100 µg/kg, i.p.) was injected twice weekly for three weeks.	Anhedonia in the SPT; Depressive-like behavior in the FST and TST.	Beclin-1 and p62 decreased in the HC; Acidic vesicles decreased in the HC.	Fluoxetine (20 mg/kg) given in drinking water for 21 days.	Ghosh et al., 2020
	MDMA treatment	Male Wistar rats	LPS (0.5 mg/kg, i.p.) was injected every day for 10 days.	Anhedonia in the SPT and depressive-like behavior in FST.	Beclin-1 and LC3II/LC3I increased and Akt decreased in the HC; Autolysosomes increased in the hippocampal CA1 region.	Fluoxetine (40 mg/kg, i.p.) for 10 days.	Wang et al., 2019b
Surgical models	High-fat diet/ Streptozotocin treatment	Male Sprague-Dawley rats	Rats were injected with MDMA (10 mg/kg, s.c.) twice a day for 4 days.	Depressive-like behavior in the FST.	MDMA increased levels of LC3-II in 5-HT neurons in the dorsal raphe nucleus.	3-methyladenine (15 mg/kg, i.p.) twice a day for four days.	Shih et al., 2019
		Male C57BL/6 mice	Mice received high-fat diet for 12 weeks. After that, streptozotocin (45 mg/kg, i.p.) was injected for 2 weeks.	Depressive-like behavior in the FST and TST; Reduction in the fear conditioning memory ability; Impairment in learning and spatial memory in the MWM.	Beclin-1 decreased in the HC.	No.	Guan et al., 2016
	High-fat diet	Male C57BL/6 mice	Mice received high-fat diet for 15 weeks.	Anhedonia in the SPT; Depressive and anxiety-like behaviors in the TST and OFT, respectively.	Beclin-1, LC3 e ATG5 increased in the HC.	Allicin (50, 100, 200 mg/kg, v.o.) for 15 weeks.	Gao et al., 2019
Surgical models	Aβ1-42 administration	Male Sprague-Dawley rats	Rats received an injection of Aβ oligomers (10 µg/rat) into the hippocampal CA1 region.	Depressive-like behavior in the TST and FST; Anxiety-like behavior in the EPM.	LC3II/LC3I increased in the HC.	Silibinin (25, 50, 100 mg/kg, v.o.) or donepezil (1 mg/kg, v.o.) for 15 days after Aβ injection.	Song et al., 2017
		Male Wistar rats	Rats received a bilateral injection of Aβ oligomers (10 ng/µl) into the hippocampal CA1 region.	Depressive and anxiety-like behavior in the FST and EPM, respectively.	LC3II/LC3I, ATG12-ATG5 complex increased in the HC.	Geldanamycin (1 or 2 µg/kg, i.c.v) 24 h before Aβ injection.	Zare et al., 2015
Surgical models	Surgical menopause	Female Sprague-Dawley rats	Rats had an estrogen deficit induced by bilateral ovariectomy.	Anhedonia in the SPT; Depressive and anxiety-like behavior in the FST and OFT, respectively; Impaired spatial memory in the MWM.	Increased of ATG5, LC3 total, LC3II and Beclin-1 in the HC and AMY; Increased ATG7 in the PFC and HC; Decreased pAkt in the HC and AMY.	No.	Fang et al., 2018
	Bilateral olfactory bulbectomy	Male Sprague-Dawley rats	Rats were subjected to Bilateral olfactory bulbectomy.	Higher score in the HET (Hyperemotionality Test);	Beclin-1, LC3II and p-AMPK/AMPK decreased in the HC;	Fluoxetine (10 mg/kg, p.o.) for 30 days.	Zhou et al., 2019

			Impaired spatial memory in the MWM.	p62, p-Akt/Akt, p-mTOR/mTOR and p-ULK1/ULK1 increased in the HC.		
Single-prolonged Stress (SPS)	Male Wistar rats	Rats were subjected to restrain, forced swim and ether anesthesia on the same day.	Impairment in learning ability and spatial memory in the MWM.	Beclin-1 and LC3 levels decreased at 1 day after SPS and increased from 4 to 14 days after SPS in the mPFC; p62 levels increased at 1 day after SPS and decreased from 4 to 14 days after SPS in the mPFC..	No.	Zheng et al., 2017
	Male Sprague -Dawley rats	Rats were subjected to restrain, forced swim, ether anesthesia and foot electric shocks on the same day.	Enhanced freezing behavior in the contextual fear conditioning test.	Beclin-1 and LC3II/LC3I increased in the HC.	SR57227 (selective 5-HT ₃ agonist; 0.5 μM or 2 μM/ Hemisphere.	Wu et al., 2016
	Male ICR mice	Mice were subjected to inescapable e-shock (60 times a day, 0.30 mA, 15 s duration shock, interval of 45 s) for 3 days.	Increased escape failures and latency to escape in the shuttle box test; Increased latency to feed in the NSF; Depressive-like behavior in the FST.	Beclin-1 decreased in the mesencephalon.	Fluoxetine (10 mg/kg, v.o.) for 2 weeks.	Li et al., 2016
Learned Helplessness (LH)						
Chronic restraint stress	Male BALB/c mice	Mice were restrained for 6 h/day for 21 days.	Anhedonia in the SPT; Depressive-like behavior in the TST and FST.	LC3II/LC3I, ULK1 317/ULK1 and p-AMPK/AMPK decreased in the HC; Increased p62 and p-mTOR/mTOR in the HC.	Apigenin (20, 40 and 60 mg/kg) orally.	Zhang et al., 2019
	Male Sprague-Dawley rats	Rats received one random stressor daily for 4 weeks.	Anhedonia in the SPT and anxiety-like behavior in the OFT.	Beclin-1 and LC3II decreased in the HC.	Fluoxetine (10 mg/kg, p.o.) for 3 weeks; or miR-16 bilaterally injected to the raphe nucleus.	Yang et al., 2017
	Male Sprague-Dawley rats	Rats received two or three random stressors daily for 6 weeks.	Anhedonia in the SPT; Depressive and anxiety-like behaviors in the FST and OFT, respectively.	Beclin-1 and LC3II/LC3I increased in the HC.	Fluoxetine (10 mg/kg, p.o.) for 4 weeks; or Bafilomycin A1 (10, 25, 50 or 100 mg/kg, p.o.) for 4 weeks.	Wang et al., 2018c
Chronic Unpredictable Mild Stress (CUMS)	Male Wistar rats	Rats received one random stressor daily for 5 weeks.	Anhedonia in the SPT and depressive-like behavior in FST.	LC3II/LC3I and AMPK increased and p62 and mTOR decreased in the HC; Autolysosomes increased in the hippocampal CA1 region.	Fluoxetine (40 mg/kg, i.p.) for 5 weeks.	Wang et al., 2019b
	Male Swiss mice	Mice received one stressor daily for 21 days.	Depressive-like behavior in the FST and TST; Impairment in learning and spatial memory in MWM; Impairment in associative memory in PA task; Hypolocomotion in the OFT.	ATG5 e ATG7 decreased in the HC.	Rosiglitazone (5 mg/kg, p.o.) for 21 days.	Patel et al., 2016
	Female BALB/c mice	Mice received one random stressor daily for 3 weeks.	Anhedonia in the SPT; Increased latency to feeding and decreased food intake in the NSF; Depressive-like behavior in the FST and TST; Anxiety-like behavior in the OFT.	ULK1, p-AMPK, LC3II decreased and p62, p-mTOR/mTOR increased in the HC and PFC.	α-tocopherol (50 or 75 mg/kg, p.o.) ou (fluoxetine 25 mg/kg, p.o.) for 2 weeks.	Huang et al., 2018
	Male C57BL/6 mice	Mice received two or three random stressors daily for 12 weeks.	Anhedonia in the SPT; Depressive and anxiety-like behavior in the FST and OFT, respectively.	Beclin-1, LC3II/LC3I, ULK1, p-AMPK/AMPK decreased and p62 increased in the PFC; LC3B-labeled neurons decreased in the PFC.	Fluoxetine (10 mg/kg, i.p.) or Rosiglitazone (5 mg/kg, i.p.) for 6 weeks.	Zhao et al., 2017
	Male C57BL/6 mice	Mice were subjected to random mild stressors twice per day for 5 weeks.	Anhedonia in the SPT; Depressive-like behavior in the FST and TST.	LC3II/LC3I and p62 increased in the HC.	Fluoxetine (10 mg/kg, i.p.) for 4 weeks.	Shu et al., 2019
	Male C57BL/6 mice	Mice were subjected to random mild stressors for 4 weeks.	Anhedonia in the SPT; Depressive and anxiety-like behaviors in the FST, TST, OFT and EPM.	Beclin-1 and LC3II increased in the HC.	Nicotine (0.2 mg/kg, i.p.) for 28 days.	Xiao et al., 2018
	Male C57BL/6 mice	Mice were subjected to two random mild stressors daily for 6 weeks.	Anhedonia in the SPT; Depressive-like behavior in the FST and TST; Anxiety-like behavior in the OFT.	Beclin-1 and LC3II decreased in the HC.	Lexapro (1 mg/kg) Modified Xiaoyao San (23 mg/kg).	Wang et al., 2019a
	Male C57BL/6 mice	Mice were subjected to one random mild stressors daily for 4 weeks.	Anhedonia in the SPT; Depressive-like behavior in the FST and TST; Decreased of short-term memory in the YM.	Beclin-1 decreased in the PFC.	Fluoxetine (20 mg/kg) or Andrographolide (2.5 or 5 mg/kg) for 2 weeks.	Geng et al., 2019
	Male C57BL/6 mice	Mice were subjected to random mild stressors daily for 4 weeks.	Anhedonia in the SPT and NST; Depressive-like behavior in the FST and TST.	mRNA from ATG13 decreased and increased of its miRNA (mmu-miR-206-3p) in the NAc.	No.	Ma et al., 2019

	Female C57BL/6 WT and microglia-specific autophagy-deficient mice	Pregnant mice were subjected to stressors from embryonic day 7 to 16.	Anhedonia in the SPT, depressive and anxiety-like behaviors in the FST and OFT, respectively in both strains.	The levels of Beclin-1, ATG5 and LC3II did not change in the HC when compared mice subjected to CUMS with the control mice in both strains.	Fluoxetine (18 mg/kg) from postnatal day 7 to 28.	Tan et al., 2018
Social Defeat	Male C57BL/6 mice	Mice were defeated for 21 days.	Reduced social behavior in the social avoidance test.	The levels of Beclin-1, ATG12, LC3II/LC3I, pAkt/Akt did not change in the HC when compared controls without stress and social defeated mice.	Paroxetine (20 mg/kg) given in the drinking water for 3 weeks.	Gassen et al., 2014

AMY, amygdala; EPM, elevated plus maze; FST, forced swim test; HC, hippocampus; i.c.v., intracerebroventricular; i.p., intraperitoneal; MWM, Morris water maze; NAc, nucleus accumbens; NSF, novelty-suppressed feeding; OFT, open field test; p.o., oral administration; PA task: passive avoidance step-through task; PFC, prefrontal cortex; SPT, sucrose preference test; TST, tail suspension test; YM, Y maze.

2018). Similarly, rats with the olfactory bulb removed had impaired spatial memory and displayed hyperemotionality, a symptom related to depressed patients with psychomotor agitation. However, this model was associated with lower levels of Beclin-1, LC3II, and p-AMPK/AMPK and higher levels of p62, p-Akt/Akt, p-mTOR/mTOR, and p-ULK1/ULK1 in the HC, suggesting a reduction in autophagy activation. Interestingly, treatment with fluoxetine reverted the hyperemotionality and the changes in autophagy-related proteins but not the memory impairment (Zhou et al. 2019).

Several works used different approaches to study the effect of acute or repeated stressful stimuli in autophagy. The single prolonged stress (SPS) is a well-established model to mimic post-traumatic stress disorder (PTSD) in rodents (Yamamoto et al. 2009; Xiang et al. 2019). Wu et al. (2017) found that rats exposed to SPS had increased freezing response and Beclin-1 and LC3II/LC3I levels in the HC. Low levels of Beclin-1 and LC3 and high levels of p62 were observed in the medial prefrontal cortex of rats after one day of SPS. However, the levels of Beclin-1 and LC3 increased, and the levels of p62 decreased after 4 and 7 days of stress exposure (Zheng et al. 2017). Li et al. (2016) observed that mice submitted to the learned helplessness model had a reduction of Beclin-1 in the mesencephalon.

The models that applied chronic stressors to evaluate the relationship between autophagy and behavioral alterations associated with psychiatric disorders were the most used. The chronic unpredictable mild stress (CUMS) is a validated and well-characterized model used to induce symptoms that resemble human depression (Willner 1997, 2005). When autophagy-related proteins were evaluated in the PFC of C57BL/6 male mice exposed to CUMS, it was observed an increase of p62 and a decrease in Beclin-1, LC3II/LC3I, ULK1, AMPK levels and in the number of LC3-labeled neurons (Zhao et al. 2017; Geng et al. 2019). Amin et al. (2020) found a decrease in Beclin-1 and ATG5 levels in the cortex of ovariectomized C57BL/6 mice exposed to CUMS. Similar results were found in a study conducted on BALB/c female mice (Huang et al. 2018). On the other hand, the effect of CUMS in autophagy markers in the HC is less clear. Some studies showed that CUMS was able to cause a reduction of autophagy proteins in the HC of male rats (Yang et al. 2017), ovariectomized female (Amin et al. 2020) and male mice from different strains (Patel et al. 2016; Wang et al., 2019a). Interestingly, Ma et al. (2019) observed a decrease of ATG13 mRNA and an increase of its miRNA mmu-miR-206-3p in the nucleus accumbens after CUMS exposure, suggesting that the miRNA system can regulate autophagy in this encephalic region.

Oppositely, studies that evaluated changes in the HC using similar CUMS protocols observed an increase in autophagy markers in male mice (Shu et al. 2019; Xiao et al. 2018) and rats (Wang et al. 2018b; Wang et al., 2019b). Intriguingly, when the CUMS was applied on pregnant C57BL/6 wildtype and microglia-specific autophagy-deficient mice, to mimic postpartum depression, no changes in the levels of autophagy-related proteins were observed (Tan et al. 2018). The mixed observations regarding the role of autophagy after chronic stress were found mainly in the HC and may be due to regional differences, distinctions in stress protocols, and time between the stress exposure and euthanasia.

In the chronic restraint stress model, Zhang et al. (2019) showed that stressed mice had a decrease of ULK1, AMPK, and LC3II/LC3I and an increase in p62 and p-mTOR levels in the HC, suggesting a reduction of autophagy activation. The social defeat model is based on the natural conflict between male rodents triggered by the territorial dispute (Hammels et al. 2015). This model can induce anhedonia, social avoidance, depressive and anxiety-like behaviors. Therefore, it is a useful model to study mood disorders (Avgustinovich et al. 2005; Golden et al. 2011; Hammamieh et al. 2012; Liu et al. 2017). However, only one study evaluated the role of autophagy-related proteins in this model, and no changes were observed in autophagy markers in the HC after social stress (Gassen et al. 2014).

Most preclinical studies evaluated autophagy by measuring well known autophagic markers by immunoblotting or immunohistochemistry. LC3-II evaluation was widely used to measure the number of phagophores/autophagosomes/autolysosomes. Nonetheless, it is essential to highlight that LC3-II amount may not reflect autophagy activity, since LC3-II can be increased by autophagy activation or inhibition of autophagosome turnover (Yoshii and Mizushima 2017). Therefore, one of the main limitations of rodent studies is the lack of complementary assays to precisely evaluate the autophagy flux.

The best way to assess autophagy flux is by combining methods that measure the increase of LC3-II and/or the number of autophagosomes, and components involved in the subsequent steps of the autophagy pathway, including lysosomes and release of breakdown products (Klionsky et al. 2016). It is increasingly recognized that there is considerable redundancy of autophagic proteins. Thus, it is also interesting to evaluate several proteins involved in different steps of this pathway, such as autophagy regulators (mTOR, Akt, and AMPK), initiators/ elongators (ULK1, Vps34-Beclin-1, ATG12, ATG5) and products of autophagosome/autolysosome degradation (p62). Other useful tools are autophagy inducers or inhibitors, such as rapamycin, chloroquine, and 3-methyladenine. Most of these compounds are not selective and act on different intracellular pathways. However, they can be essential to establish causality between the biochemical mechanisms and behavioral evidence or antidepressant effects, as observed by Zhang et al. (2017), Shih et al. (2019), and Ali et al. (2020).

Additionally, several genetically modified animals can be used to evaluate autophagy *in vivo*. ATG gene knockout mice have contributed to understanding the physiological/pathological roles of autophagy (Kuma et al. 2017). The use of transgenic mice can be fundamental to establish the role of autophagy in specific cell types and to establish causality between the biochemical and behavioral phenomena, as observed by Tan et al. (2018) and Wang et al. (2019a). Furthermore, transgenic mice expressing probes or fluorescent autophagy-related proteins for monitoring and/or measuring autophagy flux are useful tools (Loos et al. 2014; Kaizuka et al. 2016).

2.2. Clinical evidence

From the clinical point of view, data associating autophagy mechanisms and psychiatric disorders are scarce, with only seven studies. Moreover, some studies analyzed regulatory pathways associated with autophagy and not the autophagy machinery (Table 2). In patients with Major Depressive Disorder (MDD), the mRNA expression of autophagy proteins LC3, ATG12, and Beclin-1 was increased in peripheral blood mononuclear cells (PBMCs), when compared to controls (Alcocer-Gómez et al. 2017a). On the other hand, decreased protein and mRNA levels of LC3 and p62 were found in PBMCs of patients with Bipolar Disorder (BD), and a negative correlation was found between autophagic proteins and symptoms of depression and mania (Scaini et al. 2019).

Despite these initial studies, composed mainly by women, other studies focused on the role of autophagy in the treatment response. Gassen et al. (2014) showed that baseline Beclin-1 expression was positively correlated, and pAkt/Akt expression was negatively correlated with treatment response. The Akt-dependent phosphorylation of Beclin-1 can shift Beclin-1's action from autophagy to apoptosis (Wang et al. 2013). Thus, these results suggest that the enhancement of autophagy is associated with better treatment response. Alcocer-Gómez et al. (2017b) further reinforced this idea by showing that at least Beclin-1 and LC3 are increased in patients undergoing successful treatment with antidepressants from different classes, compared to non-treated individuals. On the other hand, the work from He et al. (2019) showed that higher baseline levels of Beclin-1 were associated with poor treatment response to antidepressants. Thus, it is possible to speculate that not all MDD patients have dysfunction in autophagy-related mechanisms. However, when this dysfunction occurs, successful

antidepressant treatment can enhance autophagic protein, at least in peripheral cells.

Clinical studies also evaluated signaling proteins involved in autophagy regulation. Jernigan et al. (2011) found reduced mRNA expression of mTOR and its core downstream signaling targets in *post-mortem* PFC of 12 depressed subjects compared to 12 controls. Machado-Vieira et al. (2015) found reduced baseline mRNA expression of the Akt and mTOR in the blood of 25 unmedicated BD individuals during a depressive episode versus controls. Additionally, changes in Akt expression after 6 weeks of lithium treatment were positively correlated with depression improvement.

The clinical studies conducted so far have several limitations associated with the clinical heterogeneity of psychiatric disorders, including small sample sizes, use of different psychiatric medications, lack of data on comorbidities, eating habits, and absence of a balanced evaluation in men and women.

Epidemiological data indicate that psychiatric conditions, such as MDD, PTSD, and anxiety disorders, are more prevalent in women (World Health Organization, 2017). Still, it is essential to use sex as a variable in the clinical studies and search for different biological mechanisms that can underlie behavioral alteration in males and females (Labonté et al. 2017; Hodes et al. 2017). Finally, the variability observed can be attributed to the different stages at which autophagy can be disrupted, or to the autophagic functions on different target proteins.

Despite the impact of peripheral alterations in the CNS and the etiology and progression of psychiatric disorders, how these changes in peripheral autophagy correlate with this pathway in CNS cells still needs to be explored. Combined with the clinical evaluation, the comprehension of these peripheral markers could lead to a more effective delineation of disease subtypes, selection of medications, and assessment of treatment-efficacy and treatment-resistance in patients.

2.3. Findings interpretation

In this review, we summarized the current knowledge regarding the involvement of the autophagy pathway in animal models associated with alterations in emotional behavior and changes found in patients with psychiatric disorders (Figure 2). It became evident that these disorders are highly heterogeneous entities, and treatment efficacy depends not only on the clinical symptoms but also on the biological mechanisms involved. Besides, the animal models used to study the mechanisms underlying these conditions have several limitations related to the required anthropomorphic projection of complex human traits, such as the emotional symptoms. In this sense, compiling all available evidence is essential to analyze possible divergencies between human and rodent models and trace new perspectives for the elaboration of future research. Although the impact of antidepressant on autophagy is explored in the literature, the role of this pathway as a protective or detrimental mechanism in psychiatric outcomes have not been largely developed so far. There are many preclinical studies using different stress models, pharmacological, and surgical paradigms to induce behavioral alterations associated with psychiatric disorders. Most of these studies focused on autophagy alterations in the hippocampus and prefrontal cortex, applying techniques incapable of discriminating against different cell populations or even the different stages of the autophagic flux.

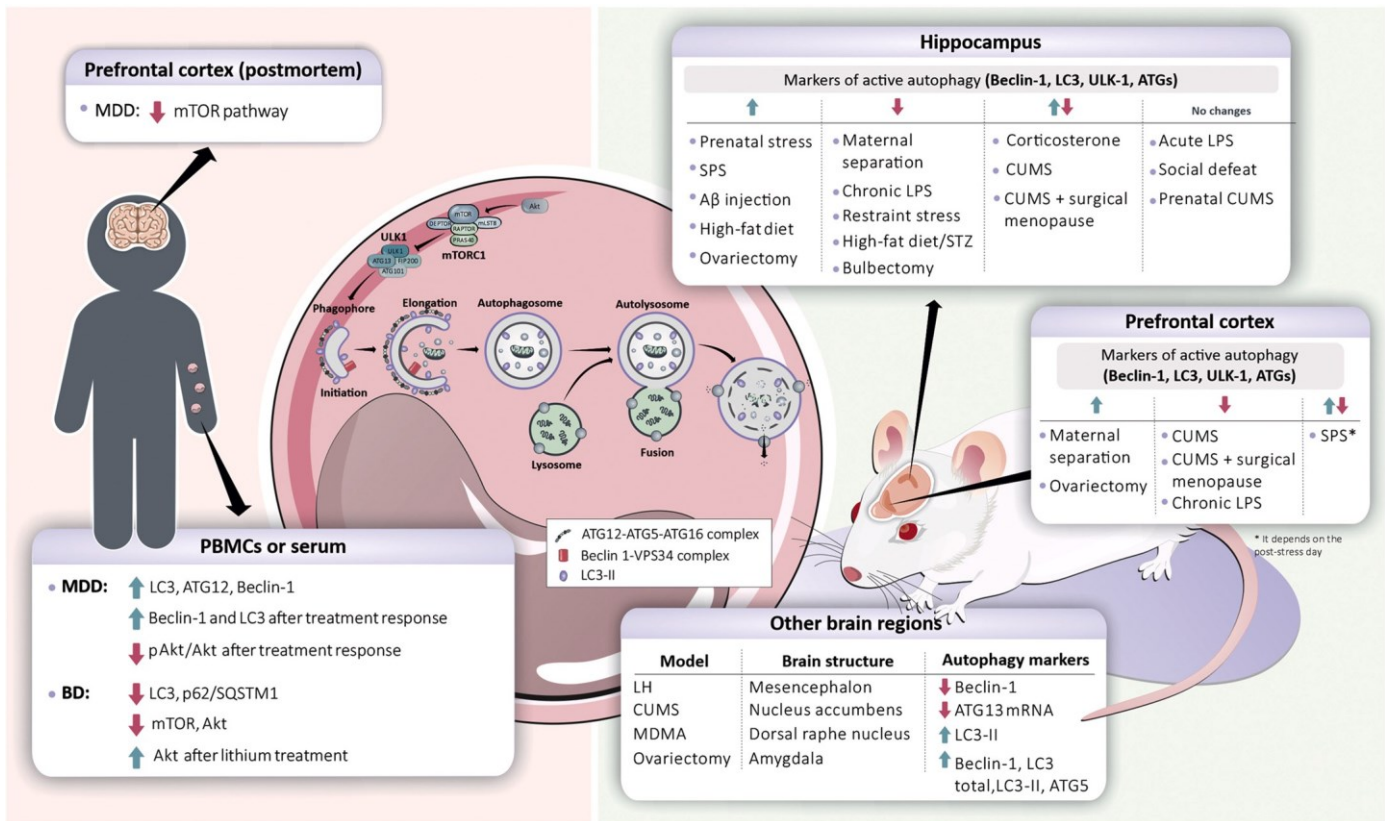
In this sense, results heterogeneity is probably related to differences in protocols and in the time course between the end of the paradigm and the euthanasia. The autophagic flux is fast and dynamic, and observations at a single timepoint may be challenging to compare. The use of pharmacological compounds or classical antidepressants to restore the behavioral alterations and the impact on autophagy-related proteins is limited by their low selectivity and multiple cellular targets. On the other hand, Tan et al. (2018) specifically knocked out *atg5* in the

Table 2. Clinical findings associating changes in autophagy-related mechanisms in mood disorders.

Population /Diagnosis	Sex	Mean age (years)	Treatment	Instrument	Biological sample	Major findings	Authors
45 MDD patients in depressive episode and 6 patients with BD in depressive episode	26 women 25 men	49 ± 14.7	6 weeks with antidepressants	HDRS	Blood (PBMC)	Positive correlation between Beclin-1 protein levels and treatment response; Negative correlation between treatment response and pAkt/Akt protein levels.	Gassen et al., 2014
40 MDD patients and 20 controls	All women	controls: 49.5 ± 6.1 patients: 46.1 ± 8	No	SCID-IV, BDI, and SCL-90-R	Blood (PBMC)	Increased LC3, ATG12 and Beclin-1 mRNA in MDD patients.	Alcocer-Gómez et al., 2017a
20 MDD patients without treatment and 194 MDD with antidepressant treatment recruited after a depressive episode	179 women 55 men	controls: 45.5 ± 6.1 patients: 46.1 ± 8	Minimum of 6 months of fluoxetine, paroxetine, mianserin, mirtazapine, venlafaxine, desvenlafaxine, amitriptyline, imipramine or agomelatine	SCID-IV	Blood (PBMC)	Beclin-1 and LC3 mRNA were increased in MDD patients treated with antidepressants versus untreated patients.	Alcocer-Gómez et al., 2017b
40 MDD patients	25 women 15 men	36.75 ± 13	8 weeks with paroxetine, venlafaxine or duloxetine	HDRS	Blood (serum)	Higher baseline serum levels of Beclin-1 predict poor treatment response; Increased serum levels of Beclin-1 were observed in the responsive patients after the treatment.	He et al., 2019
31 BD patients and 25 controls	42 women 14 men	controls: 37.04 ± 10.2 patients: 36.90 ± 11.9	Treatment with antipsychotics, anticonvulsants, mood stabilizers and/or antidepressants	MINI, MADRS, YMRS, GAF, FAST	Blood (PBMC)	Decreased LC3 and p62 mRNA and protein levels in BD patients; Negative correlation between autophagic proteins and symptoms of depression and mania.	Scaini et al., 2018
25 BD patients in current depressive episode and 31 controls	34 women 22 men	controls: 27.657 ± 6.0 patients: 28.447 ± 5.6	Evaluation at baseline and after 6 weeks of lithium	DSM-IV-TR criteria, HDRS	Blood	Reduced baseline mRNA expression of the Akt and mTOR in unmedicated BD individuals during depressive episode; Changes in Akt expression after 6 weeks of lithium treatment were positively correlated with depression improvement.	Machado-Vieira et al. 2015
12 MDD patients and 12 controls	4 women 20 men	controls: 51 ± 3.8 patients: 55 ± 3.8	Medication history: sertraline (n=2); Fluoxetine (n=1); Paroxetine, fluoxetine and amitriptyline (n=1)	SADS-L, SCID-IV	PFC tissue	Reduced mTOR mRNA in the PFC of depressed subjects compared to controls.	Jernigan et al., 2011

BD, Bipolar Disorder; BDI, Beck Depression Inventory; DSM-IV, Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders; FAST, Functioning Assessment Short Test; GAF, Global Assessment of Functioning; HDRS, Hamilton Depression Rating Scale; MADRS, Montgomery-Åsberg Depression Rating Scale; MDD, Major Depressive Disorder; MINI, Mini-International Neuropsychiatric Interview; PBMC, peripheral blood mononuclear cell; SADS-L, Schedule for Affective Disorders and Schizophrenia: lifetime version; SCID, Structured Clinical Interview for DSM-IV Psychiatric Disorders; SCL-90-R: Symptom Distress Checklist; SNRI, serotonin-norepinephrine reuptake inhibitor; SSRI, selective serotonin reuptake inhibitor; YMRS, Young Mania Rating Scale.

Figure 2. Autophagy process and principal findings of clinical and preclinical studies



BD, Bipolar Disorder; CUMS, chronic unpredictable mild stress; LH, learned helplessness; LPS, lipopolysaccharide-induced depressive-like behavior; MDD, Major Depressive Disorders; MDMA, 3,4-methylenedioxymethamphetamine; PBMCs, peripheral blood mononuclear cells; SPS, single-prolonged stress; STZ, streptozotocin.

microglia cells of C57B6 mice, a strategy that failed to prevent the impact of chronic unpredictable mild stress during pregnancy on emotional behaviors. However, it is increasingly recognized that there is considerable redundancy of autophagic proteins, which must be considered when analyzing the results.

From the clinical point of view, the literature is scarce, the studies have small samples and fail to standardize many confounding factors, such as diagnosis instruments and comorbidities. Currently, at least in PBMCs, some of the major autophagy markers, like Beclin-1 and LC3, appear to be increased in patients with MDD and decreased in patients with BD. Autophagy regulators, such as mTOR, were also less expressed in peripheral cells of BD patients during a depressive episode and in the PFC of postmortem patients with MDD.

Most studies that investigated the effect of antidepressants on autophagy showed an increase in autophagy markers in response to the treatment (for review, see Rein 2019). In this sense, successful anti-depressant treatments were associated with an increase in autophagy in two studies. However, recent work showed that high baseline levels of Beclin-1 are associated with a poor symptom's remission after anti-depressant therapy. It highlights the heterogeneity in the biological mechanisms mediating these disorders and points to a possible new mechanism to access treatment-choice in patients. Another limitation observed in the studies available is the lack of proper evaluation of sex differences. Most clinical studies have a significantly higher number of female subjects, but only five pre-clinical studies were conducted in female rodents.

It is essential to emphasize that although autophagy is crucial to cellular homeostasis maintenance, the balance between beneficial and detrimental

effects of autophagy in immunity, inflammation, and metabolism may have different impacts in different cell types. Therefore, potential changes in signal transduction, activated in stress response or danger signals, might be informative measures of the cellular capacity to respond to disturbances as well as their following ability to recover after treatment. The variability observed between models can be accounted for by the stages at which autophagy is disrupted. Also, most of the autophagy-related targets have non-autophagy functions. Moreover, many other molecules may play a role in autophagy in different cell types, and identify them will be crucial for our understanding of autophagy in psychiatric disorders.

3. Conclusions and perspectives

As occurs in many neurodegenerative conditions, autophagy plays an important role in psychiatric disorders and treatment response. However, causality is hard to address, especially when dealing with complex and multifactorial disorders. Moreover, even when differences in autophagy are found, most studies are cross-sectional and incapable of concluding if the changes are part of the mechanisms causing the behavioral alterations or regulatory effects produced to counteract the impact of the disease. The experimental analyses of autophagy must be carefully addressed, and future studies should use techniques that enable the accurate measurement of the functional status of this dynamic process through time. Therefore, since there is no single method able to evaluate the autophagy flux thoroughly, we propose that future studies must combine different methodologies to better assess autophagy flux. To study psychiatric disorders, it is also essential to analyze specific cell autophagy and the downstream targets affecting neuronal communication and, ultimately, the behavioral outcomes.

Source of funding

CNPq-Brazil, CAPES

Disclosure and Funding

All the authors declare no conflict of interests. This study was supported by Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Ensino Superior (CAPES), and Fundação de Amparo à Pesquisa e Inovação do Estado de Santa Catarina (FAPESC). MPK is a CNPq Research Fellow. We thank Priscila Batista da Rosa for the illustration.

Declaration of Competing Interest

None declared

References

- World Health Organization, 2017. Depression and other common mental disorders: global health estimates. World Health. Organ 1–24 <https://doi.org/CC BY-NC-SA 3.0 IGO>.
- Abelaira, H.M., Réus, G.Z., Neotti, M.V., Quevedo, J., 2014. The role of mTOR in depression and antidepressant responses. *Life Sci.* 101 (1–2), 10–14 <https://doi.org/10.1016/j.lfs.2014.02.014>.
- Alcocer-Gómez, E., Casas-Barquero, N., Núñez-Vasco, J., Navarro-Pando, J.M., Bullón, P., 2017a. Psychological status in depressive patients correlates with metabolic gene expression. *CNS Neurosci. Ther.* 843–845 <https://doi.org/10.1111/cns.12755>.
- Alcocer-Gómez, E., Casas-Barquero, N., Williams, M.R., Romero-Guillena, S.L., Cañadas-Lozano, D., Bullón, P., Sánchez-Alcazar, J.A., Navarro-Pando, J.M., Cordero, M.D., 2017b. Antidepressants induce autophagy dependent-NLRP3-inflammasome inhibition in Major depressive disorder. *Pharmacol. Res.* 121, 114–121 <https://doi.org/10.1016/j.phrs.2017.04.028>.
- Ali, T., Rahman, S.U., Hao, Q., Li, W., Liu, Z., Ali Shah, F., Murtaza, I., Zhang, Z., Yang, X., Liu, G., Li, S., 2020. Melatonin prevents neuroinflammation and relieves depression by attenuating autophagy impairment through FOXO3a regulation. *J. Pineal Res.* 1–18 <https://doi.org/10.1111/jpi.12667>.
- Amin, N., Xie, S., Tan, X., Chen, Y., Ren, Q., 2020. Optimized integration of fluoxetine and 7,8-dihydroxy flavone as an efficient therapy for reversing depressive-like behavior in mice during the perimenopausal period. *Prog. Neuropsychopharmacol. Biol. Psychiatry* 101, 109939. <https://doi.org/10.1016/j.pnpbp.2020.109939>.
- Arakawa, S., Honda, S., Yamaguchi, H., Shimizu, S., 2017. Molecular mechanisms and physiological roles of Atg5/Atg7-independent alternative autophagy. *Proceedings of the Japan Academy. Series B, Physical and biological sciences* 93 (6), 378–385. <https://doi.org/10.2183/pjab.93.023>.
- Avgustinovich, D.F., Kovalenko, I.L., Kudryavtseva, N.N., 2005. A model of anxious depression: Persistence of behavioral pathology. *Neurosci. Behav. Physiol.* 35, 917–924. <https://doi.org/10.1007/s11055-005-0146-6>.
- Burman, C., Ktistakis, N.T., 2010. Autophagosome formation in mammalian cells. *Semin. Immunopathol.* 32, 397–413. <https://doi.org/10.1007/s00281-010-0222-z>.
- Chen, S., Guo, W., Qi, X., Zhou, J., Liu, Z., Cheng, Y., 2019. Natural alkaloids from *Lotus plumule* ameliorate lipopolysaccharide-induced depression-like behavior: Integrating network pharmacology and molecular mechanism evaluation. *Food Funct.* 10, 6062–6073. <https://doi.org/10.1039/c9fo01092k>.
- Dice, J.F., 1988. Microinjected ribonuclease A as a probe for lysosomal pathways of intracellular protein degradation. *J. Protein Chem.* 7 (2), 115–127. <https://doi.org/10.1007/BF01025241>.
- de Duve, C., 1963. The Lysosome Concept. pp. 1–35. <https://doi.org/10.1002/978047015314.ch1>.
- de Duve, C., Pressman, B.C., Gianetto, R., Wattiaux, R., Appelmans, F., 1955. Tissue fractionation studies. *Biochem. J.* 60, 604–617. <https://doi.org/10.1042/bj0600604>.
- Fang, Y.Y., Zeng, P., Qu, N., Ning, L.N., Chu, J., Zhang, T., Zhou, X.W., Tian, Q., 2018. Evidence of altered depression and dementia-related proteins in the brains of young rats after ovariectomy. *J. Neurochem.* 146, 703–721. <https://doi.org/10.1111/jnc.14537>.
- Ganley, I.G., Lam, D.H., Wang, J., Ding, X., Chen, S., Jiang, X., 2009. ULK1-ATG13-FIP200 complex mediates mTOR signaling and is essential for autophagy. *J. Biol. Chem.* 284, 12297–12305. <https://doi.org/10.1074/jbc.M900573200>.
- Gao, W., Wang, W., Zhang, J., Deng, P., Hu, J., Yang, J., Deng, Z., 2019. Allicin ameliorates obesity comorbid depressive-like behaviors: involvement of the oxidative stress, mitochondrial function, autophagy, insulin resistance and NOX/Nrf2 imbalance in mice. *Metab. Brain Dis.* 34, 1267–1280. <https://doi.org/10.1007/s11011-019-00443-y>.
- Gassen, N.C., Hartmann, J., Zschocke, J., Stephan, J., Hafner, K., Zellner, A., Kirmeier, T., Kollmannsberger, L., Wagner, K.V., Dedic, N., Balsevich, G., Deussing, J.M., Kloiber, S., Lucae, S., Holsboer, F., Eder, M., Uhr, M., Ising, M., Schmidt, M.V., Rein, T., 2014. Association of FKBP51 with Priming of Autophagy Pathways and Mediation of Antidepressant Treatment Response: Evidence in Cells, Mice, and Humans. *PLoS Med.* 11 <https://doi.org/10.1371/journal.pmed.1001755>.
- Geng, J., Klionsky, D.J., 2008. The Atg8 and Atg12 ubiquitin-like conjugation systems in macroautophagy. pp. 1–6. <https://doi.org/10.1038/embor.2008.163>.
- Geng, J., Liu, J., Yuan, X., Liu, W., Guo, W., 2019. Andrographolide triggers autophagy-mediated inflammation inhibition and attenuates chronic unpredictable mild stress (CUMS)-induced depressive-like behavior in mice. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 379, 114688. <https://doi.org/10.1016/j.taap.2019.114688>.
- Ghosh, S., Choudhury, S., Chowdhury, O., Mukherjee, S., Das, A., 2020. Inflammation-induced behavioral changes is driven by alterations in Nrf2-dependent apoptosis and autophagy in mouse hippocampus: Role of fluoxetine. *Cell. Signal.* 68, 109521. <https://doi.org/10.1016/j.cellsig.2019.109521>.
- Glatigny, M., Moriceau, S., Rivagorda, M., Ramos-Brossier, M., Nascimbeni, A.C., Lante, F., Shanley, M.R., Boudarene, N., Rousseau, A., Friedman, A.K., Settembre, C., Kuperwasser, N., Friedlander, G., Buisson, A., Morel, E., Codogno, P., Oury, F., 2019. Autophagy Is Required for Memory Formation and Reverses Age-Related Memory Decline. *Curr. Biol.* 29, 435–448.e8. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2018.12.021>.
- Golden, S.A., Covington, H.E., Berton, O., Russo, S.J., 2011. A standardized protocol for repeated social defeat stress in mice. *Nat. Protoc.* 6, 1183–1191. <https://doi.org/10.1038/nprot.2011.361>.
- Guan, Z.F., Zhou, X.L., Zhang, X.M., Zhang, Y., Wang, Y.M., Guo, Q.L., Ji, G., Wu, G.F., Wang, N.N., Yang, H., Yu, Z.Y., Zhou, H.G., Guo, J.C., Liu, Y.C., 2016. Beclin-1-mediated autophagy may be involved in the elderly cognitive and affective disorders in streptozotocin-induced diabetic mice. *Transl. Neurodegener.* 5, 1–10. <https://doi.org/10.1186/s40035-016-0070-4>.
- Gulbins, A., Schumacher, F., Becker, K.A., Wilker, B., Soddemann, M., Boldrin, F., Müller, C.P., Edwards, M.J., Goodman, M., Caldwell, C.C., Kleuser, B., Kornhuber, J., Szabo, I., Gulbins, E., 2018. Antidepressants act by inducing autophagy controlled by sphingomyelin-ceramide. *Mol. Psychiatry.* <https://doi.org/10.1038/s41380-018-0090-9>.
- Hammamieh, R., Chakraborty, N., De Lima, T.C.M., Meyerhoff, J., Gautam, A., Muhie, S., D'Arpa, P., Lumley, L., Carroll, E., Jett, M., 2012. Murine model of repeated exposures to conspecific trained aggressors simulates features of post-traumatic stress disorder. *Behav. Brain Res.* 235, 55–66. <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2012.07.022>.
- Hammels, C., Pishva, E., De Vry, J., van den Hove, D.L.A., Prickaerts, J., van Winkel, R., Selten, J.P., Lesch, K.P., Daskalakis, N.P., Steinbusch, H.W.M., van Os, J., Kenis, G., Rutten, B.P.F., 2015. Defeat stress in rodents: From behavior to molecules. *Neurosci. Biobehav. Rev.* 59, 111–140. <https://doi.org/10.1016/j.neubiorev.2015.10.006>.
- Hara, T., Nakamura, K., Matsui, M., Yamamoto, A., Nakahara, Y., Suzuki-migishima, R., Yokoyama, M., Mishima, K., Saito, I., Okano, H., 2006. Suppression of basal autophagy in neural cells causes neurodegenerative disease in mice. *Nature* 441, 885–889. <https://doi.org/10.1038/nature04724>.
- Hara, T., Takamura, A., Kishi, C., Iemura, S.I., Natsume, T., Guan, J.L., Mizushima, N., 2008. FIP200, a ULK-interacting protein, is required for autophagosome formation in mammalian cells. *J. Cell Biol.* 181, 497–510. <https://doi.org/10.1083/jcb.200712064>.
- He, S., Zeng, D., Xu, F., Zhang, J., Zhao, N., Wang, Q., Shi, J., Lin, Z., Yu, W., Li, H., 2019. Baseline Serum Levels of Beclin-1, but Not Inflammatory Factors, May Predict Antidepressant Treatment Response in Chinese Han Patients With MDD: A Preliminary Study. pp. 1–9. <https://doi.org/10.3389/fpsy.2019.00378>.
- Heras-Sandoval, D., Pérez-Rojas, J.M., Hernández-Damián, J., Pedraza-Chaverri, J., 2014. The role of PI3K/AKT/mTOR pathway in the modulation of autophagy and the clearance of protein aggregates in neurodegeneration. *Cell. Signal.* 26, 2694–2701. <https://doi.org/10.1016/j.cellsig.2014.08.019>.
- Hodes, G.E., Walker, D.M., Labonté, B., Nestler, E.J., Russo, S.J., 2017. Understanding the epigenetic basis of sex differences in depression. *J. Neuroscience Research* 95, 692–702. <https://doi.org/10.1002/jnr.23876>.
- Hosokawa, N., Sasaki, T., Iemura, S.I., Natsume, T., Hara, T., Mizushima, N., 2009. Atg101, a novel mammalian autophagy protein interacting with Atg13. *Autophagy* 5, 973–979. <https://doi.org/10.4161/autophagy.5.7.9296>.
- Houtman, J., Freitag, K., Gimber, N., Schmoranz, J., Heppner, F.L., Jendrach, M., 2019. Beclin-1-driven autophagy modulates the inflammatory response of microglia via NLRP3. *EMBO J.* 38, 1–15. <https://doi.org/10.15252/emboj.201899430>.
- Huang, X., Wu, H., Jiang, R., Sun, G., Shen, J., Ma, M., Ma, C., Zhang, S., Huang, Z., Wu, Q., Chen, G., Tao, W., 2018. The antidepressant effects of α-tocopherol are related to activation of autophagy via the AMPK/mTOR pathway. *Eur. J. Pharmacol.* 833, 1–7. <https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2018.05.020>.
- Ichimura, Y., Komatsu, M., 2010. Selective degradation of p62 by autophagy. *Semin. Immunopathol.* 32, 431–436. <https://doi.org/10.1007/s00281-010-0220-1>.
- Itakura, E., Mizushima, N., 2010. Characterization of autophagosome formation site by a hierarchical analysis of mammalian Atg proteins. *Autophagy* 6, 764–776. <https://doi.org/10.4161/autophagy.6.6.12709>.
- Jernigan, C.S., Goswami, D.B., Austin, M.C., Iyo, A.H., Chandran, A., Stockmeier, C.A., Karolewicz, B., 2011. The mTOR signaling pathway in the prefrontal cortex is compromised in major depressive disorder. *Prog. Neuro-Psychopharmacology Biol. Psychiatry* 35, 1774–1779. <https://doi.org/10.1016/j.pnpbp.2011.05.010>.
- Jiang, P., Guo, Y., Dang, R., Yang, M., Liao, D., Li, H., Sun, Z., Feng, Q., Xu, P., 2017. Salvianolic acid B protects against lipopolysaccharide-induced behavioral deficits and neuroinflammatory response: involvement of autophagy and NLRP3 inflammasome. *J. Neuroinflammation* 14, 239. <https://doi.org/10.1186/s12974-017-1013-4>.
- Jiang, Y., Botchway, B.O.A., Hu, Z., Fang, M., 2019. Overexpression of SIRT1 Inhibits Corticosterone-Induced Autophagy. *Neuroscience* 411, 11–22. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2019.05.035>.
- Johnson, S.A., Fournier, N.M., Kalynchuk, L.E., 2006. Effect of different doses of corticosterone on depression-like behavior and HPA axis responses to a novel stressor. *Behav. Brain Res.* 168, 280–288. <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2005.11.019>.
- Kaizuka, T., Morishita, H., Hama, Y., Tsukamoto, S., Matsui, T., Toyota, Y., Kodama, A., Ishihara, T., Mizushima, T., Mizushima, N., 2016. An Autophagic Flux Probe that Releases an Internal Control. *Mol. Cell* 64, 835–849. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2016.09.037>.

- Kim, John, Huang, Wei-Pang, Stromhaug, Per, Klionsky, D.J., 2002. Convergence of Multiple Autophagy and Cytoplasm to Vacuole Targeting Components to a Perivacuolar Membrane Compartment Prior to de Novo Vesicle Formation. *J Biol Chem.* 277, 763–773. <https://doi.org/10.1038/jid.2014.371>.
- Kim, H.J., Cho, M.H., Shim, W.H., Kim, J.K., Jeon, E.Y., Kim, D.H., Yoon, S.Y., 2017. Deficient autophagy in microglia impairs synaptic pruning and causes social behavioral defects. *Mol. Psychiatry* 22, 1576–1584. <https://doi.org/10.1038/mp.2016.103>.
- Klionsky, D.J., Abdelmohsen, K., Abe, A., Abedin, J., Abeliovich, H., Bartolom, A., Beckham, J.D., Bertolotti, A., Bess, A.S., Bozhkov, P.V., 2016. Guidelines for the use and interpretation of assays for monitoring autophagy (3rd edition) 12, 1–222. <https://doi.org/10.1080/15548627.2015.1100356>.
- Komatsu, M., Waguri, S., Chiba, T., Murata, S., Iwata, J.I., Tanida, I., Ueno, T., Koike, M., Uchiyama, Y., Kominami, E., Tanaka, K., 2006. Loss of autophagy in the central nervous system causes neurodegeneration in mice. *Nature* 441, 880–884. <https://doi.org/10.1038/nature04723>.
- Komatsu, M., Waguri, S., Koike, M., Sou, Y. Shin, Ueno, T., Hara, T., Mizushima, N., Iwata, J. Ichi, Ezaki, J., Murata, S., Hamazaki, J., Nishito, Y., Iemura, S. Ichiro, Natsume, T., Yanagawa, T., Uwayama, J., Warabi, E., Yoshida, H., Ishii, T., Kobayashi, A., Yamamoto, M., Yue, Z., Uchiyama, Y., Kominami, E., Tanaka, K., 2007. Homeostatic Levels of p62 Control Cytoplasmic Inclusion Body Formation in Autophagy-Deficient Mice. *Cell* 131, 1149–1163. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2007.10.035>.
- Kroemer, G., Mariño, G., Levine, B., 2010. Autophagy and the Integrated Stress Response. *Mol. Cell* 40, 280–293. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2010.09.023>.
- Kulkarni, A., Dong, A., Kulkarni, V.V., Chen, J., Laxton, O., Anand, A., Maday, S., 2019. Differential regulation of autophagy during metabolic stress in astrocytes and neurons. *Autophagy* 1–17. <https://doi.org/10.1080/15548627.2019.1703354>.
- Kuma, A., Komatsu, M., Mizushima, N., 2017. Autophagy-monitoring and autophagy-deficient mice. *Autophagy* 13, 1619–1628. <https://doi.org/10.1080/15548627.2017.1343770>.
- Labonté, B., Engmann, O., Purushothaman, I., Menard, C., Wang, J., Tan, C., Scarpa, J.R., Moy, G., Loh, Y.H.E., Cahill, M., Lorsch, Z.S., Hamilton, P.J., Calipari, E.S., Hodess, G.E., Issler, O., Kronman, H., Pfau, M., Obradovic, A.L.J., Dong, Y., Neve, R.L., Russo, S., Kazarskis, A., Tamminga, C., Mechawar, N., Turecki, G., Zhang, B., Shen, L., Nestler, E.J., 2017. Sex-specific transcriptional signatures in human depression. *Nat. Med.* 23, 1102–1111. <https://doi.org/10.1038/nm.4386>.
- Lago, N., Kaufmann, F.N., Negro-Demontel, M.L., Ali-Ruiz, D., Ghisleni, G., Rego, N., Arcas-García, A., Vitreira, N., Jansen, K., Souza, L.M., Silva, R.A., Lara, D.R., Pannunzio, B., Abin-Carriquiry, J.A., Amo-Aparicio, J., Martin-Otal, C., Naya, H., McGavern, D.B., Sayós, J., López-Vales, R., Kaster, M.P., Peluffo, H., 2020. CD300f immunoreceptor is associated with major depressive disorder and decreased microglial metabolic fitness. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 117, 6651–6662. <https://doi.org/10.1073/pnas.1911816117>.
- Lamark, T., Svenning, S., Johansen, T., 2017. Regulation of selective autophagy: The p62/SQSTM1 paradigm. *Essays Biochem.* 61, 609–624. <https://doi.org/10.1042/EBC20170035>.
- Lee, I.H., 2019. Mechanisms and disease implications of sirtuin-mediated autophagic regulation. *Experimental & Molecular Medicine* 51 (9), 1–11 <https://doi.org/10.1038/s12276-019-0302-7>.
- Lee, W., Kim, S.H., 2019. Autophagy at synapses in neurodegenerative diseases. *Arch. Pharm. Res.* 42, 407–415. <https://doi.org/10.1007/s12272-019-01148-7>.
- Li, D., Zheng, J., Wang, M., Feng, L., Ren, Z., Liu, Y., Yang, N., Zuo, P., 2016. Changes of TSPO-mediated mitophagy signaling pathway in learned helplessness mice. *Psychiatry Res.* 245, 141–147. <https://doi.org/10.1016/j.psychres.2016.02.068>.
- Li, M., Li, C., Yu, H., Cai, X., Shen, X., Sun, X., Wang, J., Zhang, Y., Wang, C., 2017. Lentivirus-mediated interleukin-1 β (IL-1 β) knock-down in the hippocampus alleviates lipopolysaccharide (LPS)-induced memory deficits and anxiety- and depression-like behaviors in mice. *J. Neuroinflammation* 14, 1–12. <https://doi.org/10.1186/s12974-017-0964-9>.
- Liang, Y., 2019. Emerging Concepts and Functions of Autophagy as a Regulator of Synaptic Components and Plasticity. *Cells* 8, 34. <https://doi.org/10.3390/cells8010034>.
- Liu, Y., Zhou, X., Yang, L., Wang, H., Zhang, Y.-Q., Pu, J.-C., Liu, L.-X., Gui, S.-W., Zeng, L., Chen, J.-J., Zhou, C.-J., Xie, P., 2017. Social defeat stress causes depression-like behavior with metabolite changes in the prefrontal cortex of rats. *PLoS One* 12, e0176725. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0176725>.
- Liu, C., Hao, S., Zhu, M., Wang, Y., Zhang, T., Yang, Z., 2018. Maternal Separation Induces Different Autophagic Responses in the Hippocampus and Prefrontal Cortex of Adult Rats. *Neuroscience* 374, 287–294. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2018.01.043>.
- Loos, B., Du Toit, A., Hofmeyr, J.H.S., 2014. Defining and measuring autophagosome flux - Concept and reality. *Autophagy* 10, 2087–2096. <https://doi.org/10.4161/15548627.2014.973338>.
- Ma, K., Zhang, Hongxiu, Wei, G., Dong, Z., Zhao, H., Han, X., Song, X., Zhang, Huiling, Zong, X., Baloch, Z., Wang, S., 2019. Identification of key genes, pathways, and miRNA/mRNA regulatory networks of CUMS-induced depression in nucleus accumbens by integrated bioinformatics analysis. *Neuropsychiatr. Dis. Treat.* 15, 685–700. <https://doi.org/10.2147/NDT.S200264>.
- Machado-Vieira, R., Zanetti, M.V., Teixeira, A.L., Uno, M., Valiengo, L.L., Soeiro-de-Souza, M.G., Oba-Shinjo, S.M., de Sousa, R.T., Zarate, C.A., Gattaz, W.F., Marie, S.K.N., 2015. Decreased AKT1/mTOR pathway mRNA expression in short-term bipolar disorder. *Eur. Neuropsychopharmacol.* 25, 468–473. <https://doi.org/10.1016/j.euroneuro.2015.02.002>.
- Mahapatra, K.K., Panigrahi, D.P., Prahara, P.P., Bhol, C.S., Patra, S., Mishra, S.R., Behera, B.P., Bhutia, S.K., 2019. Molecular interplay of autophagy and endocytosis in human health and diseases. *Biol. Rev.* 94, 1576–1590. <https://doi.org/10.1111/brv.12515>.
- Mariño, G., Niso-Santano, M., Baehrecke, E.H., Kroemer, G., 2014. Self-consumption: The interplay of autophagy and apoptosis. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 15, 81–94. <https://doi.org/10.1038/nrm3735>.
- Marzella, L., Ahlberg, J., Glaumann, H., 1981. Autophagy, heterophagy, microautophagy and crinophagy as the means for intracellular degradation. *Virchows Arch. B Cell Pathol. Incl. Mol. Pathol.* 36, 219–234. <https://doi.org/10.1007/BF02912068>.
- Menzies, F.M., Fleming, A., Caricasole, A., Bento, C.F., Andrews, S.P., Ashkenazi, A., Füllgrabe, J., Jackson, A., Jimenez Sanchez, M., Karabiyik, C., Licitra, F., Lopez Ramirez, A., Pavel, M., Puri, C., Renna, M., Ricketts, T., Schlotawa, L., Vicinanza, M., Won, H., Zhu, Y., Skidmore, J., Rubinsztein, D.C., 2017. Autophagy and Neurodegeneration: Pathogenic Mechanisms and Therapeutic Opportunities. *Neuron* 93, 1015–1034. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2017.01.022>.
- Mercer, C.A., Kaliappan, A., Dennis, P.B., 2009. A novel, human Atg13 binding protein, Atg101, interacts with ULK1 and is essential for macroautophagy. *Autophagy* 5, 649–662. <https://doi.org/10.4161/auto.5.5.8249>.
- Mijaljcica, D., Prescott, M., Devenish, R.J., 2011. Microautophagy in mammalian cells: Revisiting a 40-year-old conundrum. *Autophagy* 7, 673–682. <https://doi.org/10.4161/auto.7.7.14733>.
- Mizushima, N., Komatsu, M., 2011. Autophagy: Renovation of cells and tissues. *Cell* 147, 728–741. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2011.10.026>.
- Mizushima, N., Noda, T., Yoshimori, T., Tanaka, Y., Ishii, T., George, M.D., Klionsky, D.J., Ohsumi, M., Ohsumi, Y., 1998. A protein conjugation system essential for autophagy. *Nature* 395, 395–398. <https://doi.org/10.1038/26506>.
- Mizushima, N., Yamamoto, A., Hatano, M., Kobayashi, Y., Kabey, Y., Suzuki, K., Tokuhis, T., Ohsumi, Y., Yoshimori, T., 2001. Dissection of autophagosomal formation using Apg5-deficient mouse embryonic stem cells. *J. Cell Biol.* 152, 657–667. <https://doi.org/10.1083/jcb.152.4.657>.
- Mizushima, N., Kuma, A., Kobayashi, Y., Yamamoto, A., Matsubae, M., Takao, T., Natsume, T., Ohsumi, Y., Yoshimori, T., 2003. Mouse Apg16L, a novel WD-repeat protein, targets to the autophagic isolation membrane with the Apg12-Apg5 conjugate. *J. Cell Sci.* 116, 1679–1688. <https://doi.org/10.1242/jcs.00381>.
- Nakahira, K., Haspel, J.A., Rathinam, V.A.K., Lee, S.J., Dolinay, T., Lam, H.C., Englert, J.A., Rabinovitch, M., Cernadas, M., Kim, H.P., Fitzgerald, K.A., Ryter, S.W., Choi, A.M.K., 2011. Autophagy proteins regulate innate immune responses by inhibiting the release of mitochondrial DNA mediated by the NALP3 inflammasome. *Nat. Immunol.* 12, 222–230. <https://doi.org/10.1038/ni.1980>.
- Nishida, Y., Arakawa, S., Fujitani, K., Yamaguchi, H., Mizuta, T., Kanaseki, T., Komatsu, M., Otsu, K., Tsujimoto, Y., Shimizu, S., 2009. Discovery of Atg5/Atg7-independent alternative macroautophagy. *Nature* 461, 654–658. <https://doi.org/10.1038/nature08455>.
- Nishiyama, J., Miura, E., Mizushima, N., Watanabe, M., Yuzaki, M., 2007. Aberrant membranes and double-membrane structures accumulate in the axons of Atg5-null Purkinje cells before neuronal death. *Autophagy* 3, 591–596. <https://doi.org/10.4161/auto.4964>.
- Noda, T., Suzuki, K., Ohsumi, Y., 2002. Yeast autophagosomes: De novo formation of a membrane structure. *Trends Cell Biol.* 12, 231–235. [https://doi.org/10.1016/S0962-8924\(02\)02278-X](https://doi.org/10.1016/S0962-8924(02)02278-X).
- O'Connor, J.C., Lawson, M.A., André, C., Moreau, M., Lestage, J., Castanon, N., Kelley, K.W., Dantzer, R., 2009. Lipopolysaccharide-induced depressive-like behavior is mediated by indoleamine 2,3-dioxygenase activation in mice. *Mol. Psychiatry* 14, 511–522. <https://doi.org/10.1038/sj.mp.4002148>.
- Orenstein, S.J., Cuervo, A.M., 2010. Seminars in Cell & Developmental Biology Chaperone-mediated autophagy: Molecular mechanisms and physiological relevance. *Semin. Cell Dev. Biol.* 21, 719–726. <https://doi.org/10.1016/j.semcdb.2010.02.005>.
- Orsi, A., Razi, M., Dooley, H.C., Robinson, D., Weston, A.E., Collinson, L.M., Tooze, S.A., Klumperman, J., 2011. Dynamic and transient interactions of Atg9 with autophagosomes, but not membrane integration, are required for autophagy 2. <https://doi.org/10.1091/mbc.E11-09-0746>.
- Patel, S.S., Mehta, V., Changotra, H., Udayabanu, M., 2016. Depression mediates impaired glucose tolerance and cognitive dysfunction: A neuromodulatory role of risperidone. *Horm. Behav.* 78, 200–210. <https://doi.org/10.1016/j.yhbeh.2015.11.010>.
- Penninx, B.W.J.H., Lange, S.M.M., 2018. Metabolic syndrome in psychiatric patients: Overview, mechanisms, and implications. *Dialogues Clin. Neurosci.* 20, 63–73.
- Pilar-Cuéllar, F., Vidal, R., Díaz, A., Castro, E., dos Anjos, S., Vargas, V., Romero, B., Valdizán, E.M., 2014. Signaling pathways involved in antidepressant-induced cell proliferation and synaptic plasticity. *Curr Pharm Des.* 20 (23), 3776–3794. <https://doi.org/10.2174/13816128113196660736>.
- Plaza-Zabala, A., Sierra-Torre, V., Sierra, A., 2017. Autophagy and microglia: Novel partners in neurodegeneration and aging. *Int. J. Mol. Sci.* 18. <https://doi.org/10.3390/ijms18030598>.
- Rein, T., 2019. Is Autophagy Involved in the Diverse Effects of Antidepressants? *Cells* 8, 44. <https://doi.org/10.3390/cells8010044>.
- Rosa, P.B., Ribeiro, C.M., Bettio, L.E.B., Colla, A., Lieberknecht, V., Moretti, M., Rodrigues, A.L.S., 2014. Folic acid prevents depressive-like behavior induced by chronic corticosterone treatment in mice. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 127, 1–6. <https://doi.org/10.1016/j.pbb.2014.10.003>.
- Sánchez-Martín, P., Komatsu, M., 2018. p62/SQSTM1 – Steering the cell through health and disease. *J. Cell Sci.* 131. <https://doi.org/10.1242/jcs.222836>.
- Scaini, G., Barichello, T., Fries, G.R., Kennon, E.A., Andrews, T., Nix, B.R., Zunta-Soares, G., Valvassori, S.S., Soares, J.C., Quevedo, J., 2019. TSPO upregulation in bipolar disorder and concomitant downregulation of mitophagic proteins and NLRP3 inflammasome activation. *Neuropsychopharmacology* 44, 1291–1299. <https://doi.org/10.1038/s41386-018-0293-4>.
- Shibutani, S.T., Saitoh, T., Nowag, H., Münz, C., Yoshimori, T., 2015. Autophagy and autophagy-related proteins in the immune system. *Nat. Immunol.* 16, 1014–1024. <https://doi.org/10.1038/ni.3273>.
- Shih, J.H., Chiu, C.H., Ma, K.H., Huang, Y.S., Shiu, C.Y., Yeh, T.Y., Kao, L.T., Lin, Y.Y., Li,

- I.H., 2019. Autophagy inhibition plays a protective role against 3, 4-methylenedioxymethamphetamine (MDMA)-induced loss of serotonin transporters and depressive-like behaviors in rats. *Pharmacol. Res.* 142, 283–293. <https://doi.org/10.1016/j.phrs.2019.02.026>.
- Shu, X., Sun, Y., Sun, X., Zhou, Y., Bian, Y., Shu, Z., Ding, J., Lu, M., Hu, G., 2019. The effect of fluoxetine on astrocyte autophagy flux and injured mitochondria clearance in a mouse model of depression. *Cell Death Dis.* 10. <https://doi.org/10.1038/s41419-019-1813-9>.
- Song, X., Liu, B., Cui, L., Zhou, B., Liu, W., Xu, F., Hayashi, T., Hattori, S., Ushiki-Kaku, Y., Tashiro, S., Ichi, Ikejima, T., 2017. Silibinin ameliorates anxiety/depression-like behaviors in amyloid β -treated rats by upregulating BDNF/TrkB pathway and attenuating autophagy in hippocampus. *Physiol. Behav.* 179, 487–493. <https://doi.org/10.1016/j.physbeh.2017.07.023>.
- Stavoe, A.K.H., Holzbaur, E.L.F., 2019. Axonal autophagy: Mini-review for autophagy in the CNS. *Neurosci. Lett.* 697, 17–23. <https://doi.org/10.1016/j.neulet.2018.03.025>.
- Tan, C.C., Yu, J.T., Tan, M.S., Jiang, T., Zhu, X.C., Tan, L., 2014. Autophagy in aging and neurodegenerative diseases: Implications for pathogenesis and therapy. *Neurobiol. Aging* 35, 941–957. <https://doi.org/10.1016/j.neurobiolaging.2013.11.019>.
- Tan, X., Du, X., Jiang, Y., Botchway, B.O.A., Hu, Z., Fang, M., 2018. Inhibition of Autophagy in Microglia Alters Depressive-Like Behavior via BDNF Pathway in Postpartum Depression. *Front. psychiatry* 9, 434. <https://doi.org/10.3389/fpsy.2018.00434>.
- Tsvetkov, A.S., Arrasate, M., Barmada, S., Ando, D.M., Sharma, P., Shaby, B.A., Finkbeiner, S., 2013. Proteostasis of polyglutamine varies among neurons and predicts neurodegeneration. *Nat. Chem. Biol.* 9, 586–594. <https://doi.org/10.1038/nchembio.1308>.
- Valvassori, S.S., Dal-Pont, G.C., Resende, W.R., Jornada, L.K., Peterle, B.R., Machado, A.G., Farias, H.R., Souza, C.T., Carvalho, A.F., Quevedo, J., 2017. Lithium and valproate act on the GSK-3 β signaling pathway to reverse manic-like behavior in an animal model of mania induced by ouabain. *Neuropharmacology* 117, 447–459. <https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2016.10.015>.
- Wang, P., Feng, Y., Bo, Wang, L., Li, Y., Fan, C., Song, Q., Yu, S.Y., 2019a. Interleukin-6: Its role and mechanisms in rescuing depression-like behaviors in rat models of depression. *Brain. Behav. Immun.* 82, 106–121. <https://doi.org/10.1016/j.bbi.2019.08.002>.
- Wang, R.C., Wei, Y., An, Z., Zou, Z., Xiao, G., Bhagat, G., White, M., Reichelt, J., Levine, B., 2013. Akt-mediated regulation of autophagy and tumorigenesis through Beclin 1 phosphorylation. *Science* 338 (6109), 956–959. <https://doi.org/10.1126/science.1225967>.
- Wang, S., Li, B., Qiao, H., Lv, X., Liang, Q., Shi, Z., Xia, W., Ji, F., Jiao, J., 2014a. Autophagy-related gene Atg5 is essential for astrocyte differentiation in the developing mouse cortex. *EMBO Rep.* 15, 1053–1061. <https://doi.org/10.15252/embr.201338343>.
- Wang, Z., Zhang, Q., Yuan, L., Wang, S., Liu, L., Yang, X., Li, G., Liu, D., 2014b. The effects of curcumin on depressive-like behavior in mice after lipopolysaccharide administration. *Behav. Brain Res.* 274, 282–290. <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2014.08.018>.
- Wang, J.L., Wang, J.J., Cai, Z.N., Xu, C.J., 2018a. The effect of curcumin on the differentiation, apoptosis and cell cycle of neural stem cells is mediated through inhibiting autophagy by the modulation of Atg7 and p62. *Int. J. Mol. Med.* 42, 2481–2488. <https://doi.org/10.3892/ijmm.2018.3847>.
- Wang, Z., Liu, S., Pan, W., Guo, Y., Shen, Z., 2018b. Bafilomycin A1 alleviates depression-like symptoms in chronic unpredictable mild stress rats. *Mol. Med. Rep.* 18, 4587–4594. <https://doi.org/10.3892/mmr.2018.9431>.
- Wang, M., Bi, Y., Zeng, S., Liu, Y., Shao, M., Liu, K., Deng, Y., Wen, G., Sun, X., Zeng, P., Jing, L., Lv, Z., 2019b. Modified Xiaoyao San ameliorates depressive-like behaviors by triggering autophagosome formation to alleviate neuronal apoptosis. *Biomed. Pharmacother.* 111, 1057–1065. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2018.12.141>.
- Willner, P., 1997. Validity, reliability and utility of the chronic mild stress model of depression: A 10-year review and evaluation. *Psychopharmacology (Berl)* 134, 319–329. <https://doi.org/10.1007/s002130050456>.
- Willner, P., 2005. Chronic mild stress (CMS) revisited: Consistency and behavioural-neurobiological concordance in the effects of CMS. *Neuropsychobiology* 52, 90–110. <https://doi.org/10.1159/000087097>.
- Wu, Z.M., Yang, L.H., Cui, R., Ni, G.L., Wu, F.T., Liang, Y., 2017. Contribution of Hippocampal 5-HT₃ Receptors in Hippocampal Autophagy and Extinction of Conditioned Fear Responses after a Single Prolonged Stress Exposure in Rats. *Cell. Mol. Neurobiol.* 37, 595–606. <https://doi.org/10.1007/s10571-016-0395-7>.
- Xi, Y., Dhaliwal, J.S., Ceizar, M., Vaculik, M., Kumar, K.L., Lagace, D.C., 2016. Knockout of Atg5 delays the maturation and reduces the survival of adult-generated neurons in the hippocampus. *Cell Death Dis.* 7, e2127. <https://doi.org/10.1038/cddis.2015.406>.
- Xiang, M., Jiang, Y., Hu, Z., Yang, Y., Du, X., Botchway, B.O., Fang, M., 2019. Serotonin receptors 2A and 1A modulate anxiety-like behavior in post-traumatic stress disorder mice. *Am. J. Transl. Res.* 11, 2288–2303.
- Xiao, X., Shang, X., Zhai, B., Zhang, H., Zhang, T., 2018. Neurochemistry International Nicotine alleviates chronic stress-induced anxiety and depressive-like behavior and hippocampal neuropathology via regulating autophagy signaling. *Neurochem. Int.* 114, 58–70. <https://doi.org/10.1016/j.neuint.2018.01.004>.
- Yamamoto, S., Morinobu, S., Takei, S., Fuchikami, M., Matsuki, A., Yamawaki, S., Liberzon, I., 2009. Single prolonged stress: Toward an animal model of posttraumatic stress disorder. *Depress. Anxiety* 26, 1110–1117. <https://doi.org/10.1002/da.20629>.
- Yamamoto, H., Kakuta, S., Watanabe, T.M., Kitamura, A., Sekito, T., Kondo-kakuta, C., Ichikawa, R., Kinjo, M., Ohsumi, Y., 2012. Atg9 vesicles are an important membrane source during early steps of autophagosome formation. *PLoS One* 7, 219–233. <https://doi.org/10.1083/jcb.201202061>.
- Yang, Z., Klionsky, D.J., 2010a. Eaten alive: A history of macroautophagy. *Nat. Cell Biol.* 12, 814–822. <https://doi.org/10.1038/ncb0910-814>.
- Yang, Z., Klionsky, D.J., 2010b. Mammalian autophagy: Core molecular machinery and signaling regulation. *Curr. Opin. Cell Biol.* 22, 124–131. <https://doi.org/10.1016/j.ceb.2009.11.014>.
- Yang, Y., Hu, Z., Du, X., Davies, H., Huo, X., Fang, M., 2017. miR-16 and fluoxetine both reverse autophagic and apoptotic change in chronic unpredictable mild stress model rats. *Front. Neurosci.* 11, 1–18. <https://doi.org/10.3389/fnins.2017.00428>.
- Yazdankhah, M., Farioli-Vecchioli, S., Tonchev, A.B., Stoykova, A., Cecconi, F., 2014. The autophagy regulators Ambra1 and Beclin 1 are required for adult neurogenesis in the brain subventricular zone. *Cell Death Dis.* 5, 1–8. <https://doi.org/10.1038/cddis.2014.358>.
- Yin, Z., Pascual, C., Klionsky, D., 2016. Autophagy: machinery and regulation. *Microb. Cell* 3, 588–596. <https://doi.org/10.15698/mic2016.12.546>.
- Yoshii, S.R., Mizushima, N., 2017. Monitoring and Measuring Autophagy 1–13. <https://doi.org/10.3390/jms18091865>.
- Young, A.R.J., Chan, E.Y.W., Hu, X.W., Köchl, R., Crawshaw, S.G., High, S., Halley, D.W., Lippincott-Schwartz, J., Tooze, S.A., 2006. Starvation and ULK1-dependent cycling of mammalian Atg9 between the TGN and endosomes. *J. Cell Sci.* 119, 3888–3900. <https://doi.org/10.1242/jcs.03172>.
- Yu, H., Kim, S.H., Park, H.G., Kim, Y.S., Ahn, Y.M., 2010 Aug 16. 2010. Activation of Akt signaling in rat brain by intracerebroventricular injection of ouabain: a rat model for mania. *Prog. Neuropsychopharmacol. Biol. Psychiatry* 34 (6), 888–894. <https://doi.org/10.1016/j.pnpbp.2010.04.010>. Epub 2010 Apr 18.
- Zare, N., Khalifeh, S., Khodaghali, F., Shahamat, S.Z., Motamedi, F., Maghsoudi, N., 2015. Geldanamycin Reduces β -Associated Anxiety and Depression, Concurrent with Autophagy Provocation. *J. Mol. Neurosci.* 57, 317–324. <https://doi.org/10.1007/s12031-015-0619-1>.
- Zhang, H., Shang, Y., Xiao, X., Yu, M., Zhang, T., 2017. Prenatal stress-induced impairments of cognitive flexibility and bidirectional synaptic plasticity are possibly associated with autophagy in adolescent male-offspring. *Exp. Neurol.* 298, 68–78. <https://doi.org/10.1016/j.expneurol.2017.09.001>.
- Zhang, X., Bu, H., Jiang, Y., Sun, G., Jiang, R., Huang, X., Wu, Q., 2019. The antidepressant effects of apigenin are associated with the promotion of autophagy via the mTOR/AMPK/ULK1 pathway. *Molecular Medicine Reports* 20, 2867–2874. <https://doi.org/10.3892/mmr.2019.10491>.
- Zhao, Y., Ma, R., Shen, J., Su, H., Xing, D., Du, L., 2008. A mouse model of depression induced by repeated corticosterone injections. *Eur. J. Pharmacol.* 581, 113–120. <https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2007.12.005>.
- Zhao, Z., Zhang, L., Guo, X.-D., Cao, L.-L., Xue, T.-F., Zhao, X.-J., Yang, D.-D., Yang, J., Ji, J., Huang, J.-Y., Sun, X.-L., 2017. Rosiglitazone Exerts an Anti-depressive Effect in Unpredictable Chronic Mild-Stress-Induced Depressive Mice by Maintaining Essential Neuron Autophagy and Inhibiting Excessive Astrocytic Apoptosis. *Front. Mol. Neurosci.* 10, 1–16. <https://doi.org/10.3389/fnmol.2017.00293>.
- Zheng, S., Han, F., Shi, Y., Wen, L., Han, D., 2017. Single-Prolonged-Stress-Induced Changes in Autophagy-Related Proteins Beclin-1, LC3, and p62 in the Medial Prefrontal Cortex of Rats with Post-traumatic Stress Disorder. *J. Mol. Neurosci.* 62, 43–54. <https://doi.org/10.1007/s12031-017-0909-x>.
- Zhou, F., Yang, Y., Xing, D., 2011. Bcl-2 and Bcl-xL play important roles in the crosstalk between autophagy and apoptosis. *FEBS J.* 278, 403–413. <https://doi.org/10.1111/j.1742-4658.2010.07965.x>.
- Zhou, Y., Tao, X., Wang, Z., Feng, L., Wang, L., Liu, X., Pan, R., Liao, Y., Chang, Q., 2019. Hippocampus metabolic disturbance and autophagy deficiency in olfactory bulbectomized rats and the modulatory effect of fluoxetine. *Int. J. Mol. Sci.* 20. <https://doi.org/10.3390/jms20174282>.
- Zschocke, J., Zimmermann, N., Berning, B., Ganal, V., Holsboer, F., Rein, T., 2011. Antidepressant drugs diversely affect autophagy pathways in astrocytes and neurons-dissociation from cholesterol homeostasis. *Neuropsychopharmacology* 36, 1754–1768. <https://doi.org/10.1038/npp.2011.57>.

CAPÍTULO II. PADRONIZAÇÃO DO MODELO DE ESTRESSE CRÔNICO DE DERROTA SOCIAL E AVALIAÇÃO DA AUTOFAGIA EM CAMUNDONGOS FÊMEAS

1 INTRODUÇÃO

1.1 ESTRESSE CRÔNICO DE DERROTA SOCIAL

O estresse crônico de derrota social (ECDS) é um dos modelos mais utilizados para mimetizar alterações comportamentais e neuroquímicas associadas com os transtornos depressivos e de ansiedade em animais. Este modelo apresenta boa validade de constructo, face e preditiva, além de uma alta validade etológica, pois mimetiza situações aversivas comuns observadas em roedores (WANG, et al., 2020). O paradigma de derrota social se baseia em interações agonísticas entre animais coespecíficos geralmente do mesmo sexo desencadeadas pelo comportamento natural e previsível de disputa territorial (HAMMELS et al., 2015). Uma ampla variedade de protocolos de estresse de derrota social foi descrita, variando em relação a espécie dos roedores (ratos, camundongos ou cobaias), número de repetições das sessões de estresse (agudo ou crônico) e o tempo de interação física entre os animais (DUQUE; VINADER-CAEROLS; MONLEON, 2016; GOLDEN et al., 2011; HAMMAMIEH et al., 2012; KRISHNAN et al., 2007; KUDRYAVTSEVA, 1994; KUDRYAVTSEVA; BAKSHTANOVSKAYA; KORYAKINA, 1991; MOURI et al., 2018). Entretanto, a maioria desses protocolos tem em comum o uso exclusivo de roedores machos tanto como intrusos, quanto como residentes (LYONS et al., 2023).

Um dos protocolos mais empregados para estudo dos efeitos do estresse psicossocial, é o protocolo de ECDS proposto por Golden e colaboradores (2011). Neste protocolo, o camundongo intruso macho geralmente da linhagem C57BL/6 é colocado na caixa moradia de um camundongo residente macho de linhagem diferente (CD1 ou *Swiss*) que é mais velho, agressivo e de maior porte, por um período de 10 min (fase de contato físico). Após este período, uma placa de acrílico transparente e perfurada é colocada na caixa moradia separando o animal intruso e o residente pelo período remanescente de 24 h (fase de contato sensorial). Este ciclo é repetido por 10 dias consecutivos, sendo que o camundongo intruso é apresentado a um novo camundongo residente a cada dia. Após o término do protocolo, os animais intrusos são avaliados no teste de interação social a fim de determinar se o estresse foi capaz de induzir comportamento de esquiva social direcionado a um camundongo

semelhante aos camundongos residentes utilizados durante o protocolo, mas não familiar (GOLDEN et al., 2011).

É amplamente descrito na literatura que o ECDS é capaz de induzir alterações comportamentais em roedores como esquivas sociais, comportamento tipo-ansioso e prejuízos cognitivos. Além disso, a derrota social provoca alterações do funcionamento de áreas encefálicas envolvidas com a regulação das respostas emocionais (como o hipocampo, o córtex pré-frontal, o núcleo accumbens e a amígdala) e a hiperativação de sistemas que medeiam a resposta ao estresse, como o sistema nervoso autônomo simpático, o eixo HPA e o sistema imunológico (para revisão consultar BILTZ et al., 2022). Essas alterações comportamentais e fisiológicas mimetizam os sintomas e os aspectos neurobiológicos dos transtornos mentais comuns.

Embora, o protocolo de ECDS tenha sido amplamente adaptado e empregado para investigar os mecanismos subjacentes das respostas ao estresse e a neurobiologia dos transtornos mentais comuns, ressalta-se que só recentemente este modelo começou a ser adaptado para ser reproduzido em roedores fêmeas comumente utilizados em laboratório (A. Z. HARRIS et al., 2018; IÑIGUEZ et al., 2017; TAKAHASHI et al., 2017; VAN DOESELAR et al., 2020). O principal obstáculo enfrentado para reproduzir o ECDS em camundongos fêmeas, é que em condições normais camundongos residentes (machos ou fêmeas) não apresentam comportamento agressivo direcionado a fêmeas intrusas (KUSKE & TRAINOR, 2022).

Até o início da última década, os modelos de ECDS em fêmeas descritos na literatura utilizavam roedores de espécies não tão comumente utilizadas em laboratório, como *California mice* (*Peromyscus californicus*), hamster sírio (*Mesocricetus auratus*) e ratazana da pradaria (*Microtus ochrogaster*), pois as fêmeas destas espécies apresentam comportamento agressivo robusto frente a intrusos do mesmo sexo (RIBBLE & SALVIONI, 1990; TRAINOR et al., 2011). Outros modelos propuseram algumas manipulações das condições padrão a fim de induzir agressividade. Neste contexto, foi descrito um modelo de ECDS que utilizou ratas no período de lactação como animais residentes, pois estas apresentam comportamento agressivo direcionado a ratas intrusas (HANEY et al., 1995; HOLLY et al., 2012). Newman e colaboradores (2019) demonstraram que camundongos *Swiss Webster*

fêmeas não-castradas quando alojadas com camundongos machos castrados da mesma linhagem apresentam comportamento agressivo direcionado a fêmeas C57BL/6 intrusas. Adicionalmente, outro modelo induziu comportamento agressivo em camundongos machos contra fêmeas intrusas, por meio da ativação quimiogênica de áreas encefálicas específicas como a subdivisão ventrolateral do hipotálamo ventromedial (VMHvl) (TAKAHASHI et al., 2017).

Embora os modelos citados tenham sido eficientes em reproduzir o ECDS em roedores fêmeas, as estratégias empregadas são logisticamente difíceis de serem reproduzidas por utilizarem linhagens de roedores que não são padrão na maioria dos laboratórios ou métodos trabalhosos e caros para indução da agressividade. Entretanto, uma opção de modelo de ECDS mais simples e acessível foi proposta por Harris e colaboradores (2018). Os autores aplicaram urina de camundongos machos contendo odorantes e feromônios no corpo dos camundongos fêmeas antes das sessões de contato físico da derrota social para induzir comportamento agressivo nos camundongos machos residentes (HARRIS et al. 2018). Este método foi posteriormente reproduzido por van Doeselaar e colaboradores (2020), sendo considerado eficiente para induzir alterações comportamentais e fisiológicas nos camundongos fêmeas, como comportamento tipo-ansioso e hiperativação do eixo HPA.

1.2 DERROTA SOCIAL E AUTOFAGIA

Poucos estudos investigaram o impacto do estresse de derrota social na via da autofagia. Gassen e colaboradores (2014) não encontraram nenhuma alteração nos marcadores autofágicos investigados no hipocampo de camundongos machos expostos a 21 dias de ECDS. Entretanto, estudos publicados recentemente, associaram alterações das respostas emocionais induzidas pelo ECDS com o aumento da mitofagia (i.e., degradação seletiva de mitocôndrias pelo processo de autofagia) e autofagia em células da amígdala basolateral e do hipocampo de camundongos machos (DUAN et al., 2021; GUO et al., 2022).

Por outro lado, Sakai e colaboradores (2022) relataram achados que sugerem aumento do fluxo autofágico no córtex pré-frontal de camundongos machos que apresentaram perfil de resiliência ao ECDS. Além disso, os autores também

demonstraram que deficiências no mecanismo de autofagia em células da microglia potencializaram o comportamento de esquiva social induzido pelo ECDS (SAKAI et al., 2022).

Entretanto, ressalta-se que a divergência nos achados dos impactos da derrota social na autofagia pode ser devido a diferenças da ativação dessa via em áreas encefálicas e tipos celulares específicos. Além disso, nenhum estudo investigou os efeitos do ECDS nos mecanismos de autofagia de roedores fêmeas, destacando a importância de se avaliar possíveis efeitos nas respostas emocionais e nesta via dependentes do sexo.

1.3 HIPÓTESES

- O ECDS provoca um prejuízo das respostas emocionais e do mecanismo de autofagia em camundongos fêmeas.
- A inibição farmacológica da autofagia potencializa os efeitos de um estresse agudo de derrota social em camundongos fêmeas.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar alterações nos comportamentos emocionais e nos mecanismos de autofagia em camundongos fêmeas submetidos a um modelo crônico e agudo de estresse psicossocial.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Padronizar um modelo de ECDS em camundongos fêmeas e caracterizar os comportamentos emocionais decorrentes do estresse.
- Avaliar os níveis de proteínas associadas à autofagia no hipocampo de camundongos fêmeas expostos ao ECDS.
- Expor os camundongos fêmeas a um modelo de estresse agudo de derrota social (EADS) associado a inibição farmacológica da autofagia e avaliar as respostas emocionais.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 ANIMAIS E ASPECTOS ÉTICOS

Foram utilizados camundongos machos da linhagem *Swiss* (3 a 6 meses) provenientes do Biotério Central da Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC) e camundongos fêmeas da linhagem C57BL/6 (2 a 3 meses) que foram fornecidas pelo Prof. Dr. Eduardo Moreira (Departamento de Ciências Fisiológicas, Centro de Ciências Biológicas - CCB, UFSC). Os animais foram transferidos para o Biotério Setorial do Departamento de Bioquímica e inicialmente alojados em grupos em caixas moradias (40 x 34 x 16 cm) que foram mantidas em estantes ventiladas separadas de acordo com a linhagem. Os animais tiveram livre acesso à ração e água filtrada, e foram mantidos em condições padronizadas (temperatura de 21 ± 2 °C, ciclo claro-escuro de 12 h, com luzes acesas às 7 h).

Para realização dos protocolos de estresse e testes comportamentais os animais foram transferidos 24 h antes do início dos experimentos para as salas de comportamento do Laboratório de Neurociência Translacional (Departamento de Bioquímica, CCB, UFSC). Os experimentos foram conduzidos de acordo com os padrões de bem-estar animal recomendados pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA) obedecendo a lei nacional nº 11.794/2008. Além disso, ressalta-se que os procedimentos realizados com os animais foram aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da UFSC (nº 2010201118, ANEXO A).

3.2 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL

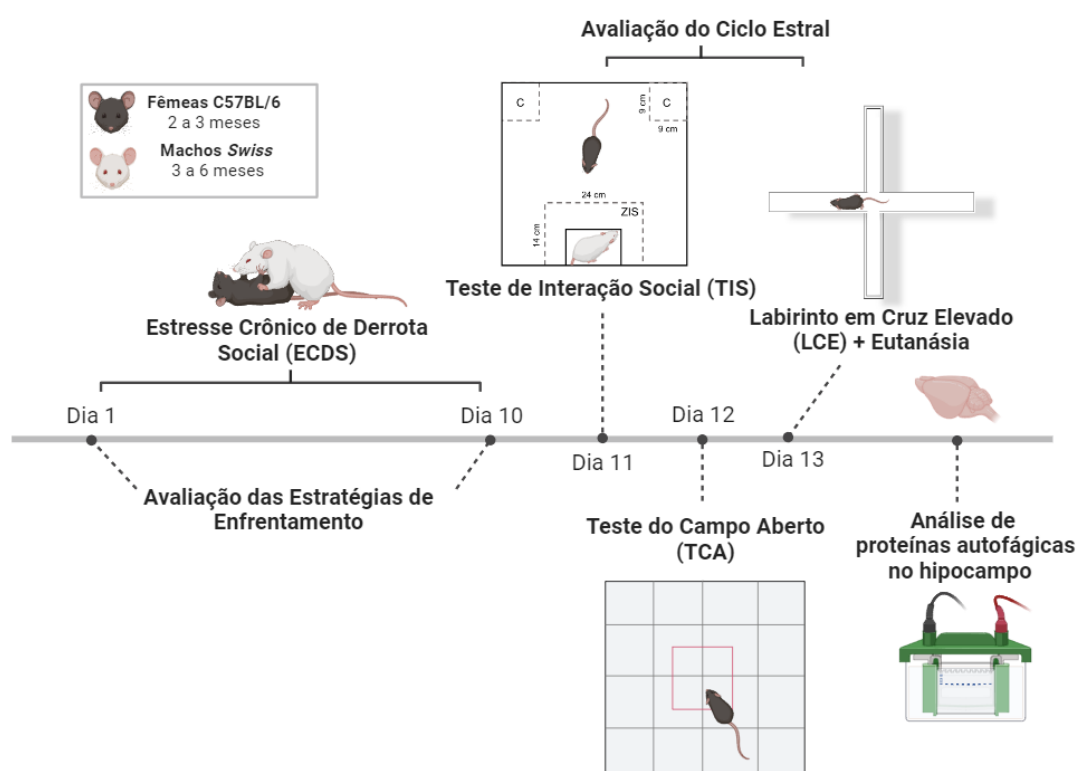
3.2.1 Padronização do modelo de ECDS e caracterização das respostas emocionais

As fêmeas C57BL/6 foram expostas a 10 dias consecutivos de ECDS, sendo que as sessões de contato físico foram filmadas nos dias 1 e 10 para posterior avaliação das estratégias de enfrentamento ao estresse. Todas as fêmeas foram pesadas nos dias 1, 5, 10 e 13. Um dia após o término do ECDS, dia 11, as fêmeas foram avaliadas no teste de interação social (TIS). No dia 12 foi realizado o teste do

campo aberto (TCA) e no dia 13 foi realizado o teste do labirinto em cruz elevado (LCE) seguido pela eutanásia (Figura 3).

Além disso, o ciclo estral das fêmeas foi avaliado nos dias 11, 12 e 13 após a finalização dos testes comportamentais. Uma coorte de animais foi submetida à eutanásia por decapitação para dissecação do hipocampo (HC) que foi congelado e armazenado a -80°C . Uma outra coorte foi anestesiada com cetamina (100 mg/kg) e xilazina (10 mg/kg) e submetida a perfusão transcardíaca com solução salina (NaCl) 0,9%, seguida por paraformaldeído (PFA) 4%. Os encéfalos foram removidos da calota craniana, fixados em PFA 4% por 24 h, e mantidos em solução de sacarose 30%.

Figura 3. Representação esquemática do delineamento experimental do modelo de ECDS



Legenda: As fêmeas C57BL/6 foram expostas ao estresse crônico de derrota social (ECDS) por 10 dias consecutivos. As estratégias de enfrentamento ao estresse foram avaliadas durante as sessões de contato físico do dia 1 e 10. As fêmeas do grupo controle (CTL) foram mantidas pareadas durante os 10 dias de ECDS, sendo que os pares foram trocados diariamente. No dia 11, todas as fêmeas foram avaliadas no teste de interação social (TIS). No dia 12 foi realizado o teste do campo aberto (TCA). No dia 13, foi realizado o teste do labirinto em cruz elevado (LCE) seguido pela eutanásia para coleta das amostras de hipocampo que foram utilizadas para análise de proteínas autofágicas pela técnica de *Western blot*. Fonte: produzida pela autora no site Biorender.

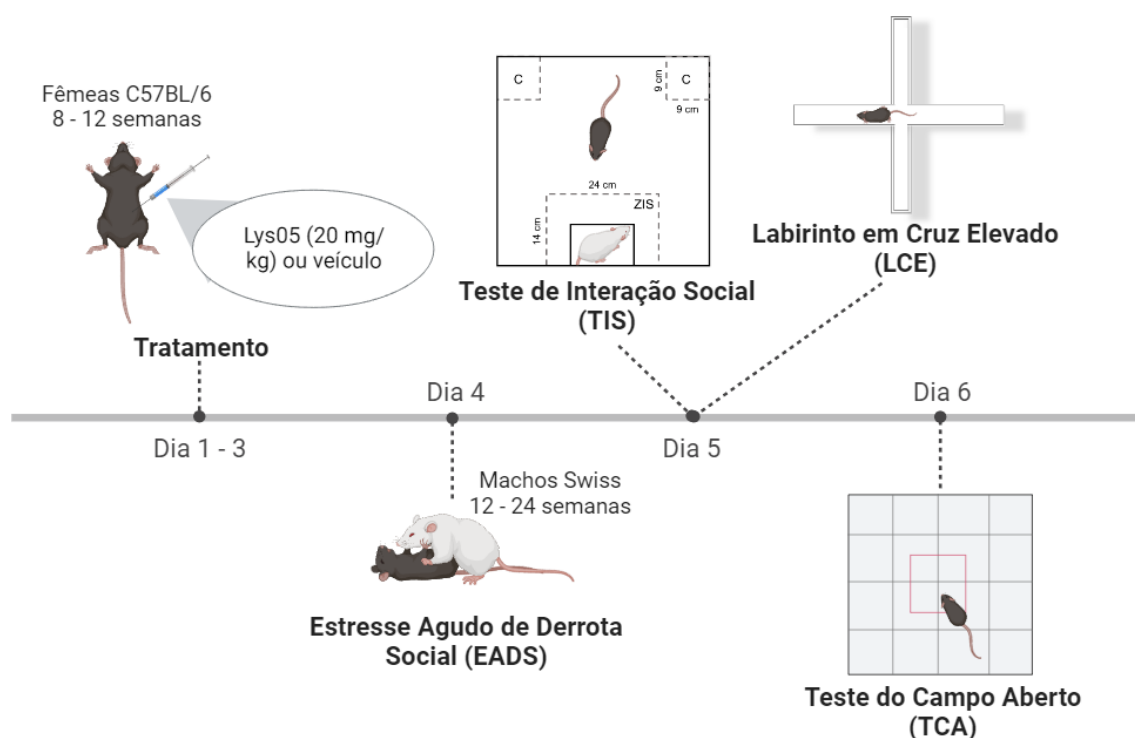
3.2.2 Modelo de Estresse Agudo de Derrota Social (EADS) associado a inibição autofágica

Para avaliar o efeito da associação do EADS e da inibição da autofagia nas as respostas comportamentais, primeiramente as fêmeas C57BL/6 foram tratadas com o inibidor farmacológico Lys05 (#SML2097-25MG, Sigma-Aldrich®) na dose de 20 mg/kg, intraperitoneal (i.p.), uma vez ao dia por três dias consecutivos. O fármaco Lys05 consiste em um sal solúvel em água formado por um dímero de cloroquina que atua neutralizando o pH dos lisossomos, conseqüentemente prejudicando o funcionamento das enzimas lisossomais e bloqueando o fluxo autofágico. As fêmeas do grupo veículo foram tratadas com salina 0,9%. O peso dos animais foi acompanhado durante os dias 1, 4 e 6.

Após 24 h da administração da última dose de Lys05 ou veículo (dia 4), as fêmeas foram subdivididas em quatro grupo experimentais: os grupos CTL tratados com veículo ou Lys05 que não foram expostos ao EADS e os grupos EADS tratados com veículo ou Lys05. As fêmeas dos grupos EADS foram expostas a três sessões de cinco minutos de confronto físico com intervalos de quinze minutos.

Um dia após o EADS (dia 5), as fêmeas foram avaliadas no TIS durante o período da manhã e no LCE durante a tarde. No dia 6 do protocolo experimental, as fêmeas foram avaliadas no TCA e submetidas a eutanásia por decapitação para dissecação do hipocampo que foi congelado em nitrogênio líquido e armazenado a - 80 °C (Figura 4).

Figura 4. Representação esquemática do delineamento experimental do modelo de EADS associado a inibição autofágica



Legenda: As fêmeas C57BL/6 foram tratadas uma vez ao dia com o inibidor autofágico (Lys05 20 mg/kg, i.p.) ou veículo (salina 0,9%, i.p.) durante 3 dias. Um dia após o término do tratamento, as fêmeas foram expostas a 3 sessões de 5 min de estresse agudo de derrota social (EADS). As fêmeas dos grupos controles (CTL) tratadas com inibidor autofágico ou veículo foram mantidas em grupos de 5 animais durante as sessões de EADS sendo manipuladas apenas para aplicação da urina. No dia 5 do protocolo, todos os grupos foram avaliadas no teste de interação social (TIS) e no teste do labirinto em cruz elevado (LCE). No dia 6, os animais foram expostos ao teste campo aberto (TCA) seguido pela eutanásia. Fonte: produzida pela autora no site Biorender.

3.3 MODELOS DE ESTRESSE

3.3.1 Seleção de camundongos machos residentes

Um mês antes do início dos protocolos de derrota social, os camundongos *Swiss*, que foram chamados de animais residentes, foram alojados em caixas moradias individuais, a fim de exacerbar suas características de demarcação territorial. Além disso, foi realizada uma triagem para selecionar os animais que apresentavam o comportamento agressivo necessário para a realização dos protocolos de estresse, conforme relatado por Golden e colaboradores (2011).

Durante a triagem, camundongos machos C57BL/6 (2 a 4 meses) foram colocados nas caixas moradia dos camundongos *Swiss* sem nenhum tipo de barreira, ou seja, permitindo-se o contato físico entre animais por cinco minutos durante três dias consecutivos. Os camundongos *Swiss* que apresentaram latência para o ataque menor que 60 s ou pelo menos dez ataques direcionados aos camundongos C57BL/6 durante dois dias consecutivos foram selecionados para participarem dos protocolos de estresse. Aqueles que não atenderam aos critérios de inclusão e os camundongos C57BL/6 usados nas sessões de triagem foram submetidos a eutanásia por exposição a dióxido de carbono (CO₂).

Os camundongos residentes selecionados foram utilizados em mais de um protocolo contanto que o estresse fosse realizado em até três meses após a triagem inicial. Além disso, as condições físicas dos camundongos residentes foram avaliadas periodicamente e os animais que apresentaram feridas ou sinais de dor, assim como os que apresentaram habituação ao protocolo de estresse foram substituídos e submetidos a eutanásia.

3.3.2 Coleta de urina dos machos

Para coletar a urina aplicada nas fêmeas antes das sessões de contato físico dos protocolos de estresse, 20 camundongos machos C57BL/6 foram colocados em grupos de 10 animais em uma caixa moradia sem maravalha contendo apenas uma grade de metal apoiado ao seu fundo para evitar que os animais caminhassem sobre a urina excretada. Os animais foram mantidos nessas condições por 2 h diariamente até obtenção de quantidade suficiente de urina para realização dos protocolos. A urina foi coletada com uma micropipeta e armazenada em microtubos de 2 mL a 4°C.

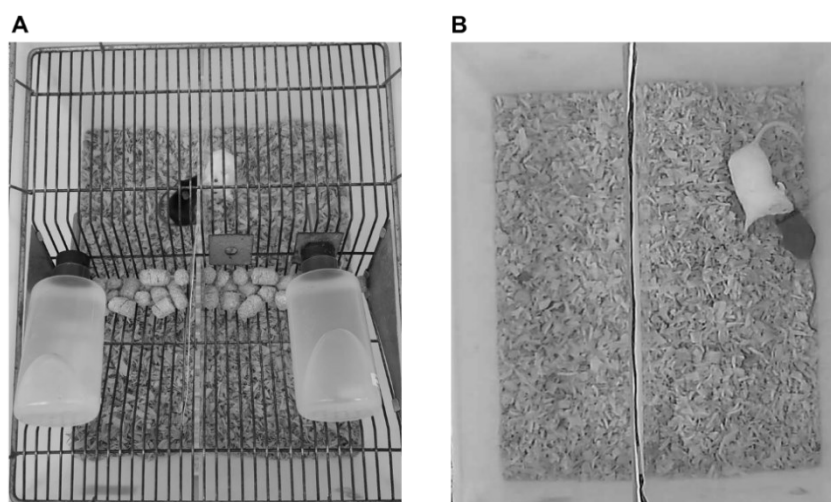
3.3.3 Protocolo de ECDS

O ECDS foi composto por uma sessão diária de contato físico e outra de contato sensorial durante 10 dias consecutivos. No início de cada sessão, as fêmeas C57BL/6 foram individualmente inseridas na caixa moradia (40 x 34 x 16) de um camundongo *Swiss* não familiar contendo uma divisória de acrílico transparente e perfurada que impedia o contato físico, mas permitia a troca de estímulos sensoriais entre os animais (Figura 5.A). Uma vez ao dia, foi aplicado 20 µL de urina de camundongos machos

C57BL/6 no dorso, orifício vaginal e base da cauda das fêmeas (HARRIS et al., 2018; VAN DOESELAR et al., 2020) que foram inseridas individualmente no lado da caixa do camundongo residente permitindo o contato físico entre eles por 10 min (Figura 5.B). Após esse período as fêmeas foram retiradas do lado do residente e recolocadas ao lado oposto da caixa por 24 h (contato sensorial) até a próxima sessão de contato físico. As fêmeas foram apresentadas a um animal residente não familiar durante todos os dias de ECDS, prevenindo que houvesse habituação ao residente. Todas as sessões de contato físico foram observadas por uma experimentadora experiente para registrar a latência do primeiro ataque e evitar interações sexuais. Além disso, as fêmeas foram pesadas e tiveram as sessões de contato físico filmadas nos dias 1 e 10 de ECDS para posterior avaliação das estratégias de enfrentamento adotadas frente ao estresse.

As fêmeas C57BL/6 do grupo CTL foram pareadas em caixas moradia (40 x 34 x 16) separadas pela divisória de acrílico transparente e perfurado. Assim como as fêmeas do grupo ECDS, as fêmeas CTL receberam aplicação de urina no dorso, base da cauda e orifício vaginal e foram trocadas de pares diariamente durante os 10 dias. Entretanto, ressalta-se que em nenhum momento foi permitida a interação física entre as fêmeas CTL.

Figura 5. Imagens ilustrativas das etapas do protocolo de ECDS



Legenda: A. Etapa de contato sensorial, a fêmea C57BL/6 e o macho Swiss foram separados por uma divisória transparente e perfurada por 24 h. B. Etapa de contato físico, a fêmea C57BL/6 foi inserida no lado da caixa do camundongo Swiss residente por 10 min, permitindo-se interações físicas entre os animais. Imagens obtidas pela autora durante os experimentos. Fonte: autora.

Após a última sessão de contato físico do protocolo de ECDS, as fêmeas do grupo ECDS e CTL foram separadas e mantidas em caixas moradias individuais durante todo o período de realização dos testes comportamentais.

3.3.4 Avaliação do comportamento agressivo dos camundongos residentes

O comportamento dos camundongos residentes foi avaliado diariamente durante as sessões de interação física nos 10 dias de ECDS. Nos dias 1 e 10 do protocolo, as sessões de interação física foram filmadas para posterior caracterização do comportamento dos residentes e das intrusas. O comportamento dos camundongos residentes direcionados as fêmeas intrusas foram classificados como:

- a- Ataque: quando o camundongo residente visivelmente abocanhou a fêmea intrusa;
- b- Comportamento territorial: quando o camundongo movimentou a cauda rapidamente (em inglês essa ação é chamada de *tail rattling*) ou quando o camundongo empurrou a maravalha em direção a fêmea intrusa;
- c- Ameaça de ataque: quando o camundongo residente avançou em direção a fêmea intrusa;
- d- Lambidas agressivas (do inglês, *grooming*): quando o camundongo residente realizou o comportamento de lambar agressivamente a cabeça, dorso ou orifício vaginal da fêmea intrusa;
- e- Montas: quando o camundongo residente tentou montar na fêmea intrusa.

Camundongos residentes que apresentaram habituação ao protocolo, caracterizada por ausência de ataques ou outros tipos de interações agressivas com as fêmeas intrusas, foram substituídos. Além disso, as sessões em que houve comportamento repetitivo e insistente de monta foram interrompidas para prevenir que as fêmeas ficassem prenhas.

3.3.5 Avaliação das estratégias de enfrentamento das fêmeas expostas ao ECDS

As estratégias de enfrentamento exibidas pelas fêmeas intrusas em resposta aos comportamentos dos machos residentes descrito no item 3.5.1 foram classificadas em respostas reativas e submissas. Considerou-se uma resposta reativa quando a fêmea correu antes do ataque ou durante a tentativa de monta ou tentou afastar o residente com as patas. Já a resposta submissa compreendeu o comportamento de postura de submissão, permanecer imóvel (ou seja, não tentar fugir durante um ataque, uma tentativa de monta ou ao receber lambidas agressivas) ou lambe o camundongo residente.

Além disso, foi avaliado a distância total percorrida, o número e tempo gasto nos cantos da área da caixa moradia do camundongo residente. Esses parâmetros foram avaliados utilizando o software Any-Maze®.

3.3.6 Protocolo de EADS

O EADS foi composto por três sessões de 5 min de confronto físico entre o camundongo residente e a fêmea C57BL/6. As sessões ocorreram em um mesmo dia com intervalos de 15 minutos entre uma e a outra. Cada fêmea C57BL/6 foi colocada na caixa moradia (20 x 30 x 13 cm) de um camundongo *Swiss* residente e avaliou-se a latência para o primeiro ataque. Antes de cada sessão, foi aplicado 20 µL de urina de camundongos C57BL/6 machos no orifício vaginal, base da cauda e dorso das fêmeas que foram apresentadas a três camundongos residentes diferentes para prevenir habituação. Após o término do protocolo de EADS, as fêmeas foram mantidas em grupos de 5 animais até a finalização dos testes comportamentais.

As fêmeas CTL também foram mantidas em grupos de cinco animais em uma sala separada sendo manipuladas apenas para aplicação da urina.

3.4 TESTES COMPORTAMENTAIS E CICLO ESTRAL

Todos os testes comportamentais foram realizados no período da manhã (9 h às 12 h), exceto o teste do campo aberto do protocolo de ECDS que foi realizado durante a tarde (14 h às 17 h). Os animais foram aclimados na sala experimental com a luz vermelha acesa por 1 h antes do início dos testes. Todos os aparatos utilizados

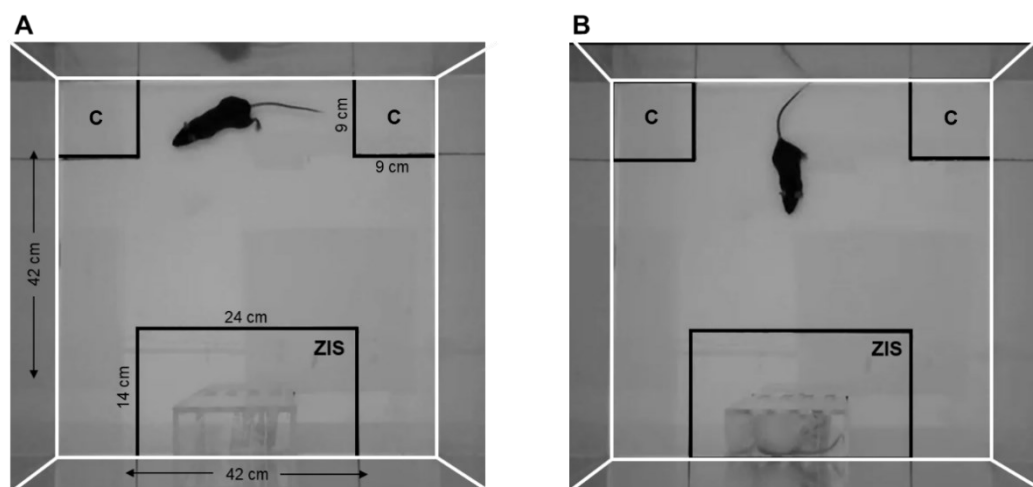
foram higienizados com álcool 20% entre os testes de diferentes animais para eliminar as pistas olfatórias. Todos os testes comportamentais foram filmados para posterior análise. A coleta de amostras para avaliação do ciclo estral foi feita após a finalização do teste comportamental de cada dia de protocolo.

3.4.1 Teste de interação social (TIS)

O TIS foi realizado em um aparato de acrílico (42 x 42 x 42 cm) que continha um compartimento móvel de acrílico perfurado apoiado a uma de suas paredes (Figura 6). O teste foi composto por duas etapas de 150 s com intervalo de 30 s. Na primeira etapa ou etapa sem alvo, a fêmea foi colocada no centro do aparato próxima da parede oposta ao compartimento vazio (Figura 6.A). Na segunda etapa ou etapa com alvo, foi inserido um camundongo *Swiss* macho não familiar no compartimento e a fêmea foi recolocada no centro do aparato (Figura 6.B). Ambas etapas foram filmadas e analisadas pelo *software Any-Maze*[®], no qual foram delimitadas as zonas de interação social e cantos.

Os parâmetros avaliados no TIS foram tempo de permanência e o número de entradas na zona de interação social (ZIS) e na zona dos cantos (C) na ausência e presença do alvo e o índice de interação social (IIS). O IIS consiste no tempo na ZIS na presença do alvo dividido pelo tempo na ZIS na ausência do alvo, o qual pode ser utilizado para classificar os animais em resilientes ($IIS > 1$) ou suscetíveis ($IIS < 1$) ao estresse (GOLDEN et al., 2011).

Figura 6. Foto representativa do aparato e das etapas do teste de interação social



Legenda: A. Representação da primeira etapa do teste de interação social, em que a fêmea C57BL/6 é inserida no aparato na ausência de um camundongo Swiss no compartimento de acrílico transparente e perfurado. B. Representação da segunda etapa do teste em que a fêmea é inserida novamente no aparato, mas dessa vez com um camundongo Swiss não-familiar confinado no compartimento. ZIS: zona de interação social e C: zona dos cantos. Imagens obtidas pela autora durante os experimentos. Fonte: autora.

3.4.2 Labirinto em cruz elevado (LCE)

O LCE é amplamente utilizado para avaliar os comportamentos relacionados à ansiedade (LISTER, 1987). Foi utilizado um aparato de acrílico cinza claro elevado a 50 cm do nível do chão e composto por uma plataforma central (6 x 6 cm) e dois braços abertos (30 x 6 cm) perpendiculares a dois braços fechados (30 x 6 x 16 cm) (Figura 7). Os animais foram colocados individualmente na plataforma central com a cabeça voltada para um dos braços abertos e o comportamento foi filmada por 5 min. Foi considerado que o animal entrou em algum dos braços, quando este atravessou o limite do braço com as quatro patas. Os parâmetros comportamentais avaliados foram o número de entradas e o tempo de permanência dos animais nos braços abertos e fechados e o tempo gasto realizando comportamento de avaliação de risco (i.e., quando o animal permaneceu no centro do aparato sem atravessar as quatro patas em direção a um braço, mas esticou o corpo em direção a um dos braços). Estes parâmetros foram avaliados manualmente por uma experimentadora experiente. A redução do tempo de permanência nos braços abertos é considerada um indicativo

de comportamento tipo-ansioso. O número de entradas nos braços abertos foi dividido pelo número de entradas nos braços fechados para gerar o índice de entradas.

Figura 7. Foto representativa do teste do labirinto em cruz elevado

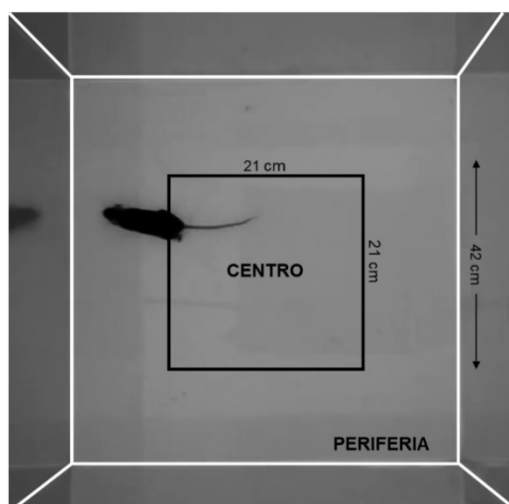


Legenda: na foto representativa do labirinto em cruz elevado observa-se uma fêmea C57BL/6 explorando um dos braços abertos do aparato. Imagem obtida pela autora durante os experimentos. Fonte: autora.

3.4.3 Teste do campo aberto (TCA)

O campo aberto é um teste que se baseia no conflito entre o comportamento natural dos roedores de explorar novos ambientes e o comportamento de evitar áreas expostas ou claras. Este teste é utilizado para avaliar o comportamento tipo-ansioso e locomotor de roedores (NEIS et al., 2015; RODRIGUES et al., 1996). Durante o teste, os animais foram colocados individualmente no centro de uma caixa de acrílico opaca (42 cm x 42 cm x 42 cm) e o comportamento foi registrada por 5 min (Figura 8). Posteriormente, foi avaliado o tempo gasto no centro do aparato (21 cm x 21 cm) e a distância total percorrida utilizando o *software* Any-Maze[®]. Além disso, foi avaliado manualmente o número de levantamentos apoiados e não apoiados as paredes do aparato realizado pelas fêmeas.

Figura 8. Foto representativa do teste do campo aberto

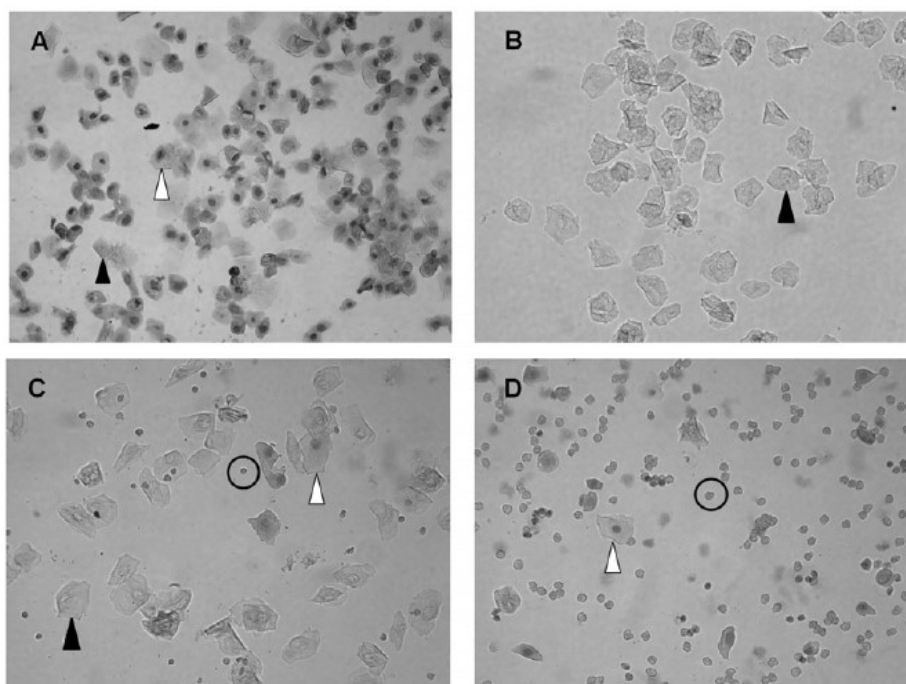


Legenda: na foto representativa do aparato do campo aberto, observa-se uma fêmea C57BL/6 saindo da zona do centro do aparato. Imagem obtida pela autora durante os experimentos. Fonte: autora.

3.4.4 Avaliação do ciclo estral

Em camundongos, o ciclo estral pode ser dividido em quatro fases (proestro, estro, metaestro e diestro) que se repetem a cada quatro ou cinco dias (Figura 9). Cada fase é caracterizada pela predominância de tipos celulares específicos presentes no epitélio vaginal (BYERS et al., 2012). Portanto, o ciclo estral dos camundongos fêmeas foi avaliado por meio de esfregaços vaginais. As amostras foram coletadas com uma haste flexível umedecida com salina 0,9% que foi inserida gentilmente e superficialmente no orifício vaginal sendo que o conteúdo celular coletado foi espalhado por uma lâmina de vidro. As lâminas foram avaliadas a fresco (sem coloração) por uma experimentadora experiente em um microscópio óptico em aumento de 40x.

Figura 9. Células vaginais características de cada fase do ciclo estral



Legenda: As fotos apresentam os tipos celulares predominantes em cada fase do ciclo estral. A. representa o proestro em que há predomínio de células epiteliais nucleadas (seta branca). B. representa o estro, fase na qual as fêmeas se encontram sexualmente receptivas e predominam as células epiteliais cornificadas (seta preta). C. representa o metaestro, fase de transição em que é possível encontrar células epiteliais nucleadas e cornificadas e leucócitos (círculo). D. representa o diestro, última fase do ciclo em que há predomínio de leucócitos. Fonte: adaptado de Byers et al. (2012).

3.5 ANÁLISE DE PROTEÍNAS AUTOFÁGICAS POR WESTERN BLOT

As amostras de hipocampo foram maceradas mecanicamente com um pistilo em tampão de homogeneização contendo tampão de lise RIPA (do inglês *Radio Immuno Precipitation Assay Buffer*, contendo NaCl 150 mM, Triton X-100 1%, Deoxicolato de sódio 0,5%, SDS 0,1%, TRIS 50 mM, pH 8,0), EDTA 5 mM, PMSF 1 mM, NaF 5 mM, Na₃VO₄ 1 mM e coquetel inibidor de proteases. Após a homogeneização, foi feita a dosagem de proteínas totais pelo método colorimétrico de Lowry (LOWRY et al., 1951) que produz uma coloração azul que se intensifica com a quantidade de proteínas que foi medida por espectrofotometria com a Multileitora Infinite M200 TECAN® (Laboratório Multiusuário de Estudos em Biologia – LAMEB, UFSC).

Imediatamente antes da eletroforese, foi adicionado o tampão Laemmli 4x (TRIS-HCl 0,25 M, SDS 8%, 2-mercaptoetanol 20%, glicerol 40% e azul de bromofenol

0,008%) que auxilia no processo de migração da amostra pelo gel de poliacrilamida. Os níveis de proteína foram ajustados para 20 ou 40 µg (dependendo da proteína alvo que foi marcada) e as amostras foram fervidas a 70°C por 10 min.

Após resfriadas, as amostras e o padrão de peso molecular (Precision Plus Protein™ Kaleidoscope™/Bio-Rad®) foram pipetadas em gel de poliacrilamida contendo SDS (SDS-PAGE). Foi feito géis de entrada contendo 4% de acrilamida, no entanto a concentração dos géis de corrida variou de acordo com o peso molecular das proteínas alvo. Assim, as proteínas de alto peso molecular (mTOR, p-mTOR e p-ULK-1) foram separadas por eletroforese em géis de 8% de acrilamida, as proteínas de peso molecular intermediário (beclina-1 e p62) em géis de 12% de acrilamida e a proteína de baixo peso molecular (LC3) em géis de 15% de acrilamida. A seguir, as proteínas foram transferidas para uma membrana de nitrocelulose utilizando o aparelho semi-dry (1,2 mA/cm² por 90 min).

A fim de confirmar a qualidade da transferência, as membranas foram coradas com Ponceau 0,5% e fotografadas. Após serem lavadas com ácido acético 1% e água Milli-Q para retirada do Ponceau, as membranas foram bloqueadas por 1 h com albumina de soro bovino (BSA) 5% diluída em TBS (Tris 10 mM, NaCl 150 mM, pH 7,5). Posteriormente, as membranas foram lavadas com TBS-T (Tween-20 em TBS) e incubadas com os anticorpos primários (Tabela 3) diluídos em BSA 2%, *overnight* a 4°C sob agitação constante. Após a retirada dos anticorpos primários, as membranas foram lavadas com TBS-T e incubadas com os anticorpos secundários conjugados com peroxidase específicos para se ligar a cada anticorpo primário por 1 h em temperatura ambiente sob agitação constante. Após as lavagens, foi adicionado o reagente de detecção da peroxidase super ECL (do inglês, *Excellent Chemiluminescent Substrate*) e a reação de quimiluminescência foi fotodocumentada com o equipamento Chemidoc MP® BIORAD® (LAMEB, UFSC).

Em todas as membranas, foi feita a marcação de β-actina como controle endógeno. Logo, a densidade óptica (DO) das bandas das proteínas alvo foi quantificada usando o Image Lab Software (BIORAD®) e dividida pela DO da β-actina. Os resultados foram expressos como porcentagem em relação ao controle.

Tabela 3. Anticorpos primários e secundários utilizados no Western blot.

Anticorpo Primário	PM (kDa)	Hospedeiro	Diluição	Fornecedor	Referência	Anticorpo Secundário	Diluição	Fornecedor	Referência
Anti-Beclin-1 (D40C5)	60	Rabbit	1 p/ 1000	Cell Signaling	#3495				
Anti-SQSTM1/p62 (D6M5X)	62	Rabbit	1 p/ 2000	Cell Signaling	#23214				
Anti-mTOR	289	Rabbit	1 p/ 1000	Cell Signaling	#2972	Goat Anti-Rabbit, HRP	1 p/ 10.000	Invitrogen	#31466
Anti-phospho-mTOR (Ser2448)	289	Rabbit	1 p/1000	Cell Signaling	#2971				
Anti-LC3A/LC3B	~17 - 19	Rabbit	1 p/ 2000	Invitrogen	#PA1-16931				
Anti-phospho-ULK1 (Ser757)	140-150	Rabbit	1 p/1000	Cell Signaling	#6888				
Anti- β -Actina (8H10D10)	45	Mouse	1 p/ 5000	Cell Signaling	#3700	Goat Anti-Mouse, HRP	1 p/ 10.000	Sigma-Aldrich	#AP308P

Fonte: autora.

3.6 ANÁLISES ESTATÍSTICAS

Foi realizada uma análise exploratória para avaliar a distribuição normal (teste de Shapiro-Wilk) e homogeneidade das variâncias (teste de Levene) para cada variável. Os dados que continham apenas uma variável independente e apresentaram distribuição normal foram avaliados pelo teste *t* de *Student* não pareado ou pareado. Os dados que continham duas variáveis independentes foram avaliados pelo teste de análise de variância (ANOVA) de duas vias, seguido pelo teste de *post-hoc* de Tukey, quando necessário. Os dados de peso corporal foram avaliados pela ANOVA de duas vias de medidas repetidas. Dados identificados como outliers foram retirados das análises. As análises estatísticas e produção de gráficos foram realizadas utilizando o *software* GraphPad Prism® v.8 (GraphPad Software Inc., EUA). Os resultados foram expressos como média \pm erro padrão da média (E.P.M). O valor de $p \leq 0,05$ foi considerado significativo.

4 RESULTADOS

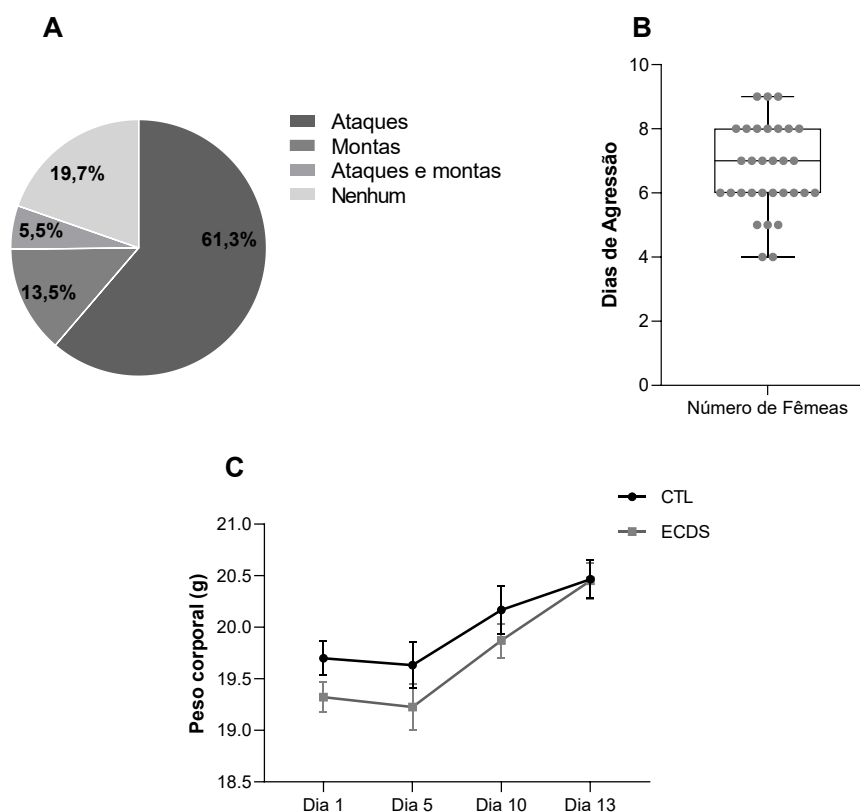
4.1 PADRONIZAÇÃO DE UM MODELO DE ESTRESSE DE DERROTA SOCIAL EM CAMUNDONGOS FÊMEAS

Foi realizada a padronização de um modelo de ECDS em camundongos fêmeas objetivando investigar alterações do comportamento emocional e do mecanismo de autofagia induzidas por esse modelo de estresse psicossocial.

Os resultados apresentados na Figura 10.A demonstram que as fêmeas C57BL/6 (n = 31) foram atacadas pelos machos residentes da linhagem *Swiss* em 61,3% das sessões de contato físico durante os 10 dias de ECDS. Além disso, em 5,5% das sessões ocorreram tanto ataques, quanto tentativas de monta. Em 13,5% das sessões ocorreram apenas tentativas de monta e em 19,7% não ocorreu ataques ou montas (Figura 10.A). Ressalta-se que as sessões de contato físico em que os camundongos machos apresentaram comportamento sexual foram cautelosamente observadas e quando os animais apresentaram comportamento insistente de monta, as sessões foram interrompidas para evitar que as fêmeas ficassem prenhas. Nenhuma das fêmeas exposta ao ECDS ficou prenha durante a realização do protocolo. A Figura 10.B demonstra o número total de dias em que cada fêmea recebeu ataques. Observa-se que as fêmeas foram atacadas no mínimo durante 4 dos 10 dias de ECDS. Das 31 fêmeas, 26 receberam ataques durante 6 ou mais dias.

As fêmeas foram pesadas durante o protocolo de ECDS (dias 1, 5 e 10) e antes da eutanásia (dia 13). A ANOVA de duas vias de medidas repetidas indicou que houve diferença no peso entre os dias de avaliação [$f(2,48, 146,5) = 32,23, p < 0,0001$], mas não entre os grupos experimentais [$f(1, 59) = 1,47, p = 0,23$] (Figura 10.C). Também não houve interação entre as variáveis grupo experimental e o dia da pesagem [$f(3, 177) = 1,12, p = 0,34$]. O *post-hoc* de Tukey indicou que houve um aumento do peso do dia 1 para o dia 13 em ambos os grupos experimentais (CTL: $p = 0,001$; ECDS: $p < 0,0001$), porém do 10 para o dia 13 apenas o grupo ECDS ganhou peso significativamente ($p < 0,0001$).

Figura 10. Caracterização das interações físicas entre os camundongos machos residentes e as fêmeas intrusas e alterações do peso corporal durante o ECDS.

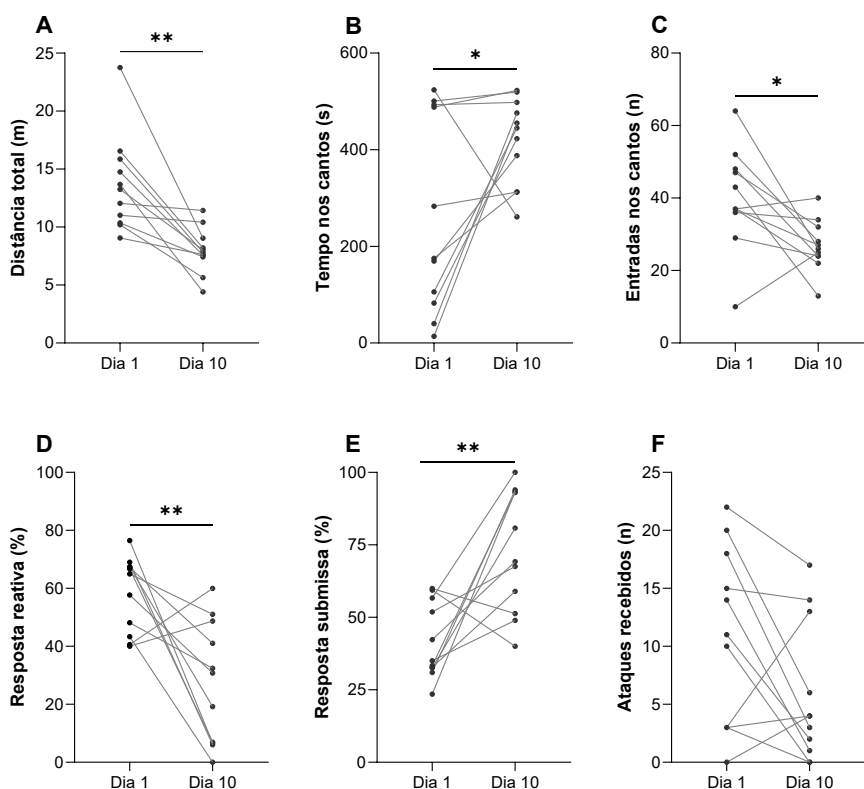


Legenda: A. Porcentagem total de cada tipo de interação física (ataques, montas, ataques e montas ou nenhum) considerando os 10 dias de ECDS ($n = 31$ fêmeas, 10 sessões por fêmea). B. Número total de dias em que cada fêmea recebeu ataques (cada ponto representa uma fêmea) durante o ECDS ($n = 31$). C. Variação do peso corporal das fêmeas durante o ECDS (dias 1, 5 e 10) e no dia da eutanásia (dia 13) avaliada pela ANOVA de duas vias de medidas repetidas seguida pelo *post-hoc* de Tukey. CTL: grupo controle; ECDS: grupo exposto ao estresse crônico de derrota social ($n = 30 - 31$ /grupo).

A Figura 11 apresenta os parâmetros utilizados para avaliar as estratégias de enfrentamento adotadas pelas fêmeas intrusas durante as sessões de interação física com os camundongos residentes machos nos dias 1 e 10 do protocolo de ECDS. Observou-se que houve uma redução da distância total percorrida na área do camundongo residente entre os dias 1 e 10 do ECDS [$t(10) = 4,37$, $p = 0,001$], indicando que houve redução do comportamento exploratório das fêmeas (Figura 11.A). Além disso, houve um aumento no tempo em que as fêmeas passaram nos cantos da área do camundongo residente [$t(10) = 2,39$, $p = 0,038$] e uma redução no número de vezes que as fêmeas entraram nos cantos entre os dias 1 e 10 [$t(10) = 2,82$, $p = 0,018$] (Figura 11.B e C, respectivamente).

Interessantemente, houve uma alteração do tipo de estratégia de enfrentamento adotada pelas fêmeas frente as interações agressivas dos camundongos residentes entre o primeiro e o último dia do protocolo de ECDS. Observou-se uma redução das respostas reativas [$t(10) = 3,51, p = 0,006$] (Figura 11.D) e um aumento das respostas submissas [$t(10) = 3,51, p = 0,006$] (Figura 11.E) quando se comparou o dia 1 e 10. Embora, observou-se que a maioria das fêmeas recebeu menos ataques no dia 10, não houve diferença estatística entre o número de ataques recebidos pela fêmeas entre os dias 1 e 10 [$t(10) = 2,06, p = 0,066$] (Figura 11.F).

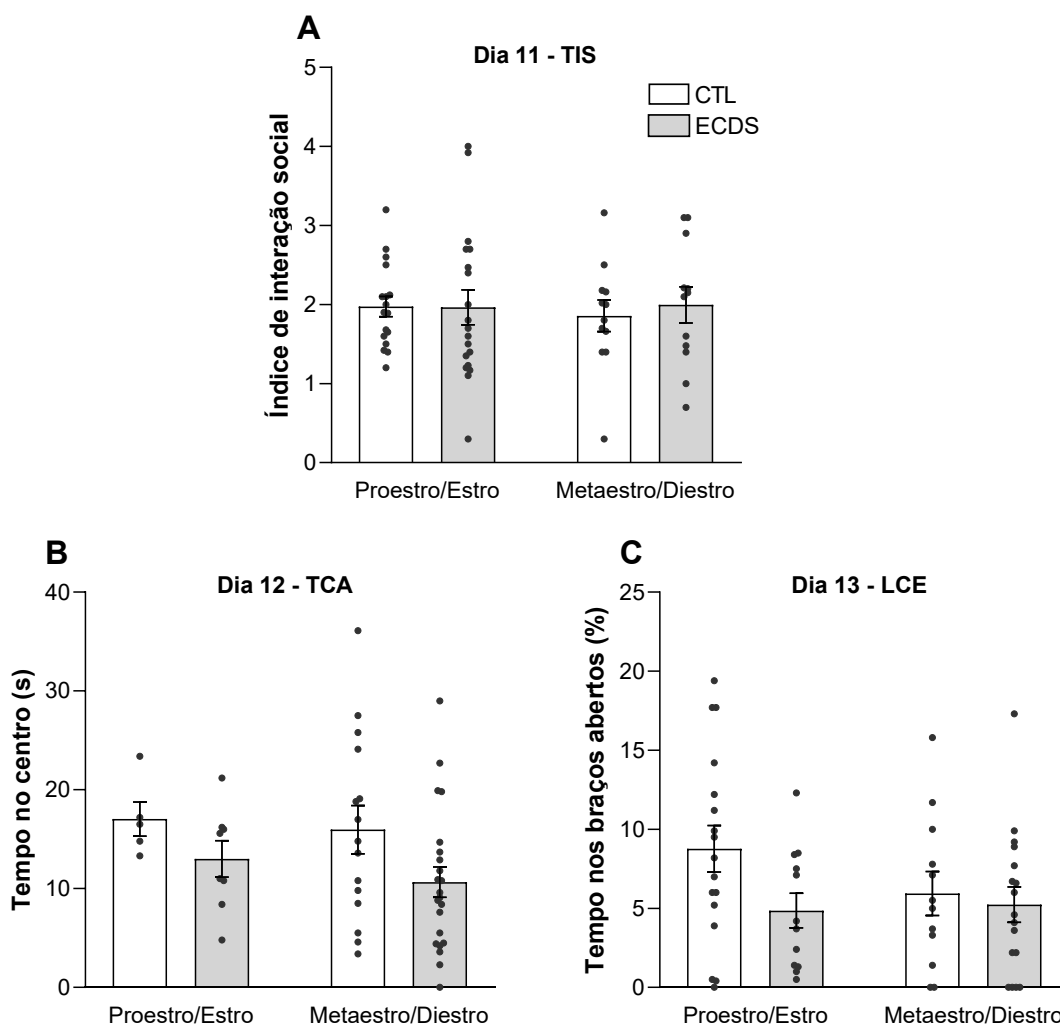
Figura 11. Caracterização das estratégias de enfrentamento adotadas pelas fêmeas durante as sessões de ECDS.



Legenda: O comportamento exploratório e as estratégias de enfrentamento adotadas pelas fêmeas intrusas durante as sessões de interação física com os camundongos residentes foram avaliadas nos dias 1 e 10 de ECDS ($n = 11$). A. Distância total percorrida (em metros) na área do camundongo macho residente. B e C. Tempo gasto (em segundos) e número de entradas nos cantos da área do camundongo residente, respectivamente. D e E. Porcentagem de respostas reativas (i.e., correr ou afastar o camundongo macho com as patas) e submissas (i.e., postura de submissão, imobilidade frente a interação agressiva e lambe o camundongo residente), respectivamente. F. Número de ataques recebidos. Os dados foram comparados pelo teste t de *Student* pareado. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$.

Para verificar se as respostas emocionais adotadas pelos camundongos fêmeas após o ECDS poderiam ter sido afetadas pela fase do ciclo estral, foram coletadas amostras das células do epitélio vaginal que foram espalhadas em esfregaços imediatamente após a realização dos testes comportamentais. As fêmeas dos grupos CTL e ECDS foram divididas nos grupos proestro/estro e metaestro/diestro de acordo com a fase do ciclo estral apresentada em cada dia de teste comportamental. Observou-se que as fases do ciclo estral não influenciaram o índice de interação social obtido no TIS [$f(1,56) = 0,05$, $p = 0,83$] (Figura 12.A), o tempo gasto explorando o centro do aparato no TCA [$f(1, 46) = 0,48$, $p = 0,49$] (Figura 12.B) e o tempo gasto explorando os braços abertos do LCE [$f(1, 54) = 0,84$, $p = 0,36$] (Figura 12.C). Esses resultados indicam que as fases do ciclo estral não influenciaram os principais parâmetros avaliados nos testes comportamentais.

Figura 12. Avaliação de associações entre as fases do ciclo estral e os comportamentos emocionais avaliados após o ECDS.

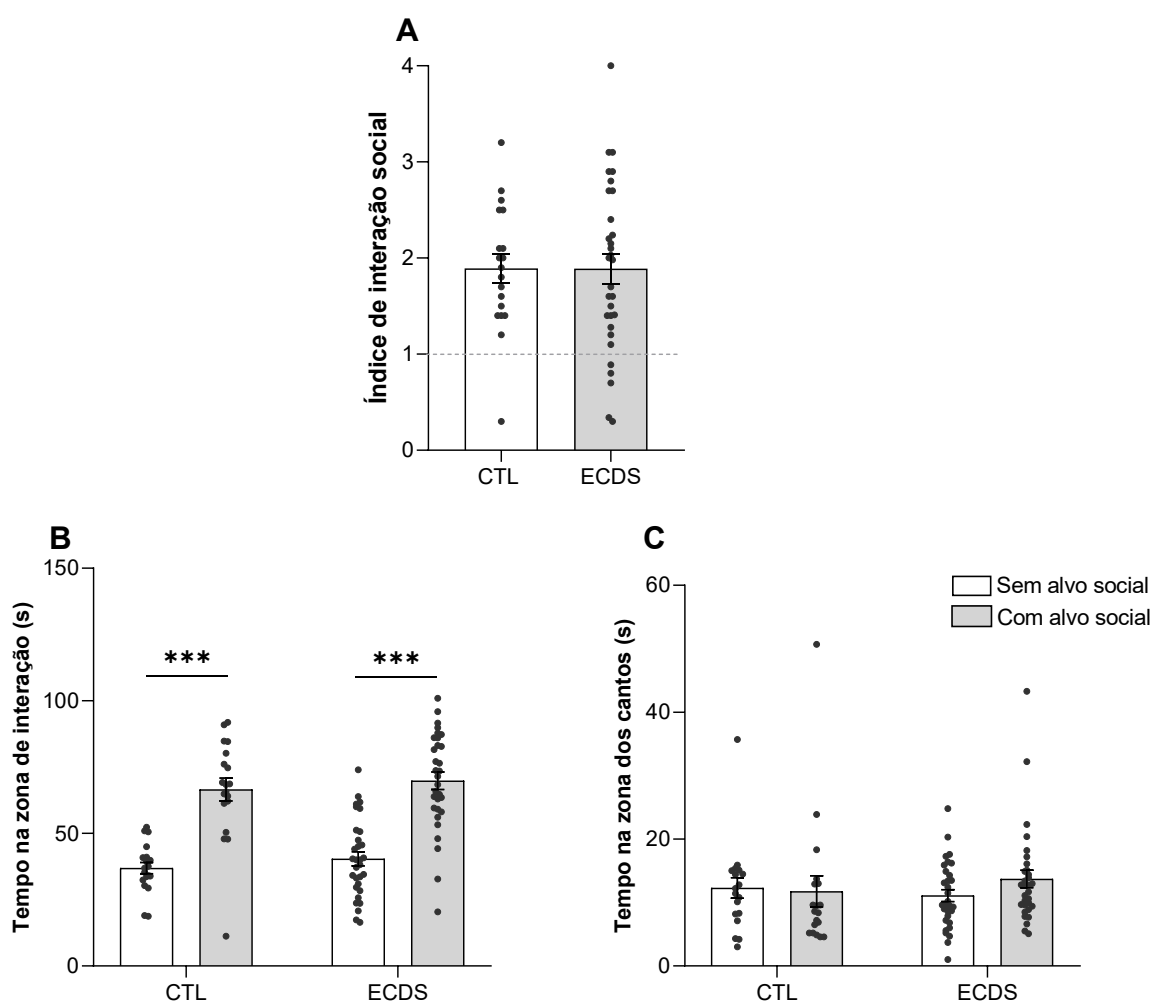


Legenda: As fases do ciclo estral foram agrupadas em proestro/estro e metaestro/diestro. (A) O índice de interação social obtido no teste de interação social (TIS), (B) tempo gasto explorando o centro do aparato no teste do campo aberto (TCA) e (C) tempo gasto explorando os braços abertos do labirinto em cruz elevado foram avaliados de acordo com as fases do ciclo estral das fêmeas dos grupos controle (CTL) e estresse crônico de derrota social (ECDS). Os dados expressos como média \pm E.P.M foram avaliados pela ANOVA de duas vias ($n = 30 - 31$ /grupo).

Um dia após o término do ECDS, as fêmeas dos grupos ECDS e CTL foram avaliadas no TIS (Figura 13). Não houve diferença estatística no índice de interação social entre os grupos experimentais [$t(48) = 0,01$, $p = 0,99$] (Figura 13.A). A ANOVA de duas vias demonstrou que ambos os grupos experimentais gastaram mais tempo explorando a zona de interação social na presença do alvo social [$f(1, 96) = 80,52$, $p < 0,0001$; com alvo $>$ sem alvo] (Figura 13.B). Entretanto, não houve diferença

estatística entre os grupos [$f(1,96) = 1,07, p = 0,30$]. Adicionalmente, não foram observadas diferenças no tempo gasto nos cantos do TIS entre os grupos [$f(1, 96) = 0,06, p = 0,80$] e as fases do teste [$f(1,96) = 0,44, p = 0,51$], ou seja, ambos os grupos gastaram quantidade similares de tempo explorando a zona dos cantos do TIS na ausência e presença do alvo social (Figura 13.C).

Figura 13. Avaliação das respostas comportamentais das fêmeas C57BL/6 expostas ao ECDS no TIS.

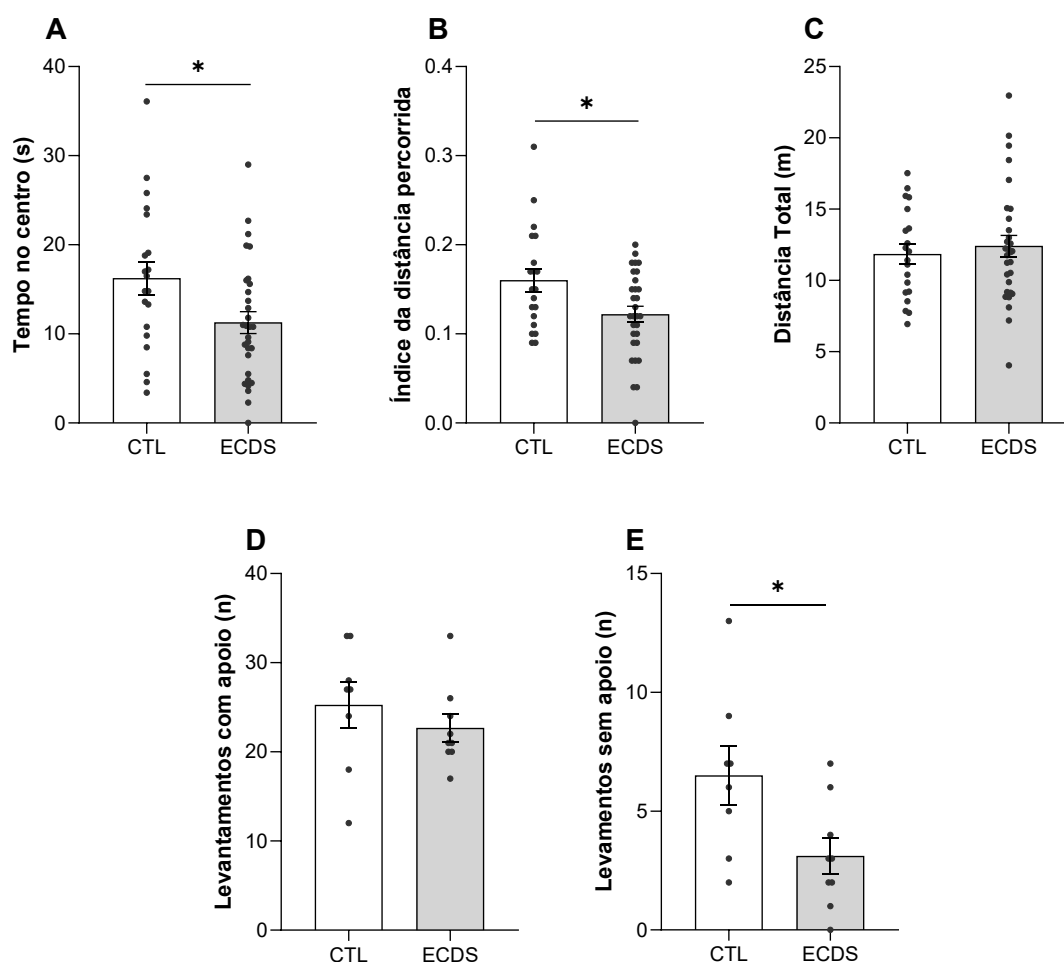


Legenda: A. Índice de interação social (tempo na zona de interação na presença do alvo social dividido pelo tempo na ausência do alvo social). B. Tempo de exploração da zona de interação social. C. Tempo de exploração dos cantos do aparato. Dados expressos como média \pm E.P.M foram analisados pelo teste de *t* de Student ou pela ANOVA de duas vias, seguida pelo *post hoc* de Tukey. *** $p < 0,001$. CTL: grupo controle; ECDS: grupo exposto ao estresse crônico de derrota social ($n = 19 - 31$ /grupo).

A Figura 14 representa os parâmetros comportamentais avaliados no TCA. Observou-se que o grupo ECDS passou menos tempo explorando o centro do aparato comparado ao grupo CTL [$t(48) = 2,33$, $p = 0,02$] (Figura 14.A). Também foi observada uma redução do índice de distância percorrida no centro pelo grupo ECDS [$t(48) = 2,50$, $p = 0,01$], indicando que as fêmeas desse grupo entraram menos vezes no centro do campo aberto (Figura 14.B). Entretanto, não houve diferença na distância total percorrida [$t(48) = 0,51$, $p = 0,61$], indicando que a redução do tempo e entradas no centro do campo aberto não foi devido a prejuízos locomotores no grupo ECDS (Figura 14.C).

Adicionalmente, foi avaliado o número de levantamento apoiados e não apoiados em uma coorte de animais ($n = 8 - 19$ animais/grupo). Não houve alterações no número de levantamentos realizado pelas fêmeas com as patas apoiadas as paredes do aparato [$t(25) = 0,86$, $p = 0,40$] (Figura 14.D), porém observou-se que o grupo ECDS apresentou uma redução do número de levantamentos sem apoio [$t(25) = 2,27$, $p = 0,03$] (Figura 14.E).

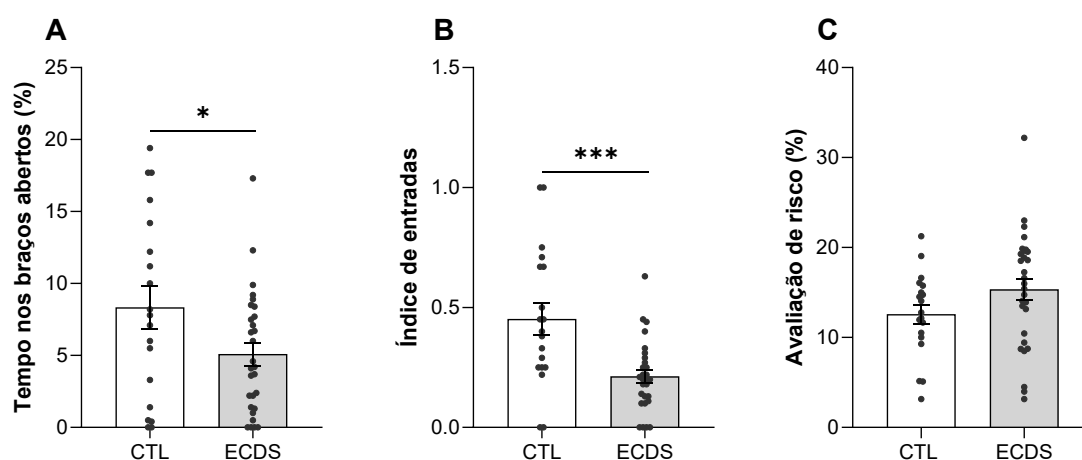
Figura 14. Avaliação do comportamento tipo-ansioso em fêmeas expostas ao ECDS no TCA.



Legenda: A. Tempo gasto explorando o centro do campo aberto. B. Índice da distância percorrida (distância percorrida no centro do aparato dividido pela distância total). C. Distância total percorrida. D. Número de levantamentos com as patas apoiadas nas paredes do aparato. E. Número de levantamentos sem apoiar as patas nas paredes do aparato. Dados expressos como média \pm E.P.M foram analisados pelo teste *t* de *Student* não pareado. * $p < 0,05$. CTL: grupo controle; ECDS: grupo exposto ao estresse crônico de derrota social (n = 8 - 30/grupo).

Os parâmetros comportamentais avaliados no LCE estão representados na Figura 15. Houve uma redução do tempo gasto explorando os braços abertos do aparato [$t(46) = 2,10$, $p = 0,04$] e do índice de entradas no grupo ECDS [$t(45) = 3,74$, $p = 0,0005$], indicando que as fêmeas apresentam comportamento tipo-ansioso neste teste (Figura 15.A e B, respectivamente). Não foi observada diferença estatística no comportamento de avaliação de risco [$t(46) = 1,61$, $p = 0,11$] entre os grupos experimentais (Figuras 15.C).

Figura 15. Avaliação do comportamento tipo-ansioso em fêmeas expostas ao ECDS no LCE.

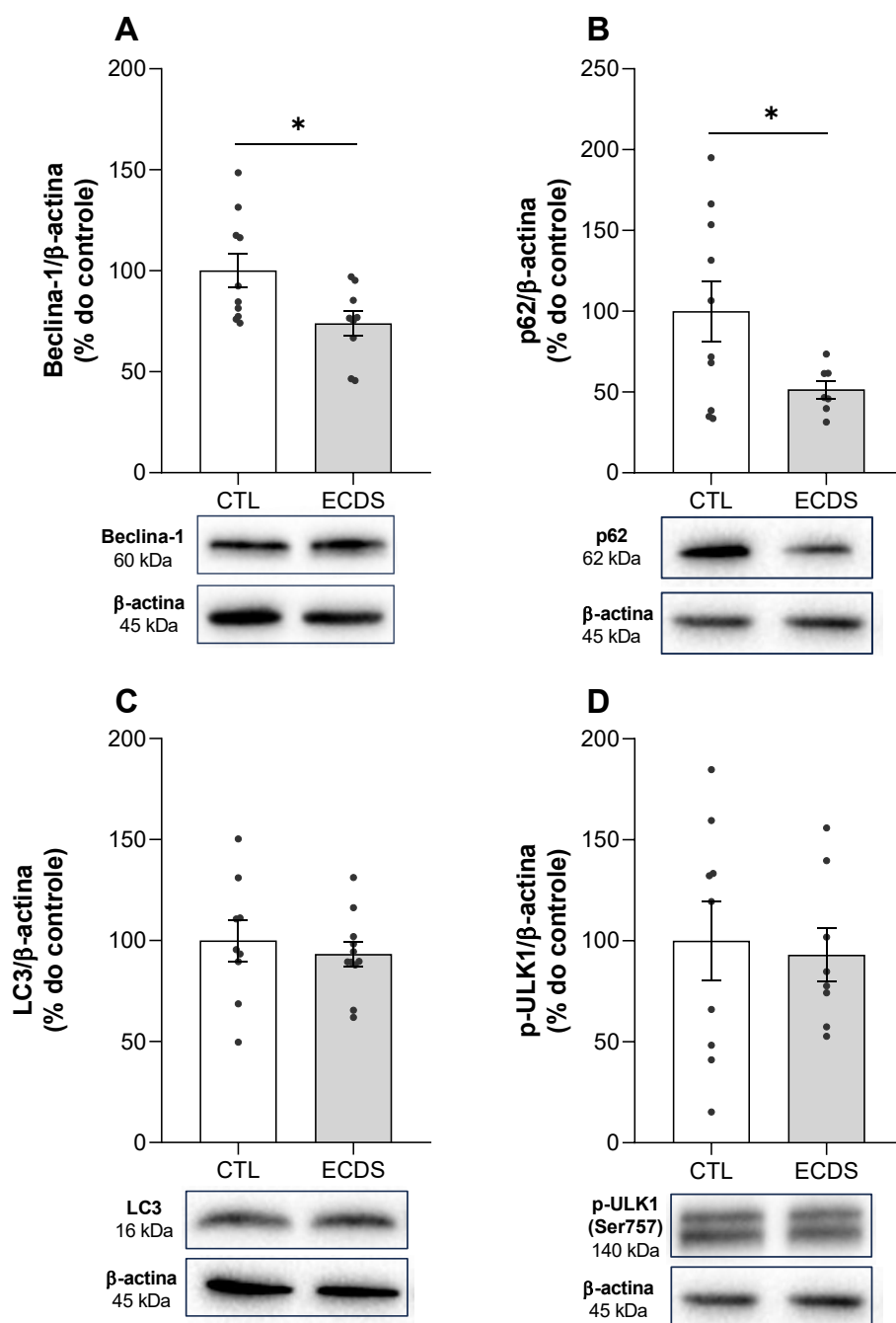


Legenda: A. Porcentagem de tempo gasto explorando os braços abertos do labirinto em cruz elevado (LCE). B. Índice de entradas do LCE (número de entradas nos braços abertos dividido pelo número de entradas nos braços fechados). C. Porcentagem de tempo gasto realizando comportamento de avaliação de risco. Dados expressos como média \pm E.P.M foram analisados pelo teste *t* de *Student* não pareado. * $p < 0,05$, *** $p < 0,001$. CTL: grupo controle; ECDS: grupo exposto ao estresse crônico de derrota social ($n = 19 - 29$ /grupo).

4.2 AVALIAÇÃO DA AUTOFAGIA EM CAMUNDONGOS FÊMEAS EXPOSTAS AO ECDS

A Figura 16 apresenta os níveis das principais proteínas envolvidas no mecanismo de autofagia no hipocampo total de camundongos fêmeas expostas ao ECDS. Foi observado uma redução dos níveis das proteínas beclina-1 [$t(17) = 2,46$, $p = 0,02$] e p62 [$t(15) = 2,10$, $p = 0,05$] (Figura 16.A e B, respectivamente) no hipocampo das fêmeas expostas ao ECDS. Entretanto, não houve alterações do níveis da proteína LC3 [$t(18) = 0,59$, $p = 0,56$] e p-ULK-1 (Ser757) [$t(15) = 0,29$, $p = 0,78$] (Figura 16.C e D, respectivamente).

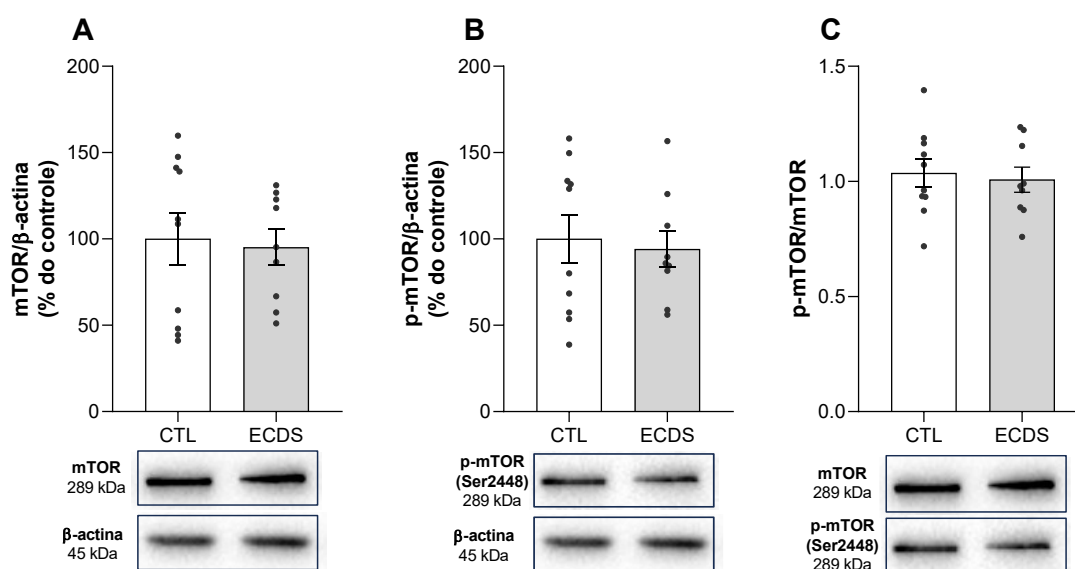
Figura 16. Avaliação dos níveis de proteínas autofágicas no hipocampo de fêmeas expostas ao ECDS.



Legenda: As proteínas autofágicas (A) Beclina-1, (B) p62, (C) LC3 e (D) p-ULK1 foram avaliadas no hipocampo das fêmeas expostas ao ECDS. Dados expressos como média ± E.P.M foram analisados pelo teste *t* de *Student* não pareado. * $p \leq 0,05$. CTL: grupo controle; ECDS: grupo exposto ao estresse crônico de derrota social ($n = 7-11$ /grupo).

Além disso, foram avaliados os níveis das proteínas p-mTOR (Ser2448) e mTOR, envolvidas na regulação negativa da autofagia (Figura 17). Não foram encontradas diferenças nos níveis de mTOR [$t(17) = 0,26$, $p = 0,79$], p-mTOR [$t(17) = 0,33$, $p = 0,74$] ou na razão p-mTOR/mTOR [$t(17) = 0,35$, $p = 0,73$] no hipocampo das fêmeas dos grupos experimentais avaliados (Figura 17.A, B e C, respectivamente).

Figura 17. Avaliação dos níveis de mTOR e p-mTOR no hipocampo de fêmeas expostas ao ECDS.



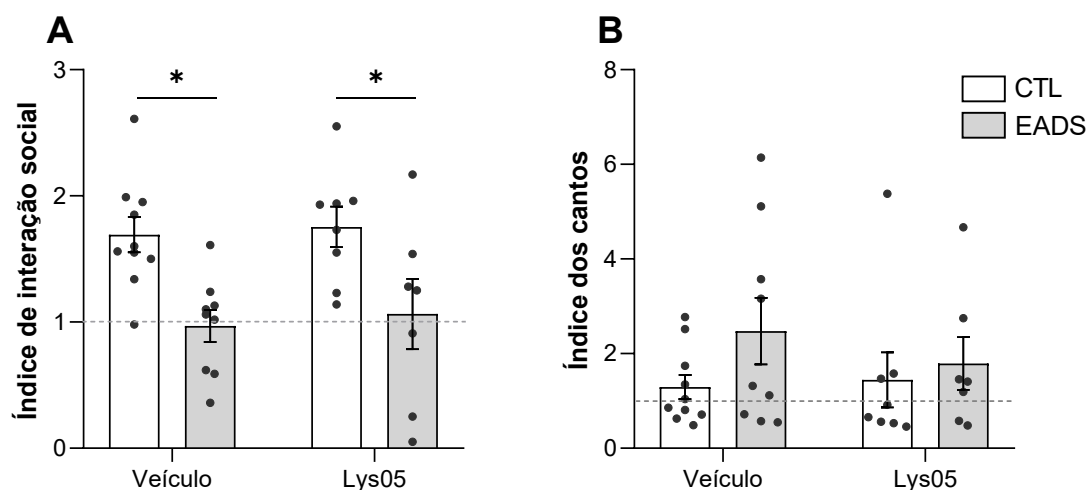
Legenda: A proteína (A) mTOR (forma inativa) e (B) p-mTOR Ser2448 (forma ativa) foram avaliadas no hipocampo das fêmeas expostas ao ECDS. (C) representa a razão entre p-mTOR Ser2448 e mTOR. Dados expressos como média \pm E.P.M foram analisados pelo teste *t* de *Student* não pareado. CTL: grupo controle; ECDS: grupo exposto ao estresse crônico de derrota social ($n = 9-11$ /grupo).

4.3 AVALIAÇÃO DO EFEITO DO EADS ASSOCIADO A ADMINISTRAÇÃO DE UM INIBIDOR AUTOFÁGICO

A Figura 18 representa as respostas comportamentais das fêmeas expostas ao EADS associado ao tratamento com um inibidor farmacológico da autofagia no TIS. A ANOVA de duas vias demonstrou que os grupos expostos ao estresse apresentaram uma redução do índice de interação social [$f(1, 30) = 16,46$, $p = 0,0003$], porém não foi observado efeito do tratamento [$f(1, 30) = 0,20$, $p = 0,66$] ou interação entre o estresse e o tratamento [$f(1, 30) = 0,01$, $p = 0,92$] (Figura 18.A). Esse resultado indica que o EADS aumento o comportamento de esquivamento social. Não foi encontrado efeito

do estresse [$f(1, 30) = 1,99, p = 0,17$], do tratamento [$f(1, 30) = 0,24, p = 0,63$] ou interação entre essas duas variáveis [$f(1, 30) = 0,59, p = 0,45$] no índice de tempo nos cantos do aparato do TIS (Figura 18.B).

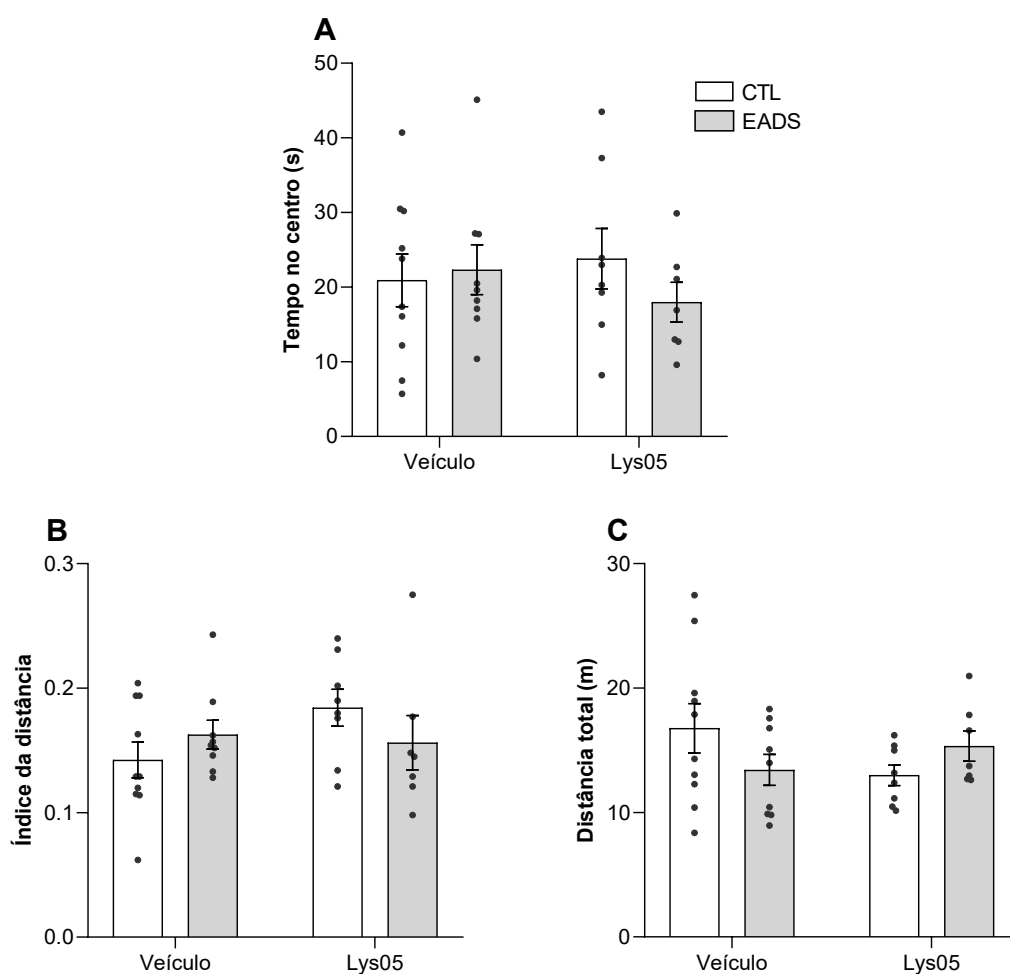
Figura 18. Avaliação das respostas comportamentais das fêmeas expostas ao EADS e tratadas com um inibidor autofágico no TIS.



Legenda: A. Índice de interação social (tempo na zona de interação na presença do alvo social dividido pelo tempo na ausência do alvo social). B. Índice de tempo nos cantos do aparato (tempo nos cantos na presença do alvo social dividido pelo tempo na ausência do alvo social). Dados expressos como média \pm E.P.M foram analisados pela ANOVA de duas vias, seguida pelo *post hoc* de Tukey. * $p < 0,05$. CTL: grupo controle; EADS: grupo exposto ao estresse agudo de derrota social; Veículo: grupo tratado com salina; Lys05: grupo tratado com o inibidor autofágico ($n = 7 - 10$ /grupo).

A Figura 19 representa os parâmetros avaliados no TCA. Não houve efeito do estresse [$f(1, 30) = 0,39, p = 0,54$] ou do tratamento [$f(1, 30) = 0,04, p = 0,84$] no tempo gasto explorando o centro do aparato (Figura 19.A). Além disso não houve efeito da exposição ao estresse e/ou do tratamento no índice da distância [estresse: $f(1, 30) = 0,06, p = 0,80$; tratamento: $f(1, 30) = 1,29, p = 0,26$] (Figura 19.B) e na distância total percorrida [estresse: $f(1, 30) = 0,11, p = 0,74$; tratamento: $f(1, 30) = 0,38, p = 0,54$] (Figura 19.C).

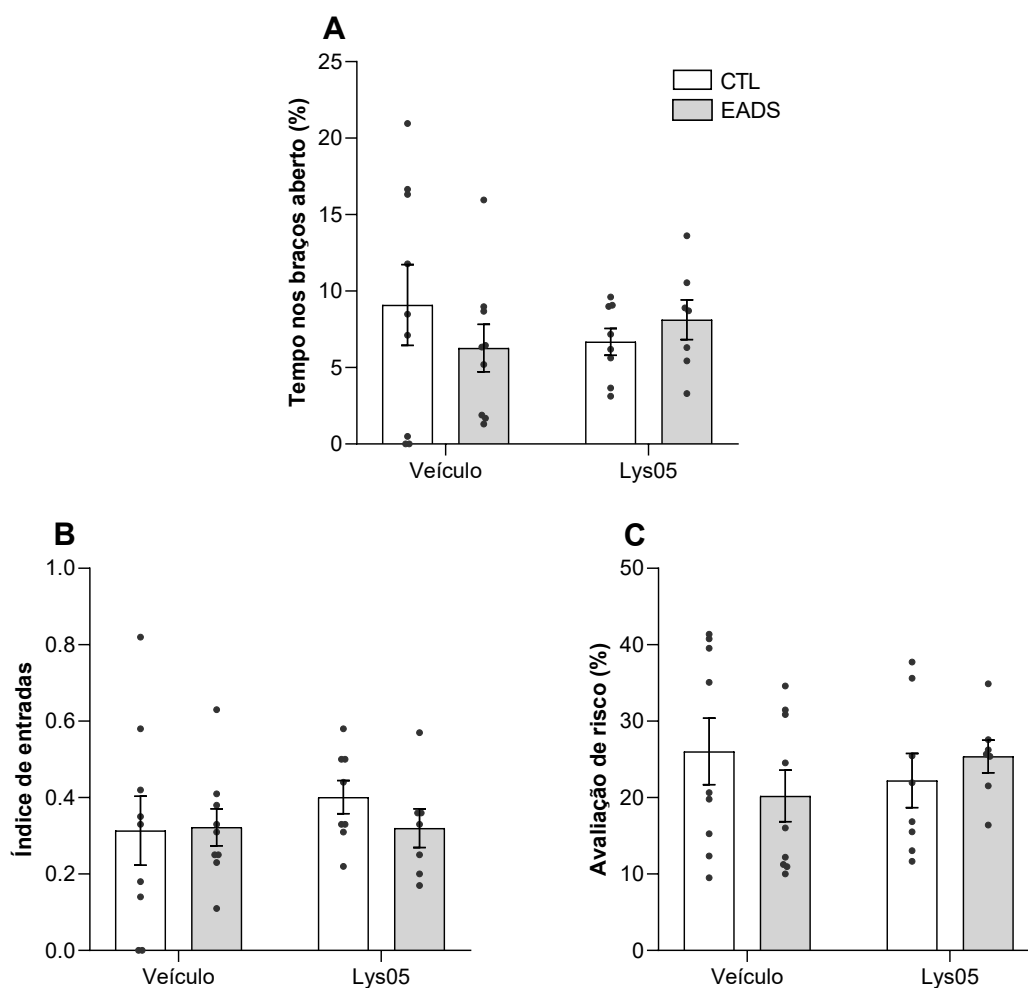
Figura 19. Avaliação do comportamento tipo-ansioso em fêmeas expostas ao EADS e tratadas com um inibidor autofágico no TCA.



Legenda: A. Tempo gasto explorando o centro do campo aberto. B. Índice da distância percorrida (distância percorrida no centro do aparato dividido pela distância total). C. Distância total percorrida. Dados expressos como média \pm E.P.M foram analisados pela ANOVA de duas vias. $p > 0,05$. CTL: grupo controle; EADS: grupo exposto ao estresse agudo de derrota social; veículo: grupo tratado com salina; Lys05: grupo tratado com o inibidor autofágico ($n = 7 - 10$ /grupo).

Os parâmetros comportamentais avaliados no LCE estão representados na Figura 20. A ANOVA de duas vias demonstrou que não houve efeito do estresse e do tratamento no tempo gasto explorando os braços abertos do aparato [estresse: $f(1, 29) = 0,14$, $p = 0,71$; tratamento: $f(1, 29) = 0,02$, $p = 0,88$] (Figura 20.A), no índice de entradas [estresse: $f(1, 29) = 0,32$, $p = 0,57$; tratamento: $f(1, 29) = 0,45$, $p = 0,51$] (Figura 20.B) e no comportamento de avaliações de risco [estresse: $f(1, 29) = 0,14$, $p = 0,71$; tratamento: $f(1, 29) = 0,03$, $p = 0,85$] (Figura 20.C).

Figura 20. Avaliação do comportamento tipo-ansioso em fêmeas expostas ao EADS e tratadas com um inibidor autofágico no LCE.



Legenda: A. Porcentagem de tempo gasto explorando os braços abertos do labirinto em cruz elevado (LCE). B. Índice de entradas do LCE (número de entradas nos braços abertos dividido pelo número de entradas nos braços fechados). C. Porcentagem de tempo gasto realizando comportamento de avaliação de risco. Dados expressos como média \pm E.P.M foram analisados pela ANOVA de duas vias. $p > 0,05$. CTL: grupo controle; EADS: grupo exposto ao estresse agudo de derrota social; Veículo: grupo tratado com salina; Lys05: grupo tratado com o inibidor autofágico ($n = 7 - 10/\text{grupo}$).

Em resumo, os resultados obtidos no TCA e LCE indicam que a exposição ao EADS e o tratamento com o inibidor autofágico não causaram comportamento tipo-ansioso nos camundongos fêmeas avaliados. Entretanto, o EADS induziu comportamento de esquiva social no TIS, porém este comportamento não foi potencializado pela administração do inibidor autofágico.

5 DISCUSSÃO

5.1 PADRONIZAÇÃO DE UM MODELO DE ESTRESSE PSICOSSOCIAL EM CAMUNDONGOS FÊMEAS

A maior parte da informação já coletada em modelos animais sobre os impactos do estresse no SNC e nas respostas comportamentais foi observada em estudos com estressores não sociais, como choque nas patas, imobilização por contenção ou privação de alimento. Entretanto, em humanos, estresses de natureza psicossocial são os mais comuns estressores relacionados a alteração comportamental e desenvolvimento de transtornos psiquiátricos (PATEL et al., 2019). Além disso, observou-se que o estresse crônico imprevisível leve ou tratamento crônico com glicocorticoides induzem morte neuronal hipocampal, que não é observado em animais expostos a derrota social (CHATTARJI et al., 2015). Portanto, faz-se necessário mais estudos com modelos de estresse psicossocial como a derrota social, a fim de melhor caracterizar mudanças específicas que ocorrem nesses modelos.

Embora os transtornos mentais comuns, como o TDM e os transtornos de ansiedade sejam mais prevalentes em mulheres, existem poucos estudos que descrevem os efeitos do estresse de derrota social em roedores fêmeas, pois estas geralmente apresentam menos comportamento territorial e agressivo (BEERY & KAUFER, 2015; HAMMELS et al., 2015). Portanto, um dos nossos objetivos foi padronizar um modelo de ECDS em camundongos fêmeas que fosse simples e fácil de ser reproduzido para posteriormente investigar as associações entre os efeitos do estresse psicossocial crônico nas respostas emocionais e mecanismos de autofagia. Para isso, foi feita uma adaptação do modelo de ECDS em fêmeas proposto por Harris e colaboradores (2018). Em resumo, este modelo baseou-se na aplicação de odorantes e feromônios presentes na urina de camundongos machos nas fêmeas intrusas para induzir comportamento agressivo nos camundongos machos residentes.

Neste estudo, foi observado que a maioria das fêmeas receberam ataques durante 6 ou mais dias de ECDS. Resultados similares foram encontrados por Harris e colaboradores (2018) que observaram uma mediana de 5 dias de ataque durante a realização do ECDS. Além disso, observamos que todas as fêmeas do grupo ECDS receberam ataques em pelo menos 4 dias de protocolo. Estes resultados também

estão de acordo com os achados de Harris e colaboradores (2018) que observaram que 4 dias de agressão foi a quantidade mínima de dias capaz de promover prejuízo na performance das fêmeas nos testes que avaliaram o comportamento emocional. Adicionalmente, Takahashi e colaboradores (2017) demonstraram que tanto as fêmeas suscetíveis, quanto as resilientes receberam ataques em média durante 5 dias de um protocolo de ECDS de 10 dias em que os machos foram submetidos a ativação quimiogênica da VMHvl para aumentar o comportamento agressivo direcionado as fêmeas intrusas.

Quando avaliado o tipo de interação física entre os camundongos machos residentes e as fêmeas intrusas durante o ECDS, foi observado que em 61,3% das sessões ocorreram apenas ataques e em 5,5% ocorrem ataques e tentativas de montas durante a mesma sessão. Estes resultados corroboram os achados de Van Doeselaar e colaboradores (2020) que relataram que fêmeas intrusas que receberam a aplicação de urina foram atacadas pelos machos residentes em 60% das sessões de confronto em um protocolo de 21 dias de ECDS.

Alterações no peso corporal são comumente avaliadas em estudos que investigam os efeitos do estresse crônico (HARRIS, 2015). Entretanto, nós não observamos alterações do peso no grupo ECDS comparado ao grupo CTL durante o protocolo. Estes resultados contrastam com os achados de Van Doeselaar e colaboradores (2021) que observaram um aumento do peso nas fêmeas a partir do décimo quinto dia de um protocolo de ECDS de 21 dias. Adicionalmente, Takahashi e colaboradores (2017) observaram uma redução do ganho de peso nas fêmeas suscetíveis comparadas as fêmeas controles e resilientes durante um protocolo de ECDS modificado de 10 dias em que não foi feita a fase de contato sensorial. Apesar de vários estudos associarem o estresse crônico psicossocial com a redução do peso corporal inclusive no modelo de ECDS (para revisar consultar HARRIS et al., 2015), Krishnan e colaboradores (2007) observaram que apenas os machos suscetíveis ao ECDS apresentaram redução do peso corporal. Portanto, as divergências encontradas nos estudos que investigaram alterações do peso em fêmeas expostas ao ECDS podem ter ocorrido devido ao fenótipo dos animais, além de diferenças nos protocolos experimentais, como o tempo de exposição ao estresse e a presença ou não da fase de contato sensorial.

Ao avaliarmos o comportamento das fêmeas intrusas durante as sessões de contato físico do primeiro e do último dia de ECDS, foi observado que houve uma redução da distância total percorrida na área do camundongo residente indicando uma redução do comportamento exploratório dessas fêmeas. Além disso, houve uma diminuição do número de entradas e um aumento no tempo em que fêmeas passaram nos cantos da área do camundongo residente quando comparamos os dados do dia 1 e 10.

Os roedores apresentam um comportamento natural de intensa exploração de ambientes novos. Em situações normais, ao serem submetidos a um ambiente novo e exposto, os roedores tendem a explorar mais a zona periférica próxima as paredes do aparato nos minutos iniciais do teste e posteriormente exploram as áreas mais expostas. Este comportamento de permanecer próximo às paredes do aparato é chamado tigmotaxia e está associado ao comportamento tipo-ansioso (SIMON et al., 1994). Portanto, os resultados obtidos em relação a redução da exploração da área do residente e maior tempo gasto nos cantos desta área podem ser um indicativo de um aumento no comportamento tipo-ansioso decorrente do ECDS.

Adicionalmente, foi observado uma mudança no tipo de estratégia de enfrentamento adotada frente ao ECDS. Enquanto no dia 1 houve um predomínio de respostas reativas frente as interações agressivas dos machos residentes, no dia 10 as respostas submissas predominaram. Em situações de confronto em espaços pequenos e inescapáveis, é comum que os roedores adotem estratégias para minimizar a interação com agressor, como postura de submissão. Além disso, em situações de confronto subsequentes, os roedores submissos tendem prontamente a evitar as áreas de maior interação com os agressores e quando confrontados, rapidamente assumem postura de submissão na tentativa de evitar os ataques (DIAZ & LIN, 2020). Portanto, a mudança de perfil das respostas defensivas das fêmeas no decorrer da exposição ao ECDS observada no presente estudo, demonstra que as fêmeas foram capazes de aprender e adaptar o seu comportamento para evitar o confronto com os camundongos residentes.

O TIS é comumente utilizado para avaliar as alterações comportamentais promovidas pelo ECDS, pois além de permitir a investigação do comportamento de esquiva social, também é capaz de gerar o índice de interação social, que pode ser

utilizado para classificar os animais de acordo com os fenótipos de resiliência ou suscetibilidade ao estresse (BERTON, 2006; GOLDEN et al., 2011; KRISHNAN et al., 2007). Além disso, prejuízos nas interações sociais de camundongos podem ser associadas à redução na sociabilidade observada em pacientes com TDM e transtornos de ansiedade (CRASKE et al., 2017; PORCELLI et al., 2019). É descrito na literatura que 40% a 60% dos machos expostos ao ECDS apresentam índice de interação social menor que 1, indicando que estes animais evitam explorar a área do aparato próxima ao camundongo alvo social e por isso, são classificados como suscetíveis ao estresse (KRISHNAN et al., 2007; WANG, et al., 2021). Os animais que obtém índice igual ou maior que 1 são classificados como resilientes ao estresse, pois exploram a zona de interação de maneira semelhante aos controles não estressados (GOLDEN et al., 2011).

Interessantemente, nós observamos que apenas 5 fêmeas (16%) das 31 expostas ao ECDS apresentaram índice de interação social menor que 1. Este resultado contrasta com os achados de Harris e colaboradores (2018) que observaram que 58% das fêmeas expostas ao ECDS foram classificadas como suscetíveis. Por outro lado, Takahashi e colaboradores (2017) reportaram que menos de 20% das fêmeas atacadas por machos submetidos a ativação da VMHvl durante um protocolo de ECDS de 10 dias com fase de interação física e sensorial, apresentaram fenótipo de suscetibilidade ao estresse (TAKAHASHI et al., 2017). Além disso, Furman e colaboradores (2022) observaram que a maioria das fêmeas expostas a um modelo de estresse crônico social que combinou o confronto residente-intruso, estresse de superlotação e instabilidade social apresentaram índice de interação social maior que 1, mas diferente estatisticamente do grupo controle. Por outro lado, os autores observaram que a maioria dos machos expostos a um modelo modificado de ECDS apresentaram índice de interação social menor que 1 (FURMAN et al., 2022).

Esses resultados sugerem que camundongos fêmeas e machos se comportam de maneira diferente quando avaliados ao TIS e que parâmetros de sociabilidade podem não estar no cerne dos efeitos do estresse crônico em fêmeas. Interessantemente, homens e mulheres apresentam diferenças no comportamento social. Sugere-se que mulheres apresentam capacidade de sociabilidade superior à dos homens, que estaria associada ao sucesso reprodutivo e ao desenvolvimento

cognitivo e social da prole (ALTEMUS et al., 2014). Além disso, existem diferenças nos sintomas apresentado por homens e mulheres com transtornos mentais comuns. Por exemplo, mulheres diagnosticadas com TDM, apresentam maior severidade dos sintomas que estão relacionados ao aumento do apetite, peso, sonolência excessiva, sensibilidade interpessoal e sintomas gastrointestinais, além de maior comorbidade com transtornos de ansiedade (MARCUS et al., 2008).

Além disso, Takahashi e colaboradores (2017) teorizaram que a fase de contato sensorial presente nos modelos clássicos de ECDS em machos não representaria um período aversivo para camundongos fêmeas, uma vez que os machos liberam feromônios e emitem vocalizações que atraem e alteram a receptividade sexual das fêmeas. Os autores demonstraram que 50% das fêmeas expostas apenas à fase de confronto físico do ECDS apresentaram comportamento de esquiva social e foram classificadas como suscetíveis no TIS (TAKAHASHI et al., 2017). Adicionalmente, (Yin e colaboradores (2019) observaram que fêmeas agrupadas em trios que foram atacadas por machos expostos a ativação quimiogenética da VMHvl durante seis sessões de 30 min apresentaram comportamento tipo-ansioso e esquiva social no TIS.

Outro ponto a ser considerado, é que fêmeas da espécie hamster sírio apresentaram efeitos menos pronunciados do ECDS comparadas aos machos. Enquanto os machos geralmente apresentam comportamentos de submissão durante o teste residente-intruso, as fêmeas apresentaram comportamento agressivo frente ao intruso, reforçando que as respostas ao estresse são sexo-específicas (HUHMAN et al., 2003). Adicionalmente, Solomon, (2017) discute a validade de utilizar o tempo gasto explorando a zona de interação social como medida de preferência ou esquiva social, uma vez que o animal estar dentro da zona de interação, não significa necessariamente que ele está interagindo com o alvo, ou seja, o animal podem estar em imobilidade ou fazendo posturas de alongamento que indicam avaliação de risco. Logo, seria interessante avaliar os outros parâmetros durante o TIS.

Embora as fêmeas expostas ao ECDS não tenham apresentado comportamento de esquiva social não sendo possível classificá-las utilizando o índice de interação social, elas apresentaram comportamento tipo-ansioso robusto quando avaliadas no TCA e LCE. Ambos os testes se baseiam no conflito entre o impulso

natural dos roedores de explorar ambientes desconhecidos e a aversão a áreas expostas e claras, como o centro do TCA e os braços abertos do LCE (CAROLA et al., 2002).

No presente estudo, observou-se que as fêmeas expostas ao ECDS exploraram por menos tempo e percorreram uma distância menor no centro do aparato do campo aberto, indicativos de comportamento tipo-ansioso. Ressalta-se que esta redução da exploração do centro do campo aberto não foi relacionada a prejuízos locomotores, uma vez que não houve diferença na distância total percorrida entre os grupos ECDS e CTL. Além disso, foi observado uma redução do número de levantamentos sem apoio no grupo ECDS quando comparado ao grupo controle, mas não houve diferença entre os grupos no número de levantamentos com apoio. Enquanto o levantamento com as patas apoiadas às paredes do aparato (do inglês, *supported rears*) está relacionado a atividade locomotora, o levantamento sem apoio (do inglês, *unsupported rears*) relaciona-se ao comportamento emocional e sua redução é associada ao comportamento tipo-ansioso (STURMAN et al., 2018; WHIMBEY & DENENBERG, 1967). Portanto, os resultados da avaliação do levantamento com e sem apoio evidenciam que o ECDS induziu comportamento tipo-ansioso no TCA.

Já no teste do LCE, observou-se uma diminuição da porcentagem de tempo que as fêmeas do grupo ECDS gastaram explorando os braços abertos do aparato. Além disso, foi demonstrado um índice de entradas reduzido indicando que as fêmeas expostas ao estresse entraram menos vezes nos braços abertos. Portanto, esses resultados corroboram os resultados obtidos no TCA, demonstrando que o grupo ECDS apresentou comportamento tipo-ansioso em ambos os testes.

Além disso, os resultados observados neste estudo corroboram estudos prévios que demonstraram uma redução do tempo gasto explorando os braços abertos do LCE e o centro do campo aberto em fêmeas expostas ao ECDS comparadas ao grupo controle, mas não entre as fêmeas que apresentaram fenótipo de suscetibilidade e resiliência ao estresse (HARRIS et al., 2018; TAKAHASHI et al., 2017; VAN DOESELAR et al., 2020; YIN et al., 2019). Adicionalmente, o comportamento tipo-ansioso induzido pelo ECDS é amplamente observado em roedores machos (HING et al., 2018; HUANG, et al., 2013; KRISHNAN et al., 2007).

Assim como observado nas fêmeas, tanto os machos suscetíveis, quanto os resilientes apresentam comportamento tipo-ansioso. Enquanto geralmente o comportamento tipo-depressivo manifesta-se apenas nos animais suscetíveis (WANG et al., 2021).

Para investigar se as respostas emocionais das fêmeas nos testes comportamentais poderiam ter sido influenciadas pelas variações dos hormônios sexuais durante as fases do ciclo estral, nós avaliamos a fase do ciclo estral em que se encontrava cada fêmea no dia de cada teste comportamental. Posteriormente, as fêmeas dos grupos CTL e ECDS foram subdivididas em dois grupos de acordo com as fases do ciclo (proestro/estro e metaestro/diestro) e avaliou-se o efeito das fases nos principais parâmetros comportamentais avaliados em cada teste: índice de interação social obtido no TIS, tempo no centro do TCA e tempo nos braços abertos no LCE. Entretanto, observou-se que nenhum dos parâmetros investigados foi influenciado pela fase do ciclo estral. Harris e colaboradores (2018) também não observaram influência das fases do ciclo estral no tempo gasto explorando a zona de interação do TIS nos grupos CTL e ECDS.

5.2 AVALIAÇÃO DA AUTOFAGIA EM CAMUNDONGOS FÊMEAS EXPOSTAS AO ECDS

Após a padronização do modelo de ECDS e a caracterização das repostas emocionais, foi avaliado os níveis de proteínas autofágicas no hipocampo dos camundongos fêmeas.

O hipocampo de roedores pode ser subdividido funcionalmente nas porções dorsal e ventral que correspondem as porções hipocampais posterior e anterior, respectivamente, em humanos. Enquanto, a porção dorsal ou posterior é funcionalmente associada a regulação da cognição e memória espacial, a porção ventral ou anterior é associada a modulação dos processos emocionais e afetivos (FANSELOW & DONG, 2010). Além disso, a formação hipocampal apresenta diferentes regiões, como o giro denteado e as regiões CA1, CA2 e CA3, que apresentam diferentes funções associadas ao processamento e manutenção das memórias e respostas emocionais (GIAP et al., 2000).

Modelos de estresse crônico psicossocial causam alteração hipocampal em roedores, como diminuição do volume hipocampal, decorrente da atrofia dendrítica de neurônios piramidais das regiões CA1 e CA3, que pode se manter mesmo depois do estresse ser cessado (PATEL et al., 2018). Também ocorre diminuição da densidade espinhal dendrítica de neurônios das regiões CA1 e CA3 (QU et al., 2018). Em modelos de estresse mais crônicos (5 semanas), a diminuição do volume também é associada a redução no número e volume de astrócitos presentes, mostrando alteração tanto neuronal quanto glial (CZÉH et al., 2005). Alterações similares foram observadas em humanos e foram associadas a sintomas depressivos e ansiosos apresentados por indivíduos que foram expostos a estressores psicossociais intensos (SOETANTO et al., 2010).

Em camundongos machos, o estresse crônico de derrota social provocou alterações hipocampais decorrentes do aumento de mitofagia e autofagia em neurônios, acarretando em inibição do desenvolvimento neuronal (GUO et al., 2022). Também foi demonstrado que a indução da autofagia, por repressão de mTORC1, promoveu o aumento da expressão e translocação de NR2B (subunidade de NMDA) no hipocampo, reprimindo a expressão de aquaporina 4 na membrana neuronal, o que aliviou sintomas tipo-depressivos em camundongos machos submetidos a derrota social (LIU et al., 2022). Esses estudos reforçam a importância da autofagia hipocampal na regulação das respostas emocionais frente a estressores psicossociais.

A ULK1 é uma proteína cinase que fosforila resíduos de serina/treonina. Em situações de pouca disponibilidade de nutrientes ou estresse na célula, a ULK1 é fosforilada nos resíduos de serinas 317 e 777, sendo ativada e iniciado a autofagia por meio da fosforilação do complexo VPS34-beclina-1. Entretanto, em situações em que a autofagia não é necessária, como por exemplo, quando há alta disponibilidade de nutrientes na célula, a ULK1 é fosforilada no resíduo de serina 757 pelo mTORC1 sendo desativa (KIM et al., 2011). Portanto, tanto a ULK1 quanto a beclina-1 são proteínas que participam do estágio inicial da autofagia, ou seja, da mobilização de moléculas para montagem do fagóforo (MENON & DHAMIJA, 2018). Neste estudo, não foi observado alterações da p-ULK 757, ou seja, da forma inativa da ULK-1, sugerindo que o ECDS não alterou a fosforilação dessa proteína no hipocampo dos

camundongos fêmeas. Por outro lado, observou-se uma redução dos níveis de beclina-1 no grupo ECDS, indicando um possível comprometimento do início da autofagia.

A proteína p62 se encontra na membrana do autofagossomo auxiliando o processo de reconhecimento, sequestro e degradação de componentes celulares específicos (SABBIETI et al., 2022). Redução dos níveis de p62 é geralmente associado a indução da autofagia e aumento do fluxo autofágico, uma vez que a p62 é degradada juntamente com conteúdo sequestrado pelos autofagolisossomos (KLIONSKY et al., 2016). Neste estudo foi observado uma redução dos níveis de p62 no hipocampo das fêmeas expostas ao ECDS, o que poderia sugerir um aumento do fluxo autofágico. Esse resultado contrasta com o achado de que também houve uma redução dos níveis de beclina-1. Entretanto, já foi demonstrado que a diminuição dos níveis de p62 também pode estar associado a um bloqueio da autofagia devido a um aumento da degradação dessa proteína e de outras proteínas autofágicas por caspases e calpaínas (SCOTT et al., 2000). Resultados similares foram encontrados em estudos que utilizaram modelos de neuroinflamação com administração de lipopolissacarídeo ou corticosterona para induzir alterações do comportamento emocional em camundongos; logo, apesar de serem modelos diferentes, os resultados se complementam (GHOSH et al., 2020; GULBINS et al., 2018).

Durante a expansão da membrana do fagóforo ocorre a conjugação da proteína LC3-I citosólica (16 – 18 kDa) com fosfatidiletanolamina formando a LC3-II (14 – 16 kDa) que permanece associada a membrana do fagóforo mesmo após o seu fechamento. Assim, a LC3-II é amplamente utilizado como marcador de autofagossomos. No presente estudo, não foi possível detectar ambas as formas da LC3. Como as duas formas apresentam massas moleculares próximas, acreditamos que pela posição da banda na membrana em relação ao padrão de peso molecular, a forma detectada foi a LC3-I, porém não foi observado diferenças nos níveis dessa proteína entre os grupos experimentais. Já foi relatado que o tecido cerebral apresenta uma alta proporção de LC3-I para LC3-II, dificultando a detecção da LC3-II em amostras de homogenato total (YANG, et al., 2011). Além disso, a banda de LC3-I em experimentos de *Western blot* podem apresentar alta intensidade devido a maior quantidade dessa proteína no tecido cerebral obscurecendo e atrapalhando a

identificação da banda de LC3-II (CHU et al., 2009). Outro fator que pode ter contribuído para a ausência da banda da LC3-II em nosso experimento, é fato de que degradação da LC3-II é mais rápida do que a degradação da LC3-I (KLIONSKY et al., 2016).

Por fim, nós não observamos diferenças nos níveis de mTOR e p-mTOR (Ser2448) ou na razão p-mTOR/mTOR entre os grupos experimentais. A mTOR é uma proteína cinase que fosforila resíduos de serina/treonina. Essa proteína funciona como sensor de ATP e aminoácidos, identificando mudanças na disponibilidade de nutrientes e crescimento celular (DELEYTO-SELDAS & EFEYAN, 2021). Quando há ATP e nutrientes suficientes, a p-mTOR (Ser2448) inibe a autofagia por meio da fosforilação da ULK1 no resíduo de serina 757 (NAVE et al., 1999; WANG, Ying; ZHANG, 2019). Portanto, os nossos resultados demonstram níveis comparáveis de p-mTOR/mTOR entre os grupos CTL e ECDS, sugerindo que essas proteínas se encontram em níveis basais.

5.3 AVALIAÇÃO DO EFEITO DO EADS ASSOCIADO A ADMINISTRAÇÃO DE UM INIBIDOR AUTOFÁGICO

A fim de investigar mais a fundo o papel da autofagia nas respostas ao estresse psicossocial em camundongos fêmeas, nós associamos a exposição à um EADS com a administração de um inibidor autofágico.

O modelo de EADS composto por três sessões de 5 minutos de confronto físico realizadas em um mesmo dia é descrito na literatura como um estressor submáximo que *per se* não é capaz de promover esquiva social e alterações de outras respostas comportamentais em camundongos machos. Porém, esse modelo aumenta a suscetibilidade dos animais quando pareado a outros estímulos estressores (FRANCIS et al., 2015; GROSSMAN et al., 2022; KIM, et al., 2022).

Nos camundongos fêmeas, nós observamos que o EADS *per se* foi suficiente para induzir comportamento de esquiva social no TIS, porém não promoveu comportamento tipo-ansioso no TCA e LCE. Este resultado sugere que o comportamento de interação social em resposta ao EADS é sexo específica,

reforçando a necessidade de se investigar os efeitos do estresse psicossocial em modelos animais em ambos os sexos.

Por outro lado, nós não observamos um efeito do inibidor farmacológico da autofagia, o Lys05, nas respostas emocionais das fêmeas. Além disso, o tratamento com o Lys05 não foi capaz de potencializar ou prevenir o efeito do EADS no comportamento de esquiva social.

O fármaco Lys05 consiste em um dímero de moléculas de cloroquina, que se acumula seletivamente em altos níveis no interior dos lisossomos, causando um aumento do pH no interior destas organelas, e consequentemente a desativação das enzimas lisossomais. Nós optamos por utilizar este fármaco neste ensaio, pois sua potência de inibição da autofagia é 10 vezes maior que a potência da cloroquina e a hidroxicloroquina, fármacos comumente utilizados em ensaios *in vitro* e *in vivo* de inibição autofágica (AMARAVADI & WINKLER, 2012; MCAFEE et al., 2012). A princípio este fármaco foi sintetizado para ser testado como terapia antitumoral em modelos animais de diversos tipos de câncer. No entanto, até o presente momento, poucos estudos investigaram os efeitos do tratamento com o Lys05 em animais (DEVORKIN et al., 2017; MCAFEE et al., 2012; NDOYE et al., 2017). Adicionalmente, nenhum estudo avaliou o efeito desse fármaco nas respostas emocionais de camundongos.

Deste modo, nós determinamos a dose e o regime de tratamento adotados baseando-se nos poucos estudos que testaram esse fármaco em animais. McAfee e colaboradores (2012) demonstraram que as doses de 10 e 40 mg/kg, i.p., foram suficientes para promover redução do crescimento tumoral de forma dose-dependente sugerindo inibição da autofagia. Além disso, as doses de 10 e 40 mg/kg foram bem toleradas pelos camundongos, porém doses acima de 76 mg/kg causaram toxicidade. Posteriormente, outros estudos avaliaram os efeitos antitumorais do tratamento com Lys05 20 mg/kg, i.p., uma vez ao dia durante 13 a 18 dias em animais com melanoma e câncer de ovário, observando inibição autofágica consistente (DEVORKIN et al., 2017; NDOYE et al., 2017).

Nós tratamos as fêmeas com Lys05 na dose 20 mg/kg, i.p., por 3 dias anteriormente a exposição ao EADS. Portanto, é possível que a ausência de efeito da inibição autofágica nas respostas emocionais seja devido a um regime de tratamento

insuficiente. Logo, é necessário a realização de experimentos adicionais, como a avaliação de proteínas autofágicas, para confirmar se a autofagia foi eficientemente bloqueada.

6 CONCLUSÃO

O modelo de ECDS em fêmeas com agressão induzida pela exposição à urina de machos induziu alterações consistentes associadas ao comportamento tipo-ansioso, mas não ao comportamento de esquiva social. Logo, sugere-se que este modelo pode ser utilizado para estudar os mecanismos fisiopatológicos envolvidos nas respostas emocionais associadas a ansiedade decorrentes do estresse crônico psicossocial. Além disso, o ECDS promoveu alterações das proteínas autofágicas (beclina-1 e p62) no hipocampo, indicando desregulação da via e que este modelo pode ser utilizado para investigar o papel da autofagia nas respostas ao estresse e na neurobiologia dos transtornos mentais comuns.

Contudo, a causalidade é difícil de abordar, especialmente quando se trata de transtornos complexos e multifatoriais. Além disso, mesmo quando são encontradas diferenças na autofagia, o desenho experimental transversal torna difícil determinar se as alterações fazem parte dos mecanismos que causam as alterações comportamentais ou efeitos regulatórios produzidos para neutralizar o impacto do estresse.

Adicionalmente, o EADS foi capaz de induzir alterações no comportamento de esquiva social das fêmeas contrastando com os efeitos desse modelo de estresse em machos e reforçando a necessidade de se investigar as diferenças sexuais nas respostas emocionais ao estresse. Por fim, o efeito do bloqueio do fluxo autofágico associado ao EADS nas respostas emocionais das fêmeas trouxe resultados pouco conclusivos. Portanto, é necessário a realização de experimentos adicionais para confirmar a eficiência do tratamento com o inibidor no bloqueio da autofagia no SNC.

REFERÊNCIAS

- Alcocer-Gómez, E., Casas-Barquero, N., Núñez-Vasco, J., Navarro-Pando, J. M., & Bullón, P. (2017). Psychological status in depressive patients correlates with metabolic gene expression. *CNS Neuroscience and Therapeutics*, July, 843–845. <https://doi.org/10.1111/cns.12755>
- Altemus, M., Sarvaiya, N., & Neill Epperson, C. (2014). Sex differences in anxiety and depression clinical perspectives. *Frontiers in Neuroendocrinology*, 35(3), 320–330. <https://doi.org/10.1016/J.YFRNE.2014.05.004>
- Amaravadi, R. K., & Winkler, J. D. (2012). Lys05: A new lysosomal autophagy inhibitor. Em *Autophagy* (Vol. 8, Número 9, p. 1383–1384). Taylor and Francis Inc. <https://doi.org/10.4161/auto.20958>
- Bangasser, D. A., & Cuarenta, A. (2021). Sex differences in anxiety and depression: circuits and mechanisms. *Nature Reviews Neuroscience*, 22(11), 674–684. <https://doi.org/10.1038/s41583-021-00513-0>
- Beery, A. K., & Kaufer, D. (2015). Stress, social behavior, and resilience: Insights from rodents. *Neurobiology of Stress*, 1, 116–127. <https://doi.org/10.1016/j.ynstr.2014.10.004>
- Berton, O. (2006). Essential Role of BDNF in the Mesolimbic Dopamine Pathway in Social Defeat Stress. *Science*, 311(5762), 864–868. <https://doi.org/10.1126/science.1120972>
- Biltz, R. G., Sawicki, C. M., Sheridan, J. F., & Godbout, J. P. (2022). The neuroimmunology of social-stress-induced sensitization. Em *Nature Immunology* (Vol. 23, Número 11, p. 1527–1535). Nature Research. <https://doi.org/10.1038/s41590-022-01321-z>
- Byers, S. L., Wiles, M. V., Dunn, S. L., & Taft, R. A. (2012). Mouse estrous cycle identification tool and images. *PLoS ONE*, 7(4), 1–5. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0035538>
- Cao, W., Li, J., Yang, K., & Cao, D. (2021). An overview of autophagy: Mechanism, regulation and research progress. *Bulletin du Cancer*, 108(3), 304–322. <https://doi.org/10.1016/J.BULCAN.2020.11.004>
- Carola, V., Olimpio, F. D., Brunamonti, E., Mangia, F., & Renzi, P. (2002). Evaluation of the elevated plus-maze and open-field tests for the assessment of anxiety-related behaviour in inbred mice. Em *Behavioural Brain Research* (Vol. 134). www.elsevier.com/locate/bbr

- Cathomas, F., Murrough, J. W., Nestler, E. J., Han, M.-H., & Russo, S. J. (2019). Neurobiology of Resilience: Interface Between Mind and Body. *Biological Psychiatry*, 86(6), 410–420. <https://doi.org/10.1016/j.biopsych.2019.04.011>
- Chattarji, S., Tomar, A., Suvrathan, A., Ghosh, S., & Rahman, M. M. (2015). Neighborhood matters: divergent patterns of stress-induced plasticity across the brain. *Nature Neuroscience* 2015 18:10, 18(10), 1364–1375. <https://doi.org/10.1038/nn.4115>
- Chu, C. T., Plowey, E. D., Dagda, R. K., Hickey, R. W., Cherra, S. J., & Clark, R. S. B. (2009). Autophagy in Neurite Injury and Neurodegeneration: In Vitro and In Vivo Models. *Methods in enzymology*, 453(C), 217. [https://doi.org/10.1016/S0076-6879\(08\)04011-1](https://doi.org/10.1016/S0076-6879(08)04011-1)
- Craske, M. G., Stein, M. B., Eley, T. C., Milad, M. R., Holmes, A., Rapee, R. M., & Wittchen, H. U. (2017). Anxiety disorders. *Nature Reviews Disease Primers*, 3. <https://doi.org/10.1038/nrdp.2017.24>
- Czéh, B., Simon, M., Schmelting, B., Hiemke, C., & Fuchs, E. (2005). Astroglial Plasticity in the Hippocampus is Affected by Chronic Psychosocial Stress and Concomitant Fluoxetine Treatment. *Neuropsychopharmacology* 2006 31:8, 31(8), 1616–1626. <https://doi.org/10.1038/sj.npp.1300982>
- Dantzer, R., Cohen, S., Russo, S. J., & Dinan, T. G. (2018). Resilience and immunity. *Brain, Behavior, and Immunity*, 74, 28–42. <https://doi.org/10.1016/J.BBI.2018.08.010>
- Davidson, J. R. T., Feltner, D. E., & Dugar, A. (2010). Management of Generalized Anxiety Disorder in Primary Care. *The Primary Care Companion to The Journal of Clinical Psychiatry*. <https://doi.org/10.4088/PCC.09r00772blu>
- Deleyto-Seldas, N., & Efeyan, A. (2021). The mTOR–Autophagy Axis and the Control of Metabolism. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, 9. <https://doi.org/10.3389/FCELL.2021.655731>
- DeVorkin, L., Hattersley, M., Kim, P., Ries, J., Spowart, J., Anglesio, M. S., Levi, S. M., Huntsman, D. G., Amaravadi, R. K., Winkler, J. D., Tinker, A. V., & Lum, J. J. (2017). Autophagy inhibition enhances sunitinib efficacy in clear cell ovarian carcinoma. *Molecular Cancer Research*, 15(3), 250–258. <https://doi.org/10.1158/1541-7786.MCR-16-0132>
- Diaz, V., & Lin, D. (2020). Neural circuits for coping with social defeat. *Current Opinion in Neurobiology*, 60, 99–107. <https://doi.org/10.1016/J.CONB.2019.11.016>
- Duan, K., Gu, Q., Petralia, R. S., Wang, Y. X., Panja, D., Liu, X., Lehmann, M. L., Zhu, H., Zhu, J., & Li, Z. (2021). Mitophagy in the basolateral amygdala mediates

increased anxiety induced by aversive social experience. *Neuron*, 109(23), 3793–3809.e8. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2021.09.008>

Duman, R. S. (2004). Depression: a case of neuronal life and death? *Biological Psychiatry*, 56(3), 140–145. <https://doi.org/10.1016/j.biopsych.2004.02.033>

Duque, A., Vinader-Caerols, C., & Monleon, S. (2016). Effects of social stress and clomipramine on emotional memory in mice. *Acta Neurobiologiae Experimentalis*, 76(3), 225–233. <https://doi.org/http://dx.doi.org/10.21307/ane-2017-022>

Fanselow, M. S., & Dong, H.-W. (2010). Are the Dorsal and Ventral Hippocampus Functionally Distinct Structures? *Neuron*, 65(1), 7–19. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2009.11.031>

Fleshner, M., Maier, S. F., Lyons, D. M., & Raskind, M. A. (2011). The neurobiology of the stress-resistant brain. *Stress*, 14(5), 498–502. <https://doi.org/10.3109/10253890.2011.596865>

Francis, T. C., Chandra, R., Friend, D. M., Finkel, E., Dayrit, G., Miranda, J., Brooks, J. M., Iñiguez, S. D., O'Donnell, P., Kravitz, A., & Lobo, M. K. (2015). Nucleus accumbens medium spiny neuron subtypes mediate depression-related outcomes to social defeat stress. *Biological Psychiatry*, 77(3), 212–222. <https://doi.org/10.1016/j.biopsych.2014.07.021>

Furman, O., Tsoory, M., Chen, | Alon, & Sandi, C. (2022). Differential chronic social stress models in male and female mice. *Eur J Neurosci*, 55, 2777. <https://doi.org/10.1111/ejn.15481>

Gassen, N. C., Hartmann, J., Zschocke, J., Stepan, J., Hafner, K., Zellner, A., Kirmeier, T., Kollmannsberger, L., Wagner, K. V., Dedic, N., Balsevich, G., Deussing, J. M., Kloiber, S., Lucae, S., Holsboer, F., Eder, M., Uhr, M., Ising, M., Schmidt, M. V., & Rein, T. (2014). Association of FKBP51 with Priming of Autophagy Pathways and Mediation of Antidepressant Treatment Response: Evidence in Cells, Mice, and Humans. *PLoS Medicine*, 11(11). <https://doi.org/10.1371/journal.pmed.1001755>

Ghosh, S., Choudhury, S., Chowdhury, O., Mukherjee, S., Das, A., Sain, A., Gupta, P., Adhikary, A., & Chattopadhyay, S. (2020). Inflammation-induced behavioral changes is driven by alterations in Nrf2-dependent apoptosis and autophagy in mouse hippocampus: Role of fluoxetine. *Cellular Signalling*, 68. <https://doi.org/10.1016/j.cellsig.2019.109521>

Golden, S. A., Covington, H. E., Berton, O., & Russo, S. J. (2011). A standardized protocol for repeated social defeat stress in mice. *Nature Protocols*, 6(8), 1183–1191. <https://doi.org/10.1038/nprot.2011.361>

Grossman, Y. S., Fillinger, C., Manganaro, A., Voren, G., Waldman, R., Zou, T., Janssen, W. G., Kenny, P. J., & Dumitriu, D. (2022). Structure and function

differences in the prelimbic cortex to basolateral amygdala circuit mediate trait vulnerability in a novel model of acute social defeat stress in male mice. *Neuropsychopharmacology*, 47(3), 788–799. <https://doi.org/10.1038/s41386-021-01229-6>

Gulbins, A., Schumacher, F., Becker, K. A., Wilker, B., Soddemann, M., Boldrin, F., Müller, C. P., Edwards, M. J., Goodman, M., Caldwell, C. C., Kleuser, B., Kornhuber, J., Szabo, I., & Gulbins, E. (2018). Antidepressants act by inducing autophagy controlled by sphingomyelin–ceramide. *Molecular Psychiatry*. <https://doi.org/10.1038/s41380-018-0090-9>

Guo, L., Jiang, Z. mei, Sun, R. xue, Pang, W., zhou, X., Du, M. ling, Chen, M. xiang, Lv, X., & Wang, J. tao. (2022). Repeated social defeat stress inhibits development of hippocampus neurons through mitophagy and autophagy. *Brain Research Bulletin*, 182, 111–117. <https://doi.org/10.1016/j.brainresbull.2022.01.009>

Hammamieh, R., Chakraborty, N., De Lima, T. C. M., Meyerhoff, J., Gautam, A., Muhie, S., D'Arpa, P., Lumley, L., Carroll, E., & Jett, M. (2012). Murine model of repeated exposures to conspecific trained aggressors simulates features of post-traumatic stress disorder. *Behavioural Brain Research*, 235(1), 55–66. <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2012.07.022>

Hammels, C., Pishva, E., De Vry, J., van den Hove, D. L. A., Prickaerts, J., van Winkel, R., Selten, J. P., Lesch, K. P., Daskalakis, N. P., Steinbusch, H. W. M., van Os, J., Kenis, G., & Rutten, B. P. F. (2015). Defeat stress in rodents: From behavior to molecules. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*, 59, 111–140. <https://doi.org/10.1016/j.neubiorev.2015.10.006>

Haney, M., Maccari, S., Le Moal, M., Simon, H., & Vincenzo Piazza, P. (1995). Social stress increases the acquisition of cocaine self-administration in male and female rats. *Brain Research*, 698(1–2), 46–52. [https://doi.org/10.1016/0006-8993\(95\)00788-R](https://doi.org/10.1016/0006-8993(95)00788-R)

Hara, T., Nakamura, K., Matsui, M., Yamamoto, A., Nakahara, Y., Suzuki-migishima, R., Yokoyama, M., Mishima, K., Saito, I., & Okano, H. (2006). *Suppression of basal autophagy in neural cells causes neurodegenerative disease in mice*. 441(June), 885–889. <https://doi.org/10.1038/nature04724>

Harris, A. Z., Atsak, P., Bretton, Z. H., Holt, E. S., Alam, R., Morton, M. P., Abbas, A. I., Leonardo, E. D., Bolkan, S. S., Hen, R., & Gordon, J. A. (2018). A Novel Method for Chronic Social Defeat Stress in Female Mice. *Neuropsychopharmacology*, 43(6), 1276–1283. <https://doi.org/10.1038/npp.2017.259>

Harris, R. B. S. (2015). Chronic and acute effects of stress on energy balance: are there appropriate animal models? *American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*, 308(4), R250–R265. <https://doi.org/10.1152/ajpregu.00361.2014>

- He, S., Zeng, D., Xu, F., Zhang, J., Zhao, N., Wang, Q., Shi, J., Lin, Z., Yu, W., & Li, H. (2019). *Baseline Serum Levels of Beclin-1 , but Not Inflammatory Factors , May Predict Antidepressant Treatment Response in Chinese Han Patients With MDD : A Preliminary Study*. *10*(June), 1–9. <https://doi.org/10.3389/fpsy.2019.00378>
- Hing, B., Braun, P., Cordner, Z. A., Ewald, E. R., Moody, L., McKane, M., Willour, V. L., Tamashiro, K. L., & Potash, J. B. (2018). Chronic social stress induces DNA methylation changes at an evolutionary conserved intergenic region in chromosome X. *Epigenetics*, *13*(6), 627–641. <https://doi.org/10.1080/15592294.2018.1486654>
- Hodes, G. E., Pfau, M. L., Leboeuf, M., Golden, S. A., Christoffel, D. J., & Bregman, D. (2014). *Individual differences in the peripheral immune system promote resilience versus susceptibility to social stress*. *111*(45). <https://doi.org/10.1073/pnas.1415191111>
- Holly, E. N., Shimamoto, A., DeBold, J. F., & Miczek, K. A. (2012). Sex differences in behavioral and neural cross-sensitization and escalated cocaine taking as a result of episodic social defeat stress in rats. *Psychopharmacology*, *224*(1), 179–188. <https://doi.org/10.1007/s00213-012-2846-2>
- Huang, G.-B., Zhao, T., Muna, S. S., Bagalkot, T. R., Jin, H.-M., Chae, H.-J., & Chung, Y.-C. (2013). Effects of chronic social defeat stress on behaviour, endoplasmic reticulum proteins and choline acetyltransferase in adolescent mice. *International Journal of Neuropsychopharmacology*, *16*(7), 1635–1647. <https://doi.org/10.1017/S1461145713000060>
- Huang, X., Wu, H., Jiang, R., Sun, G., Shen, J., Ma, M., Ma, C., Zhang, S., Huang, Z., Wu, Q., Chen, G., & Tao, W. (2018). The antidepressant effects of α -tocopherol are related to activation of autophagy via the AMPK/mTOR pathway. *European Journal of Pharmacology*, *833*(April), 1–7. <https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2018.05.020>
- Huffman, J. C., & Alpert, J. E. (2010). An Approach to the Psychopharmacologic Care of Patients: Antidepressants, Antipsychotics, Anxiolytics, Mood Stabilizers, and Natural Remedies. *Medical Clinics of North America*, *94*(6), 1141–1160. <https://doi.org/10.1016/j.mcna.2010.08.009>
- Huhman, K. L., Solomon, M. B., Janicki, M., Harmon, A. C., Lin, S. M., Israel, J. E., & Jasnow, A. M. (2003). Conditioned defeat in male and female syrian hamsters. *Hormones and Behavior*, *44*(3), 293–299. <https://doi.org/10.1016/j.yhbeh.2003.05.001>
- Iñiguez, S. D., Flores-Ramirez, F. J., Riggs, L. M., Alipio, J. B., Garcia-Carachure, I., Hernandez, M. A., Sanchez, D. O., Lobo, M. K., Serrano, P. A., Braren, S. H., & Castillo, S. A. (2017). *Priority Communication Vicarious Social Defeat Stress Induces*

Depression-Related Outcomes in Female Mice.
<https://doi.org/10.1016/j.biopsych.2017.07.014>

Jia, J., & Le, W. (2015). Molecular network of neuronal autophagy in the pathophysiology and treatment of depression. *Neuroscience Bulletin*, 31(4), 427–434. <https://doi.org/10.1007/s12264-015-1548-2>

Kessler, R. C. (1997). *THE EFFECTS OF STRESSFUL LIFE EVENTS ON DEPRESSION.* 191–214.

Kessler, R. C., Petukhova, M., Sampson, N. A., Zaslavsky, A. M., & Wittchen, H.-U. (2012). Twelve-month and lifetime prevalence and lifetime morbid risk of anxiety and mood disorders in the United States. *International Journal of Methods in Psychiatric Research*, 21(3), 169–184. <https://doi.org/10.1002/mpr.1359>

Kim, J., Kang, S., Choi, T. Y., Chang, K. A., & Koo, J. W. (2022). Metabotropic Glutamate Receptor 5 in Amygdala Target Neurons Regulates Susceptibility to Chronic Social Stress. *Biological Psychiatry*, 92(2), 104–115. <https://doi.org/10.1016/j.biopsych.2022.01.006>

Kim, J., Kundu, M., Viollet, B., & Guan, K. L. (2011). AMPK and mTOR regulate autophagy through direct phosphorylation of Ulk1. *Nature Cell Biology*, 13(2), 132–141. <https://doi.org/10.1038/ncb2152>

Klionsky, D. J., Abdelmohsen, K., Abe, A., Abedin, J., Abeliovich, H., Bartolom, A., Beckham, J. D., Bertolotti, A., Bess, A. S., & Bozhkov, P. V. (2016). *Guidelines for the use and interpretation of assays for monitoring autophagy (3rd edition)*. 12(1), 1–222. <https://doi.org/10.1080/15548627.2015.1100356>

Klionsky, D. J., & Emr, S. D. (2012). *Autophagy as a Regulated Pathway of Cellular Degradation.* 1717(2000). <https://doi.org/10.1126/science.290.5497.1717>
 Knierim, J. J. (2015). The hippocampus. *Current Biology*, 25(23), R1116–R1121. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2015.10.049>

Knorr, U., Vinberg, M., Kessing, L. V., & Wetterslev, J. (2010). Salivary cortisol in depressed patients versus control persons: A systematic review and meta-analysis. *Psychoneuroendocrinology*, 35(9), 1275–1286. <https://doi.org/10.1016/j.psyneuen.2010.04.001>

Komatsu, M., Waguri, S., Chiba, T., Murata, S., Iwata, J. I., Tanida, I., Ueno, T., Koike, M., Uchiyama, Y., Kominami, E., & Tanaka, K. (2006). Loss of autophagy in the central nervous system causes neurodegeneration in mice. *Nature*, 441(7095), 880–884. <https://doi.org/10.1038/nature04723>

Krishnan, V., Han, M. H., Graham, D. L., Berton, O., Renthal, W., Russo, S. J., LaPlant, Q., Graham, A., Lutter, M., Lagace, D. C., Ghose, S., Reister, R., Tannous, P., Green, T. A., Neve, R. L., Chakravarty, S., Kumar, A., Eisch, A. J., Self, D. W., ...

- Nestler, E. J. (2007). Molecular Adaptations Underlying Susceptibility and Resistance to Social Defeat in Brain Reward Regions. *Cell*, 131(2), 391–404. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2007.09.018>
- Krueger, R. F., & Finger, M. S. (2001). *Using Item Response Theory to Understand Comorbidity Among Anxiety and Unipolar Mood Disorders*. 13(1), 140–151. <https://doi.org/10.1037//1040-3590.13.1.140>
- Kudryavtseva, N. N. (1994). Experience of defeat decreases the behavioural reactivity to conspecifics in the partition test. *Behavioural Processes*, 32(3), 297–304. [https://doi.org/10.1016/0376-6357\(94\)90049-3](https://doi.org/10.1016/0376-6357(94)90049-3)
- Kudryavtseva, N. N., Bakshtanovskaya, I. V, & Koryakina, L. A. ([s.d.]). Social Model of Depression in Mice of C57BL/6J Strain. *Em Pharmacology Biochemist D, & Behavior* (Vol. 38).
- Kupfer, D., Frank, E., & Phillips, M. L. (2012). Major depressive disorder: new clinical, neurobiological, and treatment perspectives. *Lancet*, 379(9820), 1045–1055. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(11\)60602-8](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(11)60602-8).Major
- Kuske, J. X., & Trainor, B. C. (2022). Mean Girls: Social Stress Models for Female Rodents. *Current Topics in Behavioral Neurosciences*, 54, 95–124. https://doi.org/10.1007/7854_2021_247
- Labonté, B., Engmann, O., Purushothaman, I., Menard, C., Wang, J., Tan, C., Scarpa, J. R., Moy, G., Loh, Y. H. E., Cahill, M., Lorsch, Z. S., Hamilton, P. J., Calipari, E. S., Hodes, G. E., Issler, O., Kronman, H., Pfau, M., Obradovic, A. L. J., Dong, Y., ... Nestler, E. J. (2017). Sex-specific transcriptional signatures in human depression. *Nature Medicine*, 23(9), 1102–1111. <https://doi.org/10.1038/nm.4386>
- Lamers, F., Van Oppen, P., Comijs, H. C., Smit, J. H., Spinhoven, P., Van Balkom, A. J. L. M., Nolen, W. A., Zitman, F. G., Beekman, A. T. F., & Penninx, B. W. J. H. (2011). Comorbidity patterns of anxiety and depressive disorders in a large cohort study: the Netherlands Study of Depression and Anxiety (NESDA). *The Journal of clinical psychiatry*, 72(3), 342–348. <https://doi.org/10.4088/JCP.10M06176BLU>
- Lee, J., Duan, W., & Mattson, M. P. (2002). Evidence that brain-derived neurotrophic factor is required for basal neurogenesis and mediates, in part, the enhancement of neurogenesis by dietary restriction in the hippocampus of adult mice. *Journal of Neurochemistry*, 82(6), 1367–1375. <https://doi.org/10.1046/j.1471->
- Li, D., Zheng, J., Wang, M., Feng, L., Ren, Z., Liu, Y., Yang, N., & Zuo, P. (2016). Changes of TSPO-mediated mitophagy signaling pathway in learned helplessness mice. *Psychiatry Research*, 245, 141–147. <https://doi.org/10.1016/j.psychres.2016.02.068>

- Lilienfeld, S. O., & Treadway, M. T. (2017). *HHS Public Access*. 435–463. <https://doi.org/10.1146/annurev-clinpsy-021815-093122>.Clashing
- Lister, RichardG. (1987). The use of a plus-maze to measure anxiety in the mouse. *Psychopharmacology*, *92*(2). <https://doi.org/10.1007/BF00177912>
- Liu, X., Gu, X. H., Zheng, L. L., Xu, L. J., Yang, Y. J., Yang, G., Wu, H. J., Chen, Z. Z., & Wang, W. (2022). Autophagy promotes membrane trafficking of NR2B to alleviate depression by inhibiting AQP4 expression in mice. *Experimental Cell Research*, *419*(1), 113298. <https://doi.org/10.1016/J.YEXCR.2022.113298>
- Lopresti, A. L., Maker, G. L., Hood, S. D., & Drummond, P. D. (2014). Progress in Neuro-Psychopharmacology & Biological Psychiatry A review of peripheral biomarkers in major depression : The potential of in fl ammatory and oxidative stress biomarkers. *Progress in Neuropsychopharmacology & Biological Psychiatry*, *48*, 102–111. <https://doi.org/10.1016/j.pnpbp.2013.09.017>
- LOWRY, O. H., ROSEBROUGH, N. J., FARR, A. L., & RANDALL, R. J. (1951). PROTEIN MEASUREMENT WITH THE FOLIN PHENOL REAGENT. *Journal of Biological Chemistry*, *193*(1), 265–275. [https://doi.org/10.1016/S0021-9258\(19\)52451-6](https://doi.org/10.1016/S0021-9258(19)52451-6)
- Lyons, D. M., Ayash, S., Schatzberg, A. F., & Müller, M. B. (2023). Ecological validity of social defeat stressors in mouse models of vulnerability and resilience. *Em Neuroscience and Biobehavioral Reviews* (Vol. 145). Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/j.neubiorev.2023.105032>
- Lyu, D., Wang, F., Zhang, M., Yang, W., Huang, H., Huang, Q., Wu, C., Qian, N., Wang, M., Zhang, H., Zheng, S., Chen, J., Fu, Y., Zhang, C., Li, Z., & Hong, W. (2022). Ketamine induces rapid antidepressant effects via the autophagy-NLRP3 inflammasome pathway. *Psychopharmacology*, *239*(10), 3201–3212. <https://doi.org/10.1007/s00213-022-06201-w>
- Marcus, S. M., Kerber, K. B., Rush, A. J., Wisniewski, S. R., Nierenberg, A., Balasubramani, G. K., Ritz, L., Kornstein, S., Young, E. A., & Trivedi, M. H. (2008). Sex differences in depression symptoms in treatment-seeking adults: confirmatory analyses from the Sequenced Treatment Alternatives to Relieve Depression study. *Comprehensive Psychiatry*, *49*(3), 238–246. <https://doi.org/10.1016/J.COMPPSYCH.2007.06.012>
- Mariño, G., Niso-Santano, M., Baehrecke, E. H., & Kroemer, G. (2014). Self-consumption: The interplay of autophagy and apoptosis. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, *15*(2), 81–94. <https://doi.org/10.1038/nrm3735>
- McAfee, Q., Zhang, Z., Samanta, A., Levi, S. M., Ma, X. H., Piao, S., Lynch, J. P., Uehara, T., Sepulveda, A. R., Davis, L. E., Winkler, J. D., & Amaravadi, R. K. (2012). Autophagy inhibitor Lys05 has single-agent antitumor activity and reproduces the

phenotype of a genetic autophagy deficiency. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 109(21), 8253–8258.
<https://doi.org/10.1073/pnas.1118193109>

McQuade, R., & Young, A. H. (2000). Future therapeutic targets in mood disorders: the glucocorticoid receptor. *British Journal of Psychiatry*, 177(5), 390–395.
<https://doi.org/10.1192/bjp.177.5.390>

Ménard, C., Pfau, M. L., Hodes, G. E., & Russo, S. J. (2017). Immune and Neuroendocrine Mechanisms of Stress Vulnerability and Resilience. *Neuropsychopharmacology*, 42(1), 62–80. <https://doi.org/10.1038/npp.2016.90>

Menon, M. B., & Dhamija, S. (2018). Beclin 1 phosphorylation - at the center of autophagy regulation. *Em Frontiers in Cell and Developmental Biology* (Vol. 6, Número OCT). Frontiers Media S.A. <https://doi.org/10.3389/fcell.2018.00137>

Mineka, S., Watson, D., & Clark, L. A. (1998). *COMORBIDITY OF ANXIETY AND UNIPOLAR MOOD DISORDERS*. 377–412.

Monroe, S. M., & Harkness, K. L. (2005). Life Stress, the “Kindling” Hypothesis, and the Recurrence of Depression: Considerations From a Life Stress Perspective. *Psychological Review*, 112(2), 417–445. <https://doi.org/10.1037/0033-295X.112.2.417>

Mouri, A., Ukai, M., Uchida, M., Hasegawa, S., & Taniguchi, M. (2018). *Neuropharmacology Juvenile social defeat stress exposure persistently impairs social behaviors and neurogenesis*. 133.

Nave, B. T., Margriet, D., Withers, D. J., Alessi, D. R., & Shepherd, P. R. (1999). Mammalian target of rapamycin is a direct target for protein kinase B : identification of a convergence point for opposing effects of insulin and amino-acid deficiency on protein translation. *Em Biochem. J* (Vol. 344).

Ndoye, A., Budina-Kolomets, A., Kugel, C. H., Webster, M. R., Kaur, A., Behera, R., Rebecca, V. W., Li, L., Brafford, P. A., Liu, Q., Gopal, Y. N. V., Davies, M. A., Mills, G. B., Xu, X., Wu, H., Herlyn, M., Nicastrì, M. C., Winkle, J. D., Soengas, M. S., ... Weeraratna, A. T. (2017). ATG5 mediates a positive feedback loop between wnt signaling and autophagy in melanoma. *Cancer Research*, 77(21), 5873–5885.
<https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-17-0907>

Neis, V. B., Moretti, M., Manosso, L. M., Lopes, M. W., Leal, R. B., & Rodrigues, A. L. S. (2015). Agmatine enhances antidepressant potency of MK-801 and conventional antidepressants in mice. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*, 130, 9–14. <https://doi.org/10.1016/j.pbb.2014.12.009>

Nemeroff, C. B., & Vale, W. W. (2005). The neurobiology of depression: Inroads to treatment and new drug discovery. *Journal of Clinical Psychiatry*, 66(SUPPL. 7), 5–13.

<http://ovidsp.ovid.com/ovidweb.cgi?T=JS&PAGE=reference&D=emed9&NEWS=N&AN=41345489>

Newman, E. L., Covington, H. E., Suh, J., Bicakci, M. B., Ressler, K. J., DeBold, J. F., & Miczek, K. A. (2019). Fighting Females: Neural and Behavioral Consequences of Social Defeat Stress in Female Mice. *Biological Psychiatry*, *86*(9), 657–668. <https://doi.org/10.1016/j.biopsych.2019.05.005>

Nikoletopoulou, V., Papandreou, M. E., & Tavernarakis, N. (2015). Autophagy in the physiology and pathology of the central nervous system. *Cell Death and Differentiation*, *22*(3), 398–407. <https://doi.org/10.1038/cdd.2014.204>

Ormel, J., & VonKorff, M. (2021). Reducing Common Mental Disorder Prevalence in Populations. *JAMA Psychiatry*, *78*(4), 359. <https://doi.org/10.1001/jamapsychiatry.2020.3443>

Otte, C., Gold, S. M., Penninx, B. W., Pariante, C. M., Etkin, A., Fava, M., Mohr, D. C., & Schatzberg, A. F. (2016). Major depressive disorder. *Nature Publishing Group*, *2*(Mdd), 1–21. <https://doi.org/10.1038/nrdp.2016.65>

Parzych, K. R., & Klionsky, D. J. (2014). *An Overview of Autophagy*: *20*(3), 460–473. <https://doi.org/10.1089/ars.2013.5371>

Patel, D., Anilkumar, S., Chattarji, S., & Buwalda, B. (2018). Repeated social stress leads to contrasting patterns of structural plasticity in the amygdala and hippocampus. *Behavioural Brain Research*, *347*, 314–324. <https://doi.org/10.1016/J.BBR.2018.03.034>

Patel, D., Kas, M. J., Chattarji, S., & Buwalda, B. (2019). Rodent models of social stress and neuronal plasticity: Relevance to depressive-like disorders. *Behavioural Brain Research*, *369*, 111900. <https://doi.org/10.1016/J.BBR.2019.111900>

Patel, S. S., Mehta, V., Changotra, H., & Udayabanu, M. (2016). Depression mediates impaired glucose tolerance and cognitive dysfunction: A neuromodulatory role of rosiglitazone. *Hormones and Behavior*, *78*, 200–210. <https://doi.org/10.1016/j.yhbeh.2015.11.010>

Penninx, B. W. J. H., Milaneschi, Y., Lamers, F., & Vogelzangs, N. (2013). Understanding the somatic consequences of depression: Biological mechanisms and the role of depression symptom profile. *BMC Medicine*, *11*(1), 1–14. <https://doi.org/10.1186/1741-7015-11-129/TABLES/3>

Penninx, B. W. J. H., Nolen, W. A., Lamers, F., Zitman, F. G., Smit, J. H., Spinhoven, P., Cuijpers, P., De Jong, P. J., Van Marwijk, H. W. J., Der Meer, K. Van, Verhaak, P., Laurant, M. G. H., De Graaf, R., Hoogendijk, W. J., Der Wee, N. Van, Ormel, J., Van Dyck, R., & Beekman, A. T. F. (2011). Two-year course of depressive and anxiety disorders: Results from the Netherlands Study of Depression and Anxiety

(NESDA). *Journal of Affective Disorders*, 133(1–2), 76–85.
<https://doi.org/10.1016/J.JAD.2011.03.027>

Penninx, B. W., Pine, D. S., Holmes, E. A., & Reif, A. (2021). Anxiety disorders. *The Lancet*, 397(10277), 914–927. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(21\)00359-7](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(21)00359-7)
 Pierone, B. C., Pereira, C. A., Garcez, M. L., & Kaster, M. P. (2020). Stress and signaling pathways regulating autophagy: From behavioral models to psychiatric disorders. *Experimental Neurology*, 334(September), 113485.
<https://doi.org/10.1016/j.expneurol.2020.113485>

Plieger, T., Melchers, M., Montag, C., Meermann, R., & Reuter, M. (2015). Life stress as potential risk factor for depression and burnout. *Burnout Research*, 2(1), 19–24. <https://doi.org/10.1016/j.burn.2015.03.001>

Pollack, M. H., Otto, M. W., Roy-Byrne, P. P., Coplan, J. D., Rothbaum, B. O., Simon, N. M., & Gorman, J. M. (2008). Novel treatment approaches for refractory anxiety disorders. *Depression and Anxiety*, 25(6), 467–476.
<https://doi.org/10.1002/DA.20329>

Porcelli, S., Van Der Wee, N., van der Werff, S., Aghajani, M., Glennon, J. C., van Heukelum, S., Mogavero, F., Lobo, A., Olivera, F. J., Lobo, E., Posadas, M., Dukart, J., Kozak, R., Arce, E., Ikram, A., Vorstman, J., Bilderbeck, A., Saris, I., Kas, M. J., & Serretti, A. (2019). Social brain, social dysfunction and social withdrawal. *Em Neuroscience and Biobehavioral Reviews* (Vol. 97, p. 10–33). Elsevier Ltd.
<https://doi.org/10.1016/j.neubiorev.2018.09.012>

Qu, Y., Yang, C., Ren, Q., Ma, M., Dong, C., & Hashimoto, K. (2018). Regional differences in dendritic spine density confer resilience to chronic social defeat stress. *Acta Neuropsychiatrica*, 30(2), 117–122. <https://doi.org/10.1017/NEU.2017.16>

Ribble, D. O., & Salvioni, M. (1990). in *Peromyscus californicus*, a monogamous rodent. *Behavioral Ecology and Sociobiology*, 9–15.

Rodrigues, A. L. S., Rocha, J. B. T., Mello, C. F., & Souza, D. O. (1996). Effect of Perinatal Lead Exposure on Rat Behaviour in Open-Field and Two-Wky Avoidance Tasks. *Pharmacology & Toxicology*, 79(3), 150–156. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0773.1996.tb00259.x>

Roosendaal, B., McEwen, B. S., & Chattarji, S. (2009). Stress, memory and the amygdala. *Nature Reviews Neuroscience*, 10(6), 423–433.
<https://doi.org/10.1038/nrn2651>

Sabbieti, M. G., Marchegiani, A., Sufianov, A. A., Gabai, V. L., Shneider, A., & Agas, D. (2022). P62/SQSTM1 beyond Autophagy: Physiological Role and Therapeutic Applications in Laboratory and Domestic Animals. *Em Life* (Vol. 12, Número 4). MDPI. <https://doi.org/10.3390/life12040539>

Sakai, M., Yu, Z., Hirayama, R., Nakasato, M., Kikuchi, Y., Ono, C., Komatsu, H., Nakanishi, M., Yoshii, H., Stellwagen, D., Furuyashiki, T., Komatsu, M., & Tomita, H. (2022). Deficient Autophagy in Microglia Aggravates Repeated Social Defeat Stress-Induced Social Avoidance. *Neural Plasticity*, 2022. <https://doi.org/10.1155/2022/7503553>

Scott, S. V., Nice, D. C., Nau, J. J., Weisman, L. S., Kamada, Y., Keizer-Gunnink, I., Funakoshi, T., Veenhuis, M., Ohsumi, Y., & Klionsky, D. J. (2000). Apg13p and Vac8p are part of a complex of phosphoproteins that are required for Cytoplasm to vacuole targeting. *Journal of Biological Chemistry*, 275(33), 25840–25849. <https://doi.org/10.1074/jbc.M002813200>

Sidibe, D. K., Vogel, M. C., & Maday, S. (2022). Organization of the autophagy pathway in neurons. *Em Current Opinion in Neurobiology* (Vol. 75). Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/j.conb.2022.102554>

Simon, P., Dupuis, R., & Costentin, J. (1994). Thigmotaxis as an index of anxiety in mice. Influence of dopaminergic transmissions. *Behavioural Brain Research*, 61(1), 59–64. [https://doi.org/10.1016/0166-4328\(94\)90008-6](https://doi.org/10.1016/0166-4328(94)90008-6)

Soetanto, A., Wilson, R. S., Talbot, K., Un, A., Schneider, J. A., Sobiesk, M., Kelly, J., Leurgans, S., Bennett, D. A., & Arnold, S. E. (2010). Association of anxiety and depression with microtubule-associated protein 2- and synaptopodin-immunolabeled dendrite and spine densities in hippocampal CA3 of older humans. *Archives of General Psychiatry*, 67(5), 448–457. <https://doi.org/10.1001/archgenpsychiatry.2010.48>

Solomon, M. B. ([s.d.]). *Evaluating Social Defeat as a Model for Psychopathology in Adult Female Rodents*. <https://doi.org/10.1002/jnr.23971>

Son, J. H., Shim, J. H., & Kim, K. (2012). *Neuronal autophagy and neurodegenerative diseases*. 44(2), 89–98.

Stetler, C., & Miller, G. E. (2011). Depression and Hypothalamic-Pituitary-Adrenal Activation: A Quantitative Summary of Four Decades of Research. *Psychosomatic Medicine*, 73(2), 114–126. <https://doi.org/10.1097/PSY.0b013e31820ad12b>

Sturman, O., Germain, P. L., & Bohacek, J. (2018). Exploratory rearing: a context- and stress-sensitive behavior recorded in the open-field test. *Stress*, 21(5), 443–452. <https://doi.org/10.1080/10253890.2018.1438405>

Tafet, G. E., & Nemeroff, C. B. (2020). Pharmacological Treatment of Anxiety Disorders: The Role of the HPA Axis. *Frontiers in Psychiatry*, 11. <https://doi.org/10.3389/fpsy.2020.00443>

Takahashi, A., Chung, J. R., Zhang, S., Zhang, H., Grossman, Y., Aleyasin, H., Flanigan, M. E., Pfau, M. L., Menard, C., Dumitriu, D., Hodes, G. E., McEwen, B. S., Nestler, E. J., Han, M. H., & Russo, S. J. (2017). Establishment of a repeated social

defeat stress model in female mice. *Scientific Reports*, 7(1), 4–15.
<https://doi.org/10.1038/s41598-017-12811-8>

Thibaut, F. (2017). Anxiety disorders: a review of current literature. *Dialogues in Clinical Neuroscience*, 19(2), 87–88.
<https://doi.org/10.31887/DCNS.2017.19.2/fthibaut>

Trainor, B. C., Pride, M. C., Villalon Landeros, R., Knoblauch, N. W., Takahashi, E. Y., Silva, A. L., & Crean, K. K. (2011). Sex Differences in Social Interaction Behavior Following Social Defeat Stress in the Monogamous California Mouse (*Peromyscus californicus*). *PLoS ONE*, 6(2), e17405. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0017405>

Troubat, R., Barone, P., Leman, S., Desmidt, T., Cressant, A., Atanasova, B., Brizard, B., El Hage, W., Surget, A., Belzung, C., & Camus, V. (2021). Neuroinflammation and depression: A review. *European Journal of Neuroscience*, 53(1), 151–171. <https://doi.org/10.1111/ejn.14720>

Ulrich-Lai, Y. M., & Herman, J. P. (2009). *Limbic system Neural regulation of endocrine and autonomic stress responses*. <https://doi.org/10.1038/nrn2647>
 van Doeselaar, L., Yang, H., Bordes, J., Brix, L., Engelhardt, C., Tang, F., & Schmidt, M. V. (2020). Chronic social defeat stress in female mice leads to sex-specific behavioral and neuroendocrine effects. *Stress*, 24(2), 168–180.
<https://doi.org/10.1080/10253890.2020.1864319>

Vargas, J. N. S., Hamasaki, M., Kawabata, T., Youle, R. J., & Yoshimori, T. (2023). The mechanisms and roles of selective autophagy in mammals. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* (Vol. 24, Número 3, p. 167–185). Nature Research.
<https://doi.org/10.1038/s41580-022-00542-2>

Villanueva, R. (2013). *Neurobiology of Major Depressive Disorder. 2013*.
 Wang, M., Bi, Y., Zeng, S., Liu, Y., Shao, M., Liu, K., Deng, Y., Wen, G., Sun, X., Zeng, P., Jing, L., & Lv, Z. (2019). Modified Xiaoyao San ameliorates depressive-like behaviors by triggering autophagosome formation to alleviate neuronal apoptosis. *Biomedicine and Pharmacotherapy*, 111(April 2018), 1057–1065.
<https://doi.org/10.1016/j.biopha.2018.12.141>

Wang, W., Liu, W., Duan, D., Bai, H., Wang, Z., & Xing, Y. (2020). Chronic social defeat stress mouse model: Current view on its behavioral deficits and modifications. *Behavioral Neuroscience*. <https://doi.org/10.1037/BNE0000418>

Wang, W., Liu, W., Duan, D., Bai, H., Wang, Z., & Xing, Y. (2021). Chronic social defeat stress mouse model: Current view on its behavioral deficits and modifications. *Behavioral Neuroscience*, 135(3), 326–335. <https://doi.org/10.1037/bne0000418>

Wang, Y., & Zhang, H. (2019). Regulation of Autophagy by mTOR Signaling Pathway. *Advances in Experimental Medicine and Biology*, 1206, 67–83.
https://doi.org/10.1007/978-981-15-0602-4_3/COVER

Wang, Z., Liu, S., Pan, W., Guo, Y., & Shen, Z. (2018). Bafilomycin A1 alleviates depression-like symptoms in chronic unpredictable mild stress rats. *Molecular Medicine Reports*, *18*(5), 4587–4594. <https://doi.org/10.3892/mmr.2018.9431>

Warden, D., Rush, A. J., Carmody, T. J., Kashner, T. M., Biggs, M. M., Crismon, M. L., & Trivedi, M. H. (2009). Predictors of Attrition During One Year of Depression Treatment: A Roadmap to Personalized Intervention. *Journal of Psychiatric Practice*, *15*(2), 113–124. <https://doi.org/10.1097/01.pra.0000348364.88676.83>

WHIMBEY, A. E., & DENENBERG, V. H. (1967). TWO INDEPENDENT BEHAVIORAL DIMENSIONS IN OPEN-FIELD PERFORMANCE. *Journal of Comparative and Physiological Psychology*, *63*(3), 500–504. <https://doi.org/10.1037/H0024620>

Whooley, M. A., & Wong, J. M. (2013). Depression and Cardiovascular Disorders. *Annual Review of Clinical Psychology*, *9*(1), 327–354. <https://doi.org/10.1146/annurev-clinpsy-050212-185526>

World Health Organization. (2017). Depression and other common mental disorders: global health estimates. *World Health Organization*, 1–24. <https://doi.org/CC BY-NC-SA 3.0 IGO>

Xiao, X., Shang, X., Zhai, B., Zhang, H., & Zhang, T. (2018). Neurochemistry International Nicotine alleviates chronic stress-induced anxiety and depressive-like behavior and hippocampal neuropathology via regulating autophagy signaling. *Neurochemistry International*, *114*, 58–70. <https://doi.org/10.1016/j.neuint.2018.01.004>

Yamamoto, A., & Yue, Z. (2014). Autophagy and Its Normal and Pathogenic States in the Brain. *Annual Review of Neuroscience*, *37*(1), 55–78. <https://doi.org/10.1146/annurev-neuro-071013-014149>

Yang, D. S., Stavrides, P., Mohan, P. S., Kaushik, S., Kumar, A., Ohno, M., Schmidt, S. D., Wesson, D., Bandyopadhyay, U., Jiang, Y., Pawlik, M., Peterhoff, C. M., Yang, A. J., Wilson, D. A., St George-Hyslop, P., Westaway, D., Mathews, P. M., Levy, E., Cuervo, A. M., & Nixon, R. A. (2011). Reversal of autophagy dysfunction in the TgCRND8 mouse model of Alzheimer's disease ameliorates amyloid pathologies and memory deficits. *Brain*, *134*(1), 258–277. <https://doi.org/10.1093/BRAIN/AWQ341>

Yang, Z., Huang, J., Geng, J., Nair, U., & Klionsky, D. J. (2006). Atg22 Recycles Amino Acids to Link the Degradative and Recycling Functions of Autophagy. *Molecular Biology of the Cell*, *17*(12), 5094–5104. <https://doi.org/10.1091/mbc.e06-06-0479>

Yang, Z., & Klionsky, D. J. (2010). Eaten alive: A history of macroautophagy. *Nature Cell Biology*, *12*(9), 814–822. <https://doi.org/10.1038/ncb0910-814>

Yin, W., Gallagher, N. R., Sawicki, C. M., Mckim, D. B., Godbout, J. P., & Sheridan, J. F. (2019). Brain, Behavior, and Immunity Repeated social defeat in female mice induces anxiety-like behavior associated with enhanced myelopoiesis and increased monocyte accumulation in the brain. *Brain Behavior and Immunity*, *78*(January), 131–142. <https://doi.org/10.1016/j.bbi.2019.01.015>

Yin, Z., Pascual, C., & Klionsky, D. (2016). Autophagy: machinery and regulation. *Microbial Cell*, *3*(12), 588–596. <https://doi.org/10.15698/mic2016.12.546>

Yorimitsu, T., & Klionsky, D. J. (2005). *Autophagy: molecular machinery for self-eating*. 1542–1552. <https://doi.org/10.1038/sj.cdd.4401765>

Zhang, H., Shang, Y., Xiao, X., Yu, M., & Zhang, T. (2017). Prenatal stress-induced impairments of cognitive flexibility and bidirectional synaptic plasticity are possibly associated with autophagy in adolescent male-offspring. *Experimental Neurology*, *298*(March), 68–78. <https://doi.org/10.1016/j.expneurol.2017.09.001>

Zhao, Z., Zhang, L., Guo, X.-D., Cao, L.-L., Xue, T.-F., Zhao, X.-J., Yang, D.-D., Yang, J., Ji, J., Huang, J.-Y., & Sun, X.-L. (2017). Rosiglitazone Exerts an Anti-depressive Effect in Unpredictable Chronic Mild-Stress-Induced Depressive Mice by Maintaining Essential Neuron Autophagy and Inhibiting Excessive Astrocytic Apoptosis. *Frontiers in Molecular Neuroscience*, *10*(September), 1–16. <https://doi.org/10.3389/fnmol.2017.00293>

ANEXO A – CERTIFICADO DE APROVAÇÃO DO CEUA



Comissão de Ética no
Uso de Animais



CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada "Envolvimento do inflamassoma NLRP3 e da autofagia nos mecanismos de resiliência e vulnerabilidade ao estresse social e no transtorno depressivo maior", protocolada sob o CEUA nº 2010201118 (ID 001190), sob a responsabilidade de **Manuella Pinto Kaster e equipe; Bruna Pierone** - que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica ou ensino - está de acordo com os preceitos da Lei 11.794 de 8 de outubro de 2008, com o Decreto 6.899 de 15 de julho de 2009, bem como com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi **aprovada** pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal de Santa Catarina (CEUA/UFSC) na reunião de 11/04/2019.

We certify that the proposal "Involvement of NLRP3 inflamassome and autophagy in the mechanisms associated to resilience and susceptibility to social stress and major depression", utilizing 80 Heterogenics mice (80 males), 140 Isogenics mice (140 males), protocol number CEUA 2010201118 (ID 001190), under the responsibility of **Manuella Pinto Kaster and team; Bruna Pierone** - which involves the production, maintenance and/or use of animals belonging to the phylum Chordata, subphylum Vertebrata (except human beings), for scientific research purposes or teaching - is in accordance with Law 11.794 of October 8, 2008, Decree 6899 of July 15, 2009, as well as with the rules issued by the National Council for Control of Animal Experimentation (CONCEA), and was **approved** by the Ethic Committee on Animal Use of the Federal University of Santa Catarina (CEUA/UFSC) in the meeting of 04/11/2019.

Finalidade da Proposta: Pesquisa

Vigência da Proposta: de 04/2019 a 03/2023 Área: Bioquímica

Origem:	Biotério Central			
Espécie:	Camundongos heterogênicos	sexo:	Machos	idade: 4 a 5 meses N: 80
Linhagem:	Swiss			Peso: 40 a 60 g
Origem:	CCB - Biotério Multiusuário de Roedores para Estudos na Área de Neuroquímica			
Espécie:	Camundongos isogênicos	sexo:	Machos	idade: 2 a 3 meses N: 140
Linhagem:	Swiss			Peso: 20 a 45 g

Local do experimento: A indução do estresse e a avaliação comportamental será realizada na sala de comportamento animal do departamento de bioquímica da UFSC (sala 104c). Os procedimentos bioquímicos serão realizados no Laboratório de Neuroquímica 1 (sala 205C)

Florianópolis, 12 de abril de 2019

Prof. Dr. Aderbal Silva Aguiar Junior
Presidente da Comissão de Ética no Uso de Animais
Universidade Federal de Santa Catarina

Profa. Dra. Thereza Christina Monteiro de Lima
Vice-Presidente da Comissão de Ética no Uso de Animais
Universidade Federal de Santa Catarina