

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
Instituto de Ciências Básicas da Saúde
Departamento de Fisiologia
Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Fisiologia

**EFEITOS DA PROGESTERONA SOBRE O COMPORTAMENTO TIPO-
DEPRESSIVO E SOBRE A EXPRESSÃO DAS SUBUNIDADES DO RECEPTOR
GABA_A DE RATOS WISTAR MACHOS E FÊMEAS**

SUSIE DE ANDRADE

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciências Biológicas,
área de concentração: Fisiologia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul,
como requisito parcial para a obtenção do grau de Doutor em Ciências Biológicas
– Fisiologia

Orientadora: Dra. Maria Flávia Marques Ribeiro

Co-Orientadora: Dra. Helena Maria Tanhauser Barros

Porto Alegre, 2010

Anjos a me amparar - Waine Tester

*Quando eu fico a pensar em anjos,
Uma luz voando longe do perigo
Com seu raro fulgor, beleza e esplendor
As asas se erguem ao céu*

*Eu sei foram anjos a me amparar
Pois fraco me achei pra me erguer
Estava tão cego para ver
Luzes do céu descendo em mim
Eu sei foram anjos a me amparar*

*Apesar do quanto a vida é difícil
E de ter que enfrentar muitos problemas
Foi em meio à dor ou à falta de amor
Veio um anjo a me ajudar*

*Eu senti hoje em mim, o toque de um anjo
Como o vento a soprar sobre mim
Chuva que cai a me molhar*

A vocês, anjos de minha vida, só posso agradecer. O tempo passou, e ele trouxe um pedaço de cada um, que ficou em meu coração. Marcas que transformam, que me fazem mais forte, mais madura, mas que também fazem a vida valer a pena. Tudo passa, e isto é o que fica...

Sou uma privilegiada. Como diz o pensamento, “o maior presente é um pouco de si mesmo” (Ralph Waldo Emerson). Terminei esta fase de minha vida com muitas riquezas, porções de vocês, meus anjos...

A você...

Só posso pedir ao Supremo Doador de todas as coisas, que Ihe abençoe, que cuide de você, o quanto você cuidou de mim... e que me permita também ser seu anjo...

“No dia em que você passar por sofrimentos, espero que o Senhor esteja ao seu lado!

Assim, o Deus de Jacó elevará você acima dos problemas, em perfeita segurança.

Desejo que Ele lhe mande socorro, do santo lugar onde vive, no monte Sião.

Desejo que Ele se lembre das suas ofertas de gratidão e dos sacrifícios queimados.

Tomara que Ele dê a você os desejos do seu coração e cumpra todos os seus planos.

Assim, quando soubermos que você venceu os problemas, cantaremos de alegria e

agitaremos bandeiras nos ares.

Tomara que o Senhor lhe dê tudo tanto você pediu a Ele.

Tenho plena certeza de que o Senhor salva o seu escolhido; lá do Céu, o santo lugar onde

vive, Ele manda ajuda, Ele me socorre com sua mão poderosa!

Outras nações se orgulham de seus exércitos, mas nossa confiança é o Senhor, o nosso

Deus. Elas perdem as forças e são destruídas; nós, porém, ficamos em pé, firmes para

sempre.” Sl. 20:1-8. BV.

Bruna **Dadá** **Vivi** **Dai**
Bruno **Pai** **Fafá** **Alex**
Rô **Mãe** **A Grande Família** **Manos** **Gustavo**
Helena **Pam** **pepe** **Vanderlei**
Alice **Ilma** **Lari** **Gisele**
Vanessa **Simone** **Fernanda**

AGRADECIMENTOS

À orientadora Maria Flávia Marques Ribeiro pelo apoio, amizade e pela brilhante orientação.

À co-orientadora Helena M.T. Barros pela oportunidade concedida e pelo apoio técnico.

À Rosane Gómez pelo constante cooperação durante a tese.

À Ilma Brum pelo incentivo e orientações na técnica de PCR.

A todos os colegas deste laboratório, pelo companheirismo e amizade.

Aos colegas do laboratório LABIMET, pelas orientações e sempre pronta disposição e amizade.

À Alice e à Sílvia pelo atendimento carinhoso.

A todos os demais colegas dos laboratórios pelo incentivo ao trabalho.

ÍNDICE

	ABSTRACT.....	VI
	RESUMO.....	IX
1	INTRODUÇÃO.....	01
2	HIPÓTESE.....	25
3	OBJETIVOS GERAIS.....	26
	3.2 Objetivos específicos.....	26
4	MATERIAL E MÉTODOS.....	28
	4.1 Animais.....	28
	4.2 Ciclo estral.....	29
	4.3 Fármacos e Tratamento.....	30
	4.4 Procedimentos estressores.....	30
	4.5 Delineamento experimental.....	31
	4.5.1 Experimento agudo.....	31
	4.5.2 Experimento crônico.....	31
	4.6 Nado Forçado.....	32
	4.7 Análise Molecular.....	35
	4.7.1 RT- PCR.....	35
	4.7.2 Western Blot.....	37
	4.8 Análise estatística.....	39
5	RESULTADOS.....	42
	5.1 Artigo 1 “Sex-dependent antidepressant effects of lower doses of progesterone in rats”.....	43
	5.2 Artigo 2 “Expression of GABAAR subunits in the prefrontal cortex in rats: effect of progesterone and implications of gender, brain hemisphere and stress.”.....	48
	5.3 Artigo 3 “The effects of progesterone on the subunits of the GABA _A receptor in the striatum of rats are dependent on brain hemisphere, stress and gender.”.....	78
6	DISCUSSÃO CONCLUSIVA.....	107
7	PERSPECTIVAS.....	119
8	BIBLIOGRAFIA.....	120

ABSTRACT

Major depression is more prevalent among women than men, and progesterone might be involved in the mechanisms that generate these differences. Progesterone is clinically used for women in several reproductive events, but its antidepressant effect is unclear. Animal studies showed the interference of progesterone on depressive behaviors of rodents, but they are inconclusive, and no study compared different treatment durations. The behavioral changes occasioned by progesterone has been associated with GABA_AR activity modulation. Y-aminobutyric acid (GABA) is the main inhibitory neurotransmitter in the central nervous system, and generally consists of a combination of 2 α 1, 2 β 2 and 1 γ 2 subunits. The modulation of GABA_A receptor by progesterone is specific to brain region studied. Prefrontal cortex is a nodal point of a limbic circuit involved in the control of stress situations. Studies have shown a sex-related functional asymmetry in this region mediating adaptive coping responses to stress and emotional processing in humans. The striatum is the input station for the basal ganglia, which is involved in behavioral responses. In this structure, there is evidence of brain hemispheric asymmetry in the GABAergic system related to depression.

This study investigated the antidepressant effect of low doses of progesterone in male and female rats under acute or chronic administration. Male and female Wistar rats in different phases of the estrous cycle were acutely administered different doses of progesterone (0.0, 0.4, 0.8 and 1.2 mg/kg) and

tested in the forced swimming test (FST). The lowest dose of progesterone (0.4 mg/kg) was chronically administered during two complete estrous cycles and diestrous II female and male rats were tested in the FST. One group only received chronic progesterone without have been evaluated in the FST. The effects on the GABA_A α 1 and γ 2 receptor subunit mRNA expressions by RT-PCR in the striatum and prefrontal cortex these animals were examined. In the prefrontal cortex, the protein expression by Western Blot of these subunits was additionally evaluated. Progesterone decreased depressive-like behaviors only in chronically treated diestrous II female rats and increased immobility in male rats. This low dose of progesterone did not interfere in the hormonal cycling in female rats. Results also showed that diestrous II female rats had greater immobility than male rats in the FST. The greater immobility of diestrous II female rats shows that rats in this estrous phase present more depressive-like behaviors that may be associated with their lower serum levels of progesterone. We showed that progesterone chronically administered at low doses reverses these depressive-like behaviors and has an antidepressant effect during the diestrous II phase of the estrous cycle. In the striatum, the expression of the γ 2 subunit displayed a gender-specific asymmetry. The stress caused by injections decreased the expression of γ 2 and α 1 mRNA in the striatum of both male and female rats, while stress caused by forced swimming decreased only the expression of γ 2. Also, the expression of the γ 2 and α 1 subunits modified in according to the nature of the stressor. Chronic progesterone treatment increased both, γ 2 and α 1 subunits, depending on the brain hemisphere, the level of stress, and the gender. A positive correlation between depression-like

behavior in male rats treated with progesterone and the expression of the $\gamma 2$ subunit in the right striatum was noted. Our findings suggest that the $\gamma 2$ subunit of GABA_AR can play an important role in the regulation of depressive behavior under certain stress conditions. In the pre-frontal cortex, the expression of $\alpha 1$ and $\gamma 2$ mRNA subunits are gender-specific in the control and stressed rats. It occurred a hemispheric specificity in the expression of the $\alpha 1$ and $\gamma 2$ subunits in response to injections stress as well as to progesterone treatment differentially regulated by gender. The mRNA and protein expression analysis demonstrated that progesterone plus forced swimming increased bilaterally the expression of $\alpha 1$ mRNA, but the protein expression was increased only in the right prefrontal cortex. Moreover, progesterone did not modify the $\gamma 2$ mRNA but it increased its protein expression, indicating the existence of possible post-transcriptional modifications in this structure. Also, there was a negative correlation between the mRNA and protein expression of $\alpha 1$ subunit in the right prefrontal cortex and the immobility behavior in female rats. Thus, progesterone may improve the depressive behavior of females restoring the efficiency of system GABA_A of right prefrontal cortex.

RESUMO

A depressão é um transtorno que possui maior prevalência nas mulheres do que nos homens. A progesterona pode estar envolvida nos mecanismos que geram estas diferenças. Este hormônio é utilizado clinicamente para mulheres em diversos eventos reprodutivos, e seu efeito na depressão não está bem estabelecido. Estudos em modelos animais mostraram que existe uma influência da progesterona no comportamento tipo-depressivo em roedores, mas estes estudos são inconclusivos. Autores têm demonstrado que as mudanças comportamentais em roedores ocasionadas pela progesterona estão associadas à alterações nas subunidades do receptor GABA_A. O ácido γ -aminobutírico (GABA) é o principal neurotransmissor inibitório do sistema nervoso central. O receptor GABAérgico é composto de uma combinação de 5 subunidades que formam um poro iônico. A composição de subunidades mais comum é a composta de $2\alpha 1$, $2\beta 2$ e $1\gamma 2$. A modulação da atividade GABAérgica pela progesterona é específica à estrutura encefálica utilizada. O estriado é a estação de entrada para os núcleos da base, uma estrutura envolvida em respostas comportamentais. O córtex pré-frontal é uma estrutura de grande importância no circuito límbico envolvida no controle de situações estressantes. Estudos têm mostrado uma assimetria funcional nesta estrutura relacionada ao gênero em respostas adaptativas ao estresse e no processamento emocional em humanos. Há também evidências relacionadas à depressão, de assimetria no sistema GABAérgico no estriado. Desta forma, no primeiro artigo, foi investigado o efeito antidepressivo de baixas

doses de progesterona com dois protocolos de tratamento: agudo e crônico. No segundo e terceiro artigos foram avaliadas a expressão das subunidades $\alpha 1$ e $\gamma 2$ do receptor GABA_A nos hemisférios direito e esquerdo do estriado e do córtex pré-frontal de ratos Wistar machos e fêmeas que receberam o tratamento crônico com progesterona e de ratos que, adicionalmente, foram submetidos ao teste do nado forçado. No estriado, foi avaliada a expressão do mRNA, por RT-PCR, e no córtex pré-frontal foi avaliado em machos, adicionalmente, a expressão protéica por Western Blot destas subunidades.

O tratamento agudo com progesterona não alterou o comportamento tipo-depressivo dos ratos, mas o tratamento crônico diminuiu o comportamento tipo-depressivo em fêmeas e aumentou em machos. A dose utilizada não alterou o ciclo hormonal das fêmeas. A análise da imobilidade dos animais que receberam veículo demonstrou que as fêmeas em diestro II foram mais depressivas do que os machos, refletida por sua maior imobilidade no teste do nado forçado. Este resultado comportamental das fêmeas pode estar associado aos mais baixos níveis séricos de progesterona característicos desta fase do seu ciclo reprodutivo.

A expressão da subunidade $\gamma 2$ no estriado dos ratos controle foi assimétrica, onde machos mostraram maior expressão no hemisfério esquerdo do que no direito, que pode representar uma característica de risco mais baixo para depressão. Não houve assimetria no estriado das fêmeas ou no córtex pré-frontal dos grupos controle. No estriado e no córtex pré-frontal, o estresse altera a simetria da expressão da subunidade $\alpha 1$, induzindo maior expressão no lado direito do que no esquerdo. Esta resposta assimétrica ocorreu em ratos machos e

em fêmeas submetidos ao estresse específico das injeções. Ainda, os machos respondem ao estresse pela alteração da expressão da subunidade $\alpha 1$ e têm a capacidade de se recuperar desta alteração após a exposição a outro tipo de estressor nas duas estruturas analisadas neste trabalho. O estresse, independente do tipo, diminui a expressão da subunidade $\gamma 2$, tanto no estriado como no córtex pré-frontal. O efeito antidepressivo da progesterona nas fêmeas está correlacionado com a maior expressão da subunidade $\alpha 1$ no córtex pré-frontal. O efeito pró-depressivo nos machos está correlacionado com o aumento da expressão da subunidade $\gamma 2$ no estriado. Progesterona altera o comportamento tipo-depressivo alterando a eficiência do sistema GABA_A no hemisfério direito do córtex pré-frontal de fêmeas e no estriado de machos.

A análise da expressão do mRNA e da proteína demonstrou que progesterona e o nado forçado aumentaram bilateralmente a expressão do mRNA da subunidade $\alpha 1$, mas aumentaram a expressão protéica desta subunidade apenas no hemisfério direito. Além disso, progesterona não modificou o mRNA da subunidade $\gamma 2$ mas aumentou sua expressão protéica, indicando a existência de possíveis modificações pós-transcricionais.

1. INTRODUÇÃO

A depressão é um transtorno do humor que é considerado doença quando apresenta os sintomas abaixo descritos, mas pode estar junto com a maioria dos transtornos emocionais apenas como um sintoma. Atualmente, a abordagem da depressão como doença é feita com base na Classificação Internacional de Doenças, 10a. Revisão (CID.10) (Organização Mundial de Saúde, 1993) e no Manual Diagnóstico e Estatístico de Transtornos Mentais 4ª revisão, da American Psychiatry Association (DSM.IV) (APA, 1994). A Depressão, segundo a CID.10, está classificada dentro dos Transtornos Afetivos. Transtornos Afetivos são aqueles nos quais o principal sintoma é uma alteração do humor ou afeto, como depressão, ansiedade ou euforia. O DSM.IV classifica a depressão dentro dos Transtornos do Humor. A maioria dos episódios deste transtorno tendem a ser recorrentes e podem ou não estar relacionados com situações ou fatos estressantes. A principal subdivisão dos transtornos depressivos é a depressão maior e a distímia. Segundo o DSM-IV, os quadros de doença depressiva mais graves que tiverem mais de duas semanas de evolução são enquadrados na categoria diagnóstica “Depressão Maior”. Os critérios diagnósticos incluem: 1. humor deprimido a maior parte do tempo, na maioria dos dias; 2. diminuição marcante no interesse ou prazer em todas, ou quase todas, as atividades (anedonia); 3. aumento ou diminuição marcados de peso ou apetite; 4. insônia ou hipersonia quase todos os dias; 5. agitação ou retardo psicomotor quase todos os dias; 6. fadiga ou falta de energia quase todos os dias; 7. sentimentos de

desvalorização ou culpa excessiva; 8. diminuição na habilidade de concentração do pensamento; 9. pensamentos recorrentes de morte ou idéias ou tentativas de suicídio. O diagnóstico de depressão maior requer a presença de no mínimo 5 sintomas, sendo que, pelo menos 1 dos dois primeiros devem estar incluídos. Já a distímia necessita da presença crônica (mínimo de 2 anos) de humor deprimido e mais, pelo menos, dois dos seguintes sintomas: 1. alteração do apetite; 2. insônia ou hipersonia; 3. fadiga ou falta de energia; 4. baixa auto-estima; 5. dificuldades de concentração ou de tomar decisões; 6. sentimentos de desesperança.

A depressão é o transtorno mental mais comum em todo o mundo. Algumas estimativas relatam que aproximadamente 20% da população experimenta algum tipo de depressão em suas vidas (Kessler et al., 1994; Gorman et al., 2006). De acordo com a Organização Mundial da Saúde, a depressão ocupa o quarto lugar entre as dez causas principais da carga mundial de morbidade. Projeta-se que em 2020 esteja ocupando o segundo lugar. Anualmente, dez a vinte milhões de pessoas com depressão tentam o suicídio. No Brasil, dados presentes na página do Ministério da Saúde (<http://portal.saude.gov.br/saude>) indicam a presença de aproximadamente 10 milhões de pessoas com depressão em nosso país.

Apesar da grande prevalência desse e de outros transtornos de humor, apenas cerca de um terço dos indivíduos que sofrem com esses transtornos são tratados (Stahl, 2000), e o tratamento farmacológico inicial para pacientes com depressão maior ainda pode falhar em 30% a 40% dos casos (Tunnicliff e Malatynska, 2003). Atualmente, dada a ineficácia no diagnóstico e tratamento de doenças como o Transtorno Depressivo Maior, países como os Estados Unidos da América registram estatísticas indicando a presença de transtorno depressivo em

aproximadamente 70% dos indivíduos suicidas, e o suicídio é a sétima causa de morte nesse país (Stahl, 2000). Estes dados confirmam a necessidade de maiores estudos para o esclarecimento da fisiopatologia da depressão e de tratamentos mais eficazes para esta doença.

Não são conhecidas ainda todas as causas da depressão e talvez ainda demore muito tempo para essa tarefa ser concluída. Sabe-se que esta é uma doença multifatorial abrangendo fatores psicossociais, e, conseqüentemente, biológicos (Peluso e Blay, 2008). A depressão pode resultar da disfunção das vias neurotransmissoras do encéfalo, bem como de uma resposta comportamental mal adaptada ao estresse social. Há também a contribuição da herança genética. Familiares em primeiro grau de pacientes com distúrbio depressivo maior têm um risco de 1,5 a 3 vezes maior do que a população geral de desenvolver quadros semelhantes Van Rossum e col. (2006) demonstraram a influência de elementos genéticos na depressão, e outros autores relacionaram polimorfismos genéticos à resposta aos antidepressivos (Yu et al., 2002; Kim et al., 2006).

Foi demonstrado em modelos animais que eventos estressantes que ocorrem no período pré-natal podem causar alterações na fisiologia e comportamento, aumentando assim o risco de desenvolver disfunção afetiva no animal adulto ([Abe](#) et al., 2007; Peluso e Blay, 2008).

Outro aspecto importante a considerar na etiologia deste transtorno é o gênero. O número de mulheres com depressão é o dobro do número de homens, e essa prevalência é especialmente observada entre a puberdade e o final da idade reprodutiva (Weissman et al., 1996). Flutuações nos níveis hormonais têm

sido associadas a um aumento na sintomatologia depressiva, observada em casos de transtorno disfórico pré-menstrual, depressão perimenopausal e na depressão pós-parto (Schmidt et al., 2004; Freeman et al., 2004; Zanardi et al., 2007).

Cerca de 80% das mulheres apresentam sintomas na semana que antecede a menstruação, e que cessam nos primeiros dias após o início desta. Denominada síndrome de tensão pré-menstrual na 9ª Classificação Internacional de Doenças (CID-9), recebeu revisão e novos critérios diagnósticos pela Associação Psiquiátrica Americana. A partir de então, passou a ser denominado transtorno disfórico pré-menstrual (TDPM). O início dos sintomas geralmente ocorre na metade da segunda década de vida, sendo que a demanda por tratamento geralmente ocorre na metade dos 30 anos. Aproximadamente 3 a 11% das mulheres relatam que seus sintomas são graves a ponto de provocarem prejuízo importante ou mesmo incapacidade em suas atividades cotidianas (Rapkin e Winer, 2009). Os critérios diagnósticos deste transtorno incluem quatro sintomas obrigatórios que são: humor deprimido, ansiedade, instabilidade afetiva e interesse diminuído nas atividades rotineiras. Ainda, deve existir no mínimo outro sintoma qualquer do quadro diagnóstico do DSM-IV, por dois ciclos consecutivos. No entanto, foi relatado que 12,6% das mulheres preenchem totalmente os critérios para TDPM em um ciclo menstrual e no seguinte têm menos sintomas; porém, os que permanecem apresentam grande severidade (Braverman, 2007) encontraram também alta prevalência (35,3%) de mulheres com quatro ou mais sintomas, que se aproximam, mas não alcançam, os quesitos do DSM-IV de cinco ou mais sintomas cardinais. Eles encontraram prevalência de 18,6% de subdiagnosticadas, que, apesar de não se enquadrarem nos critérios americanos,

Apresentaram risco bastante elevado de tentativas de suicídio (Freeman et al., 1996).

A perimenopausa é outro período caracterizado por mudanças endócrinas onde há um aumento da susceptibilidade para a depressão. O período perimenopausal refere-se quando os ciclos menstruais da mulher começam a ficar irregulares, o que geralmente ocorre entre os 45 e os 49 anos. De acordo com a Organização Mundial de Saúde e do *Stages of Reproductive Aging Workshop*, menopausa é definida como o período de 12 meses seguidos de amenorréia, que ocorre em média aos 51 anos. Mulheres perimenopausais apresentam maiores índices de depressão do que pré ou pós menopausais. O risco de suicídio em mulheres é aumentado entre os 45 e os 64 anos.

A depressão pós-parto também é um transtorno de importante prevalência. Os sintomas podem surgir no início ou durante as duas primeiras semanas após o parto. Sabe-se que cerca de 19,2% das mulheres têm um episódio depressivo durante os primeiros 3 meses pós-parto, e muitos destes episódios são desencadeados imediatamente após o parto (Gavin et al., 2005). Foi sugerido que o TDPM é um fator de risco significativo no desenvolvimento da depressão pós-parto (Bloch et al., 2006), indicando um possível mecanismo de ação comum entre estes transtornos.

Estas importantes alterações de humor que ocorrem nas mulheres estão relacionadas às variações hormonais que ocorrem nos períodos acima descritos, o que justifica a importância de considerar o fator gênero nos estudos sobre o transtorno depressivo, onde os hormônios gonadais parecem exercer uma importante influência.

As principais teorias que procuram explicar a fisiopatologia dos distúrbios depressivos originaram-se da elucidação dos efeitos farmacológicos dos fármacos antidepressivos. Três fases caracterizam o desenvolvimento de fármacos antidepressivos. Na primeira fase, o neurônio pré-sináptico monoaminérgico foi considerado a estrutura-alvo, tanto para explicar a origem da depressão como para elucidar os mecanismos de ação dos antidepressivos. Na segunda fase, a investigação científica se concentrou nos receptores monoaminérgicos. O início da terceira fase é recente, e é caracterizada pela ênfase nos eventos de transmissão intracelular.

A hipótese monoaminérgica da depressão surgiu na década de 60, a partir da observação de que o tratamento com fármacos que aumentam as monoaminas no encéfalo melhora esta doença. Atualmente, as principais hipóteses de disfunção dos sistemas neurotransmissores constituem as dos sistemas catecolaminérgico, serotoninérgico e GABAérgico. Os antidepressivos mais eficazes são os que aumentam a atividade serotoninérgica ou noradrenérgica. Na década de 50 surgiram os fármacos que aumentam a atividade de ambos, sistema noradrenérgico e serotoninérgico, através dos inibidores da monoamino oxidase (MAO), enzima degradadora de monoaminas. Em 1987 foi aprovado pela *Food and Drug Administration* o primeiro fármaco que age seletivamente sobre a serotonina, denominado inibidor seletivo da recaptção de serotonina - ISRS, aumentando a sua biodisponibilidade na sinapse. Esta classe de antidepressivos tem uma resposta terapêutica tão boa quanto os anteriores, porém com menos efeitos colaterais. Entretanto, os ISRSs não são eficazes em todos os casos e estão associados a índices elevados de efeitos colaterais sexuais, e aumento do

risco de suicídio em adolescentes. Assim, o significativo número de pacientes não-responsivos ao tratamento com fármacos serotoninérgicos e a presença de efeitos indesejáveis levou à consideração de outras possibilidades terapêuticas. Foi sugerido que há um mecanismo não-serotoninérgico para a ação dos ISRS nos transtornos do humor. No tratamento da depressão maior, estudos clínicos indicam que o perfil farmacológico da fluoxetina, um ISRS, é correlacionado com a capacidade de aumentar os níveis de alopregnenolona no líquido. A alopregnenolona é um metabólito da progesterona, e potente modulador alostérico positivo do receptor $GABA_A$. As doses de fluoxetina utilizadas foram eficazes no tratamento da depressão, porém não houve bloqueio da recaptação da serotonina (Matsumoto et al., 2007; Pinna et al., 2006). Portanto, a progesterona parece ser um novo alvo para o esclarecimento da etiologia da depressão e da diferença de gênero presente neste transtorno. Eser e col. (2006) ressaltaram a importância dos esteróides gonadais nos distúrbios de humor. Parece ser esta uma via promissora de estudos onde a modulação do receptor $GABA_A$ por esteróides neuroativos ou produzidos no sistema nervoso central pode oferecer novos alvos para o desenvolvimento de novos agentes antidepressivos.

O GABA (ácido gama-aminobutírico) é um composto sintetizado pela descarboxilação do glutamato, catalisada pela enzima glutamato descarboxilase (Freichel et al., 2006). Os receptores para GABA são divididos em duas classes: metabotrópicos e ionotrópicos. O receptor $GABA_B$ é do tipo metabotrópico e atua por meio de uma proteína G para aumentar a condutância de canais de K^+ . O receptor $GABA_A$ é um canal iônico para Cl^- dependente de ligante envolvido na transmissão inibitória rápida no Sistema Nervoso Central (SNC). As sinapses

GABAérgicas, diferentemente de outras sinapses inibitórias do SNC, estão presentes em abundância em todas as regiões do encéfalo, constituindo aproximadamente um terço de todas as sinapses (Tunnickliff e Malatynska, 2003).

A isoforma do receptor $GABA_A$ mais comum nos mamíferos é constituída por subunidades (α 1-6, β 1-3, γ 1-3, δ , ϵ , θ) que ficam dispostas em um arranjo pentamérico, usualmente composto por duas subunidades alfa, duas subunidades beta e uma subunidade gama ou delta (Baur et al., 2006; Olsen et al., 2007). Ainda existem três subunidades, que estão presentes exclusivamente na retina, onde se agrupam numa forma especializada denominada $GABA_C$ (Bormann, 2000). Embora este receptor também seja ionotrópico, ele não é alterado por moduladores típicos do receptor $GABA_A$, como os benzodiazepínicos e barbitúricos. A bicuculina, um bloqueador clássico do receptor $GABA_A$, também não tem efeito sobre o receptor $GABA_C$ (Sigel, et al., 2006).

Essa forma de arranjo com três diferentes subunidades permite uma enorme diversidade na composição do receptor, embora se saiba que o número de subtipos farmacológicos desse receptor presente em mamíferos seja limitado (Barnard et al., 1998; Olsen et al., 2007). As combinações específicas das subunidades formam receptores com padrões fisiológicos e farmacológicos distintos, que são de grande interesse para desenvolver fármacos com maior especificidade e eficácia, pois contêm sítios de ligação para um número importante de fármacos que podem ativar diretamente ou modular a função GABAérgica (Sieghart e Sperk, 2002; Sigel, et al., 2006; Herd et al., 2007).

O GABA endógeno se liga ao receptor em um sítio de ligação situado entre as subunidades α e β . Os benzodiazepínicos modulam a função do receptor

GABA_A (Wallner et al., 2003) se ligando a um sítio distinto situado entre as subunidades $\alpha 1$ e $\gamma 2$. (Farrant e Nusser, 2005). A partir dessa ligação, ocorrem vários efeitos conhecidos como atividade ansiolítica, relaxante muscular, anticonvulsivante e sedativa.

A subunidade $\alpha 1$ é caracterizada por ser a subunidade com maior expressão entre todas as outras que podem compor o receptor GABA_A, estando presente em cerca de 50% a 60% das moléculas desse receptor (Bormann, 2000; Kralic et al., 2002).

A subunidade $\gamma 2$ é amplamente distribuída pelo encéfalo (Pirker et al., 2000), e tem a importante função de possibilitar a adesão dos receptores à membrana pós-sináptica, sendo então uma espécie de marcador dos receptores GABA_A sinápticos (Barnard et al., 1998; Farrant and Nusser, 2005). Medeia, dessa forma, a inibição GABAérgica sináptica, ou fásica de ratos adultos (Farrant and Nusser, 2005).

Os barbitúricos e o etanol também atuam pela facilitação da condutância do Cl⁻ no receptor GABA_A. Metabólitos de progesterona, corticosterona e testosterona têm ação similar à dos barbitúricos, potencializando a ação inibitória do GABA_A. A progesterona e a desoxicorticosterona em altas doses têm efeitos anestésicos e promotores do sono, e esses efeitos são devido às suas ações sobre os receptores GABA_A.

Os neuroesteróides modulam o sistema GABAérgico também através da inibição tônica mediada por receptores extrassinápticos caracterizados pela expressão da subunidade δ (Belelli et al., 2002; Brown et al., 2002; Wohlfarth et

al., 2002; Farrant e Nusser, 2005). A expressão da subunidade $\gamma 2$ não ocorre simultaneamente com a δ no mesmo receptor (Chandra et al., 2006).

Fatores como o tipo celular e a região encefálica, além das flutuações hormonais, são determinantes da expressão de diferentes conformações referentes às subunidades que compõem o receptor GABA_A (De Blas, 1996; Follesa et al., 2005; Griffiths e Lovick 2005a, 2005b).

Diversos autores têm demonstrado um envolvimento importante das subunidades do receptor GABA_A na modulação do comportamento emocional e no humor (Nin et al., 2008; Amin et al., 2006; Epperson et al., 2006; Brambilla et al., 2003; Tunnickliff e Malatynska, 2003).

A progesterona, além de influenciar de uma forma ainda não bem esclarecida o transtorno depressivo, atua sobre o sistema GABAérgico. Uma proposta para estudo tem sido a modificação da expressão das subunidades do receptor GABA_A por este esteróide. No entanto, estudos com a administração de progesterona e de seu metabólito, alopregnanolona em vários modelos de tratamento agudo e crônico apresentam resultados contraditórios. Follesa e col. (2000) e outros autores (Concas, 99; Sanna, 2009) demonstraram, através de diferentes protocolos experimentais, que a progesterona e seu metabólito diminuem a expressão da subunidade $\gamma 2$ no hipocampo e no córtex cerebral. No entanto, Follesa (2002) em outro estudo, encontrou um aumento da expressão desta subunidade no hipocampo após administração de contraceptivos orais a ratos, resultado este que se repetiu em um estudo anterior do nosso laboratório após administração intra-hipocampal de alopregnanolona (Nin et al., 2008).

Certamente, o mecanismo de ação da progesterona sobre a expressão das subunidades do receptor GABA_A ainda não está bem compreendido.

Além disso, o receptor GABA_A pode ser regulado de uma maneira dependente do sexo (Epperson et al., 2002). O estudo de Gulinello et al., 2003) reforça esta hipótese, pois estes autores, em modelo de interrupção da administração de progesterona, encontraram maiores níveis na expressão da subunidade α_4 na amígdala de fêmeas, o que não ocorreu com os machos. Percebe-se, então, a necessidade de esclarecer os mecanismos de ação da progesterona sobre o comportamento depressivo e sobre a expressão das subunidades GABA_A, analisando diferentes regiões encefálicas, e diversos protocolos experimentais, bem como comparando as respostas de machos e fêmeas.

A progesterona é um hormônio secretado pelos ovários durante o ciclo reprodutivo feminino, pela placenta durante a gravidez e em menores quantidades pelo córtex da supra-renal. No homem, existe em pequenas concentrações como produto do metabolismo da testosterona nas células de Leydig nos testículos e no córtex da supra-renal.

São três os tipos de ciclos reprodutivos das fêmeas dos mamíferos: Ciclo menstrual, ciclo estral e ovulação reflexa.

Em mulheres e nas fêmeas dos gorilas, o ciclo é menstrual, com duração aproximada de 28 dias e dividido em três fases: fase folicular, que inicia juntamente com o sangramento menstrual, fase ovulatória e fase lútea, que finaliza com o início da nova menstruação. Na fase folicular, predomina a secreção

de estradiol, que aumenta e alcança seu pico até a ovulação, geralmente por volta do décimo quarto dia do ciclo. Após a ovulação, inicia-se a fase lútea, com predomínio de secreção da progesterona pelas células do corpo amarelo. Aproximadamente no 22º dia do ciclo, o corpo lúteo começa a degenerar e dois dias antes da menstruação, o corpo lúteo degenera completamente, tornando-se o *corpo albicans*. Neste período, os níveis de estradiol e de progesterona caem drasticamente para seus valores mais baixos finalizando o ciclo.

Outros mamíferos além das mulheres e dos gorilas, não menstruam e seu ciclo sexual é chamado de ciclo estral, relacionado ao período de cio ou estro que ocorre na época da ovulação, normalmente o único momento durante o qual o interesse sexual da fêmea é despertado. Há espécies que ovulam espontaneamente com ciclos poliestrais ou monoestrais durante o ano. Em outras espécies como as fêmeas dos gatos, coelhos e martas, a ovulação reflexa é induzida pela cópula. No ciclo estral típico também há três fases: folicular, ovulatória e a progestacional. Na rata e camundonga, o ciclo estral tem a duração de 4 a 5 dias. O proestro é a fase pré-ovulatória, com duração de 12 a 14 horas. Nesta fase ocorre um pico de estradiol e de progesterona. O estro dura 1 dia, onde ocorre a ovulação e a fêmea está receptiva para a cópula. Se não houver concepção, o ciclo continua com o metaestro, ou diestro I com duração de 6 a 8 horas, seguida do diestro II, com os níveis mais baixos de estradiol e de progesterona.

As ações da progesterona sobre o sistema reprodutor feminino já são bem estabelecidas. No útero, promove as modificações e a manutenção da atividade secretória do endométrio durante a fase lútea. Durante a gravidez, inibe as

contrações uterinas, ação importante para o estabelecimento e pela manutenção do feto no útero. Nas mamas, estimula o desenvolvimento dos lóbulos e alvéolos e aumenta, acentuadamente, sua capacidade de secretar leite. Nas tubas uterinas, aumenta o muco necessário para nutrir o ovócito fecundado durante sua passagem até o útero. Ainda, ela é um composto com papel fundamental na reprodução das fêmeas de várias espécies animais além de outras funções, como desenvolvimento, diferenciação e metabolismo (Pluchino et al., 2006).

Como qualquer hormônio esteróide, a progesterona é lipofílica. Assim, penetra as células livremente e se fixa a um receptor citoplasmático ou nuclear de progesterona. O complexo resultante é transformado em um estado ativo e translocado para o interior do núcleo. Após dimerização, o complexo fixa-se aos elementos reguladores da progesterona no DNA e inicia a síntese de novo mRNA. Este, é o mecanismo de ação clássico, genômico, também denominado lento, da progesterona, bem como de todos os esteróides. No entanto, já são conhecidos efeitos rápidos de membrana pelos esteróides. O encéfalo é um importante sítio de metabolismo da progesterona, onde é metabolizada a alopregnanolona, um potente agonista do receptor GABA_A sendo este um mecanismo de ação rápida proposto. A progesterona também pode ser sintetizada no sistema nervoso central e periférico, nas células gliais e nos neurônios, a partir do colesterol. (Plassart-Schiess e Baulieu, 2001; Schumacher et al., 2000; Stoffel-Wagner, 2003). A progesterona tem sido classificada como um esteróide neuroativo, nomenclatura que se refere a esteróides que, independentemente de sua origem, têm capacidade de modificar a atividade neural (Dubrovsky, 2006) ou como um neuroesteróide, quando é sintetizada no sistema nervoso central.

Sabe-se que a progesterona, bem como o seu derivado, a alopregnenolona, tem efeitos modulatórios significantes sobre os sistemas de neurotransmissores envolvidos na regulação do afeto e do comportamento (Kaur e Kulkarni, 2002; Concas et al., 1999; Brambilla et al., 2003), e a metabolização da progesterona a alopregnanolona parece ser necessária para estes efeitos (Khisti et al., 2000; Frye e Walf, 2002; Klatzkin et al., 2006). Como já foi mencionado, a depressão tem mais alta incidência nas mulheres. A progesterona possivelmente está envolvida nos mecanismos que explicam estas diferenças (Steiner et al., 2003; Stoffel e Craft, 2004; Walf et al., 2006). Em mulheres, os níveis plasmáticos de progesterona aumentam durante a fase lútea do ciclo menstrual e durante a gestação e diminuem no período pós-parto bem como na menopausa e antes da menstruação, períodos em que as mulheres apresentam maiores riscos de apresentar sintomas depressivos (Steiner et al., 2003; Dennerstein et al., 2008; Schmidt et al., 2004; Yonkers et al., 2008). As concentrações encefálicas de alopregnanolona também variam durante o ciclo menstrual (Frye e Bayon, 1999; Frye et al., 2000). Em algumas mulheres, os níveis de esteróides ovarianos estão relacionados à eficácia do tratamento antidepressivo (Huang et al., 2008). Já foi sugerido que as mudanças no humor que ocorrem com as mulheres nestes períodos não estão associadas aos níveis plasmáticos absolutos dos hormônios gonadais, pois os mesmos não variam significativamente comparando mulheres deprimidas e saudáveis (Epperson et al., 2006]. Parecem, no entanto, estar associadas a oscilação abrupta que ocorre nos níveis plasmáticos destes hormônios. Há evidências de que algumas mulheres deprimidas falham em se

adaptar às flutuações das concentrações da progesterona e do seu metabólito, alopregnanolona (Yonkers et al., 2008; Amin et al., 2006).

Clinicamente, a progesterona pode ser usada para contraceção, em terapia de reposição hormonal para mulheres na perimenopausa ou para tratar o transtorno disfórico pré-menstrual (Kulkarni, 2007; Joffe et al., 2007; Dennerstein e Soares, 2008). Todavia, as investigações que avaliam o efeito antidepressivo da administração de progesterona ainda são inconclusivas. Por exemplo: alguns autores demonstraram que o uso de progesterona como contraceptivo pode produzir depressão como efeito colateral (Kulkarni, 2007; Elovainio et al., 2007). Contraditoriamente, outros autores mostraram que mulheres usando contraceptivos hormonais combinados apresentaram menos sintomas depressivos do que aquelas que não receberam este tratamento hormonal. (Rapkin et al., 2008; Joffe et al., 2007). Ainda é relatado que os contraceptivos orais não influenciam este sintoma (Duke et al., 2007).

Tem sido sugerido que mulheres com TDPM possuem alteração na conversão de progesterona a alopregnanolonam e uma falha da resposta adequada da alopregnanolona ao estresse (Klatzkin et al., 2006). Esta hipótese também se aplica a mulheres com depressão na menopausa e no período pós-parto (Yonkers, 2008; Amin et al., 2006). Alguns autores reforçam esta hipótese, sugerindo que os níveis diminuídos de alopregnanolona encontrado em mulheres deprimidas pode levar a uma inabilidade de aumentar a inibição mediada pelo sistema GABAérgico (Amin et al., 2006). Corroborando esta idéia, já foi descrito que a depressão está associada a uma desregulação da função GABAérgica (Brambilla et al., 2003). Como podemos perceber, os transtornos de humor que

ocorrem principalmente em mulheres durante períodos reprodutivos especiais como o ciclo menstrual, pós-parto e perimenopausa são patologias associadas direta ou indiretamente aos hormônios gonadais. Neste estudo, focalizaremos a participação da progesterona no humor. Um dos mecanismos propostos para essas alterações de humor é a plasticidade das subunidades do receptor GABA_A (Halbreich, 2003) observada em modelos animais durante as fases do ciclo estral (Lovick, 2006 e 2008).

As hipóteses etiopatológicas dos transtornos mentais originaram-se a partir de estudos em animais sobre os efeitos de fármacos sobre o sistema nervoso central. A criação de modelos animais válidos para doenças psiquiátricas humanas é uma tarefa difícil, dada a natureza verbal e pessoal de vários sintomas, bem como pela falta de conhecimentos sobre os fatores etiológicos que poderiam ser utilizados para criar estes modelos. Um modelo animal ideal deveria atender a vários critérios: validade etiológica, sintomatologia idêntica ao estado da doença e validade preditiva.

A validade etiológica se refere ao fato de que o modelo deve apresentar condições causais idênticas ao estado humano da doença. Este é um critério difícil de determinar, porque não temos o conhecimento completo da etiologia da depressão.

O segundo critério trata sobre os sintomas da depressão, que podem ser variados, e incluem sintomas emocionais difíceis de testar em animais, como por exemplo, as alterações de humor. Já outros sintomas de ordem física, são facilmente reprodutíveis e observáveis em animais. São eles: alteração no apetite e no peso corporal, alterações da cognição e do eixo HPA, distúrbios do sono,

libido, da motivação, e anedonia. Para medir a anedonia, ou prazer diminuído, um teste freqüentemente utilizado é o da preferência à sacarose. O roedor é exposto a uma solução com sacarose, que é usualmente a preferida, e água. A anedonia é percebida como uma preferência diminuída pela sacarose.

A validade preditiva requer uma resposta comportamental aos antidepressivos que é vista em humanos

Na etiologia da depressão, sabe-se que situações ambientais estressantes têm uma importante e inegável contribuição no desenvolvimento deste transtorno. Desta forma, foram criados modelos com a aplicação de eventos estressores externos não previsíveis e inescapáveis, tentando provocar modificações no comportamento animal similares àquela encontrada na depressão. De todos os modelos utilizados no estudo da depressão em roedores, o desamparo aprendido e o teste do nado forçado são os mais utilizados. Outros modelos também são utilizados, porém não respondem completamente aos antidepressivos, requisito essencial para a validação do modelo.

O modelo do estresse crônico suave utiliza a aplicação de estressores suaves não previsíveis, como a modificação dos procedimentos de cuidado dos animais. Podem ser alteradas, a forragem das caixas, os horários de alimentação, ou mesmo a interrupção da limpeza das caixas. O tempo de aplicação dos estressores pode variar de 3 semanas a 3 meses (Willner, 1984). Como resultado, os animais desenvolvem estado anedônico, um estado marcador da condição depressiva.

O modelo do estresse psicossocial baseia-se no fato de que ratos machos defendem seu território contra intrusos. Quando dois machos adultos são

colocados juntos na mesma caixa, eles estabelecem uma hierarquia social com um macho dominante e outro subordinado através de luta. Para o subordinado, esta é uma experiência estressora (Willner, 1984).

No modelo do desamparo aprendido, proposto por Seligman, em 1972, roedores são expostos a situações de eventos incontroláveis e aversivos, geralmente choques elétricos nas patas, gerando reações de desamparo. Maiores latências das respostas de fuga e esquiva ou a não-aprendizagem dessas respostas caracterizam o desamparo. No entanto, passou a ser utilizado principalmente como um modelo para o teste de drogas e alterações bioquímicas.

O teste da suspensão da cauda é utilizado para camundongos que são pendurados pela cauda, e após um período de movimentos de tentativa de fuga, estes desenvolvem uma postura de imobilidade frente a esta situação estressante inescapável. O teste geralmente tem duração de 6 minutos e verifica-se o tempo gasto para os animais atingirem a postura de imobilidade

O teste do nado forçado é um dos modelos mais tradicionais para o estudo da depressão em animais de laboratório. Este é um modelo clássico, proposto por Porsolt et al., em 1977, usado para testar o efeito antidepressivo de fármacos e apresenta alto valor preditivo, principalmente em relação à resposta aos medicamentos antidepressivos existentes. Neste modelo, os animais são colocados individualmente em aquários de vidro opaco com água, impossibilitados de se apoiarem com as patas ou cauda no fundo do aquário, e sem possibilidade de fuga. Após um período inicial de nado vigoroso, passam a executar apenas movimentos para manter a cabeça fora da água. Este comportamento de imobilidade é interpretado como perda de motivação, ou “Desespero

Comportamental”. O teste é filmado e avaliam-se os períodos de imobilidade e natação. A redução da duração da imobilidade por um fármaco é considerada como efeito antidepressivo.

Um aspecto importante a ser observado é a grande variedade de respostas comportamentais nestes modelos. Strelakova e col. (2004) mostraram que fatores genéticos podem influenciar a diversidade destas respostas, e sugeriu que devem ser considerados nos protocolos de estudo.

Como já foi mencionado, o fator gênero também deve ser considerado na depressão. Em modelos animais, fêmeas e machos respondem diferentemente aos eventos estressores e aos antidepressivos (Leuner et al., 2004; Shors e Leuner, 2003), e alguns autores encontraram que as fêmeas têm se mostrado mais vulneráveis que os machos (Kennett et al., 1986; Barros e Ferigolo, 1998). Também em roedores, já foi demonstrada a influência dos hormônios gonadais no comportamento tipo-depressivo após o teste do nado forçado (Andrade et al, 2007; Barros e Ferigolo, 1998) Esta influência tem sido estudada em diversos trabalhos avaliando fêmeas ao longo do ciclo estral, indução de prenhez, lactação e no período pós-parto (Frye e Walf, 2002; Frye e Walf, 2004; Doornbos et a., 2009). Tem se observado que, em períodos em que os níveis de progesterona estão mais altos como no proestro ou na prenhez, as fêmeas apresentaram menos comportamento tipo-depressivo do que ratas com níveis de progesterona mais baixos, ou seja, durante o diestro e no pós-parto (Frye e Walf, 2002; Frye e Walf, 2004; Stoffel e Craft, 2004). Mas quando foi feita a administração sistêmica de progesterona a roedores machos e fêmeas submetidos ao teste do nado forçado, os resultados foram contraditórios, com relatos de aumento ou não

alteração do comportamento tipo-depressivo após a administração de doses mais altas de progesterona (Kaur e Kulkarni, 2002) bem como diminuição do comportamento tipo-depressivo após a administração de doses mais baixas de progesterona no teste do nado forçado (Martínez-Mota et al., 1999; Molina-Hernández, e Téllez-Alcántara, 2001). Estes resultados mostram que a progesterona pode influenciar o comportamento tipo depressivo em roedores, e reforçam a importância de usar ambos, machos e fêmeas, em modelos como o teste do nado forçado. Embora não se possa extrapolar diretamente os resultados obtidos em roedores para humanos, o estudo dessas diferenças em animais pode contribuir para a elucidação dos mecanismos fisiopatológicos da depressão em humanos, o que pode levar a um diagnóstico mais preciso, e direcionar intervenções terapêuticas, considerando os diferentes gêneros e as grandes flutuações hormonais que ocorrem na população feminina.

O tempo de exposição aos agentes estressores e ao simples manuseio é importante. Em experimentos agudos sem manuseio prévio não foram encontradas diferenças quanto ao sexo no nado forçado (Barros e Ferigolo, 1998; Brotto et al., 2001; David et al., 2001). No entanto, quando os experimentos foram realizados após repetidas experiências estressoras ou o simples manuseio prévio, as fêmeas mostraram maior duração nos comportamentos de mobilidade (Campbell et al., 2003; Alonso e Castellano, 1991; Marvan et al., 1997; Brotto et al., 2001) ou ainda, especificamente, do comportamento de escalar (Campbell et al., 2003), refletindo o esforço de sair de uma condição estressora (Barros e Ferigolo, 1998). Isto está de acordo com resultados prévios de nosso laboratório, onde houve maior tempo de escalar das fêmeas controle em diestro II apenas no

experimento crônico, sem modificar a imobilidade após experimento agudo (Andrade et al., 2007)

Mudanças a curto prazo na expressão do receptor GABA podem refletir mecanismos compensatórios adaptativos, enquanto mudanças na expressão a longo prazo podem refletir desregulação neste sistema depois de manipulação crônica (Sundstrom et al., 2003).

A assimetria no funcionamento do SNC e de seus diferentes sistemas é um fenômeno biológico cuja importância tem sido mais estudada recentemente. Alguns estudos demonstraram que existe uma diferença relativa ao sexo no processamento de emoções em estruturas como o córtex pré-frontal, de forma que o hemisfério direito teria maior relevância dentro desse contexto no sexo masculino e o hemisfério esquerdo seria predominante no sexo feminino em humanos (Tranel e Bechara, 2009). Estudos utilizando a técnica de ressonância magnética funcional têm verificado que a redução no volume de certas áreas no hemisfério cerebral esquerdo está associada com a ocorrência de transtornos comportamentais (Takahashi et al., 2009; Whittle et al., 2009). Em relação a estudos realizados em animais, sabe-se que o córtex pré-frontal apresenta assimetria na proliferação celular em diversas situações relacionadas ao estresse (Czéh et al., 2008), e que o sistema dopaminérgico também apresenta assimetria em seu funcionamento em ratos (Thiel e Swarting, 2001). Por fim, sabe-se que o sistema GABA também apresenta assimetria em relação a sua composição, de forma que se verifica a existência de assimetria no número de sítios de ligação para o GABA em várias estruturas límbicas (Guarneri et al., 1988), mas curiosamente essas diferenças são pouco estudadas pelos pesquisadores da

área. Um trabalho recente do nosso laboratório apontou para assimetria na expressão da subunidade $\gamma 2$ entre os hemisférios cerebrais de ratos submetidos à administração intra-hipocampal de alopregnanolona (Nim et al., 2008).

Várias estruturas encefálicas parecem participar da regulação comportamental relacionada ao humor. Entre elas, destacamos o estriado e o córtex pré-frontal (Aylward et al., 1994; Merali et al., 2004; Forbes et al., 2009).

O córtex pré-frontal tem sido relacionado com diversos aspectos comportamentais relacionados à resposta ao estresse e aos comportamentos depressivos e de ansiedade. O córtex pré-frontal situa-se no lobo frontal, anteriormente às regiões motoras. Ocupa cerca de $\frac{1}{4}$ do córtex humano, o que em termos relativos representa a maior proporção entre todos os animais. É composto de três grandes regiões funcionais. A região ventromedial, envolvida com o planejamento de ações e do raciocínio e com o ajuste social do comportamento, entre outras funções. A região dorsolateral, encarregada da memória operacional e a região cingulada anterior, envolvida com as emoções. O córtex pré-frontal estabelece conexões recíprocas com praticamente todo o encéfalo: todas as áreas corticais, vários núcleos talâmicos e núcleos da base, o cerebelo, a amígdala, o hipocampo e o tronco encefálico. Atua, desta forma, em diversas funções, como autoconsciência, capacidade de planejamento complexo e resolução de problemas, memória e aprendizado. Ainda, o córtex pré-frontal medial está envolvido na detecção da controlabilidade de situações estressantes, função também exercida no encéfalo de ratos, que fundamenta o uso do modelo de desamparo aprendido como um modelo animal para depressão (Amat et al., 2005).

Pacientes com depressão maior também apresentam volume reduzido do córtex pré-frontal (Jaracz, 2008), e há aumento da incidência de sintomatologia depressiva em pacientes com hipoperfusão nessa região cerebral (Levy-Cooperman et al., 2008; Akiyama et al., 2008).

Há uma hipótese de que a gravidade da anedonia está associada a um déficit da atividade do estriado ventral, do núcleo accumbens e um excesso de atividade da região ventral do córtex pré-frontal (Gorwood, 2008)

O estriado é a estação de entrada do circuito neural dos núcleos da base. Recebe entradas excitatórias de diferentes regiões do córtex cerebral e uma proeminente entrada diretamente do núcleo talâmico através do qual é um substrato primário para numerosas formas de aprendizado e memória. Ele também recebe fibras da substância negra e do núcleo tegmental peduncular pontino. O estriado é composto, em sua maioria, por neurônios espinhosos médios, onde 95% utilizam o neurotransmissor GABA e exercem sua função fisiológica interagindo com diversos subtipos de interneurônios (Kawaguchi et al., 1995). No circuito motor, a ação dos núcleos da base sobre o fluxo de impulsos nervosos do tálamo ao córtex cerebral é geralmente inibitória e existem duas vias motoras: a via direta e a via indireta, dois circuitos paralelos que têm ações opostas, sendo que a via direta facilita esse fluxo, enquanto a via indireta o inibe. Assim, o balanço da atividade de ambas equilibram a inibição dos núcleos da base. Além de ter um papel geral no controle motor (Pisani et al., 2005) esta estrutura parece ser crítica no controle de respostas comportamentais (Schultz et al., 2003), e em várias formas de aprendizado e memória, como a formação de aprendizado associado à recompensa e aprendizado emocional e de

procedimentos (Steele et al., 2007; Di Filippo et al., 2009). Também parece ser um centro de formação de hábitos (Gerdeman et al., 2003).

Na depressão, também ocorrem anormalidades no funcionamento do estriado. Pacientes com depressão maior apresentaram um fluxo, metabolismo e volume aumentados no estriado durante o episódio depressivo, sendo que o tratamento normalizou estas alterações, mas nem todos os trabalhos demonstraram estes efeitos (Aylward et al., 1994; Parashos et al., 1998; Starkman et al., 2007; Forbes et al., 2009), de maneira que estudos analisando outras hipóteses para melhor elucidação da interação destas estruturas com a sintomatologia depressiva são necessários.

2. HIPÓTESE

Dadas as considerações anteriores, a hipótese desta tese é de que doses baixas de progesterona têm efeito antidepressivo no teste do nado forçado e que as alterações da expressão de subunidades do receptor GABA_A podem ser um mecanismo mediador deste efeito.

3. OBJETIVOS GERAIS

Investigar os efeitos da progesterona sobre o comportamento tipo depressivo e expressão das subunidades do receptor GABA_A de ratos Wistar machos e fêmeas em diferentes fases do ciclo estral, submetidos ou não ao teste do nado forçado.

3.1. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar a diferença de gênero no comportamento tipo-depressivo de ratos Wistar submetidos ao teste do nado forçado.
- Comparar a influência da administração de diferentes doses de progesterona sobre o comportamento de ratos Wistar machos e fêmeas submetidos ao teste do nado forçado;
 - Comparar os efeitos comportamentais do tratamento agudo e crônico no teste do nado forçado;
 - Verificar a influência do gênero e das diferentes fases do ciclo estral sobre a expressão do mRNA das subunidades $\alpha 1$, e $\gamma 2$ do receptor GABA_A no córtex pré-frontal e estriado de ratos Wistar machos e fêmeas.
 - Determinar a influência da administração de progesterona e do nado forçado sobre a expressão do mRNA das subunidades $\alpha 1$ e $\gamma 2$ do receptor GABA_A no estriado e córtex pré-frontal de ratos Wistar machos e fêmeas em diestro II.

- Avaliar a assimetria hemisférica na expressão do mRNA das subunidades $\alpha 1$ e $\gamma 2$ do receptor GABA_A do córtex pré-frontal e estriado de ratos Wistar machos e fêmeas.
- Verificar a influência da administração de progesterona e do nado forçado sobre a expressão protéica das subunidades $\alpha 1$ e $\gamma 2$ do receptor GABA_A no córtex pré-frontal de ratas Wistar em diestro II.
- Correlacionar o comportamento depressivo e a expressão das diferentes subunidades do receptor GABA_A.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Animais

Foram utilizados ratos Wistar adultos, pesando aproximadamente 250 g, com média de 75 dias de idade no início dos experimentos, provenientes do biotério da Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre (UFCSPA). Para os experimentos comportamentais, o número de animais por grupo foi de 7-32 ratos. Para as análises moleculares realizadas com as técnicas de rt-PCR e Western Blot o número de animais por grupo foi de 3 a 6 ratos. Os animais foram separados em grupos de no máximo cinco ratos por gaiola, com livre acesso à ração e água, exceto durante o teste comportamental. Os animais permaneceram em ambiente controlado, sob ciclo claro/escuro de 12 horas (das 07:00 h às 19:00 h) e temperatura ambiental de $20 \pm 2^\circ \text{C}$.

Todos os experimentos foram realizados no mesmo horário, entre 13:00 e 16:00 horas. Durante os procedimentos, os animais foram deixados em suas gaiolas com o máximo de silêncio possível. O sacrifício foi realizado por guilhotina, e os tecidos rapidamente coletados e congelados nas condições apropriadas para dosagens posteriores. As carcaças dos animais foram congeladas e entregues ao Biotério da Farmacologia da UFCSPA para procedimento de eliminação.

Foram tomados todos os cuidados para minimizar o número de animais usados e seu sofrimento. Este estudo foi realizado de acordo com as recomendações do Colégio Brasileiro de Experimentação Animal – 1988 e

aprovado pelo Comitê de Ética da UFRGS (nº 2006/610) e pelo Comitê de Ética da UFCSPA (nº 272/07).

4.2 Ciclo Estral

A partir de 75 dias de vida, o ciclo estral das fêmeas foi acompanhado mediante esfregaço vaginal diário, segundo a técnica de Evans e Long (1922). Os esfregaços foram obtidos por lavagem vaginal diária com solução salina, utilizando-se ponteiros descartáveis de pipetas automáticas adaptadas a uma pêra de borracha. A ponteira foi gentilmente introduzida no canal vaginal e a solução aplicada e retirada duas a três vezes. O material foi analisado a fresco em microscópio óptico. As fases do ciclo foram determinadas pela observação citológica diária durante duas a três semanas antes de iniciar o teste comportamental. No proestro, a citologia vaginal é composta por células epiteliais nucleadas e arredondadas, que aparecem individualmente ou em grupos. No estro, a citologia vaginal apresenta grupos de células escamosas cornificadas, sem núcleos visíveis, de forma irregular e com citoplasma granular. No diestro I ocorre predominância de pequenos leucócitos e células epiteliais escamosas cornificadas. Na fase de diestro II são observados leucócitos e células epiteliais dispersas.

Foram utilizadas as fêmeas que apresentaram de dois a três ciclos estrais regulares completos. Os machos foram manipulados durante o tempo de avaliação do ciclo estral e seleção das fêmeas, com duração similar do processo

de manuseio, tendo em vista a tentativa de estabelecer a igualdade em relação ao estresse a que todos os grupos foram expostos.

4.3 Fármacos e Tratamento

Foram realizados dois experimentos para avaliação do comportamento tipo-depressivo, sendo um agudo e o segundo crônico. As concentrações de progesterona no experimento agudo foram: 0,4, 0,8 e 1,2 mg/kg intraperitoneal. Estas doses foram selecionadas com base nas doses mais baixas relatadas em trabalhos publicados que apresentaram alterações no comportamento tipo-depressivo (Martinez-Mota et al., 1999; Molina-Hernández e Telles-Alcántara, 2001; Kaur e Kulkarni, 2002; Stoffel e Craft, 2004; Walf et al., 2006; Doornbos et al., 2009). A dose de progesterona selecionada para o experimento crônico foi a mais baixa utilizada no experimento agudo (0,4 mg/kg/dia, intraperitoneal), a fim de verificar seu efeito no comportamento tipo-depressivo sem alterar o ciclo estral das fêmeas. O tempo de tratamento dos animais correspondeu a dois ciclos estrais regulares e completos das fêmeas, podendo variar entre oito e dez dias, tendo em vista a variabilidade presente na duração da fase de diestro II. O mesmo protocolo de tratamento foi aplicado aos grupos que receberam progesterona ou veículo, mas que não foram submetidos ao teste do nado forçado. Todas as soluções foram dissolvidas em 1-2 gotas de Tween 80 e salina. Os grupos controle receberam o veículo usado para diluir a progesterona. As soluções foram preparadas no máximo vinte e quatro horas antes do experimento e armazenadas a 4°C. Todas as soluções foram administradas em um volume de 1 mL/kg.

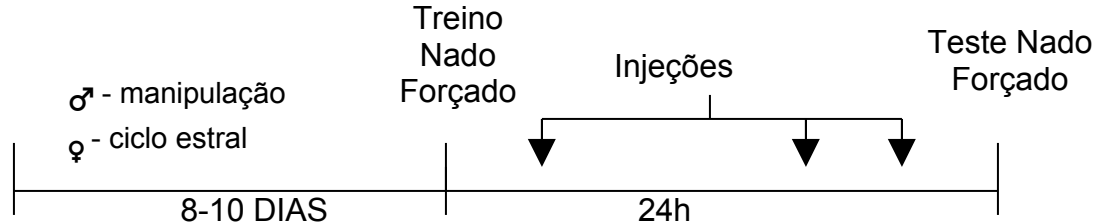
4.4 Procedimentos estressores

Para a análise da expressão do mRNA e da proteína das subunidades do receptor GABA_A, foram considerados os seguintes procedimentos estressores: injeções diárias e teste do nado forçado. Os animais controles foram manuseados apenas durante o acompanhamento do ciclo estral das fêmeas.

4.5. Delineamento experimental

Este estudo foi subdividido em duas etapas com os seguintes protocolos experimentais:

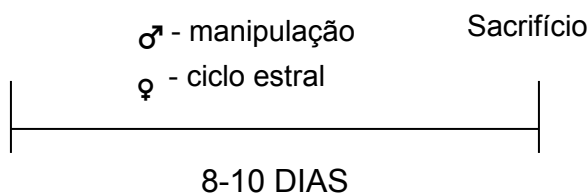
4.5.1 Experimento agudo



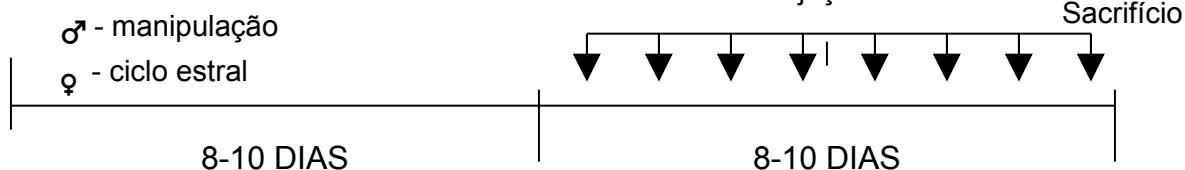
Tratamento: três injeções (*i.p*) de progesterona (0,4, 0,8 ou 1,2 mg/kg) ou salina nos tempos de 24h, 5h e 1 h antes do teste comportamental.

4.5.2 Experimento crônico

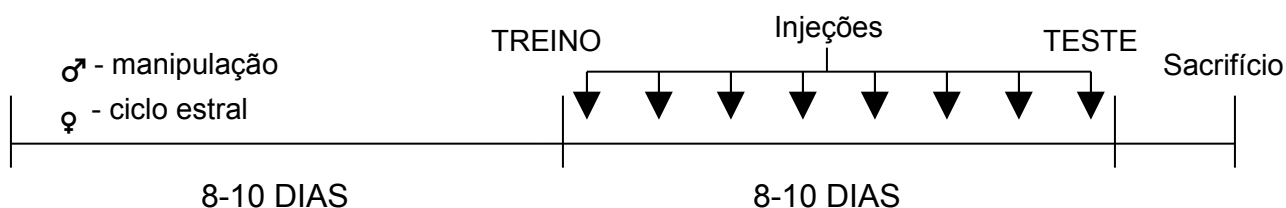
a) Grupo controle



b) Grupo Injeções



c) Grupo Injeções + Nado Forçado



Após o sacrifício, o córtex pré-frontal e estriado direito e esquerdo dos animais de todos os grupos do experimento crônico foram retirados e congelados para posterior análise da expressão do RNAm e da proteína das subunidades do receptor GABA_A por RT-PCR e Western Blot.

4.6 Nado Forçado

Dentre os modelos animais utilizados para o estudo da depressão, destaca-se o modelo animal que utiliza o teste do nado forçado (Porsolt et al., 1977). Nesse método, os animais são colocados individualmente em aquários de vidro opaco (25 x 25 x 40 cm) com água a 25 ± 1° C até uma altura de 27 cm, para impossibilitar que os animais se apoiem com as patas ou cauda no fundo do aquário, sem existir nenhuma possibilidade de fuga.

No primeiro dia (treino), os animais são colocados a nadar no aquário por 15 minutos, ao final dos quais são retirados, secos e recolocados em suas gaiolas. No experimento agudo, os animais são submetidos à segunda sessão de nado chamada de teste, após vinte e quatro horas, com duração de 5 minutos. Entre as duas sessões, são administrados os fármacos em avaliação para atividade antidepressiva em três momentos, quais sejam: 24, 5 e 1 hora antes do teste. No experimento crônico, no último dia de tratamento os animais foram submetidos ao teste.

Neste modelo, depois de colocados nos aquários, os animais submetidos ao teste apresentam um período inicial de nado vigoroso, em que procuram alguma rota de fuga dentro do aquário devido ao estresse ocasionado pelo modelo aos animais. Posteriormente, eles passam a executar apenas movimentos para manter a cabeça fora da água. Este comportamento de imobilidade é interpretado por Porsolt, seu idealizador, como perda de motivação, ou “Desespero Comportamental”. A redução da duração da imobilidade por um fármaco é considerada como efeito antidepressivo ou antidesespero (Porsolt et al., 1977).

As sessões de teste foram gravadas em VHS. Outros parâmetros comportamentais, além do tempo de imobilidade, têm sido explorados na tentativa de melhor descrever os atos e posturas dos animais. Esse detalhamento tem como objetivo determinar a duração e frequência dos comportamentos, construindo etogramas que os especificam frente à situação do teste do nado forçado, bem como as alterações produzidas por doenças ou pelo emprego de fármacos (Parmigiani et al., 1999; Gomez e Barros, 2000). Neste trabalho, os

comportamentos de imobilidade e de mobilidade foram avaliados conforme descrito a seguir.

O comportamento de imobilidade ocorre quando o rato deixa de se esforçar e permanece totalmente imóvel.

Os comportamentos analisados na mobilidade foram escalar e nadar. O comportamento de escalar se dá quando o animal tenta escapar do aquário pelas laterais, tentando escalar suas paredes. O outro comportamento de mobilidade é quando o animal tenta escapar com movimentos de nado pelo centro do aquário, ou permanece nadando com a cabeça acima da água por todo o aquário (nadar).

Para a análise desses comportamentos, foi utilizado o software específico Wabehav (um programa eletrônico de escrita em BASIC) durante a observação das filmagens. A análise foi realizada por apenas um observador previamente treinado para observar e distinguir as diversas posturas de imobilidade e de mobilidade. Cada comportamento (imobilidade, escalar e nadar) foi codificado por uma tecla. Os parâmetros de duração e frequência foram registrados durante 300 segundos mediante o toque da tecla código de cada comportamento no início e fim do mesmo, constituindo, desta forma, os etogramas. Os comportamentos de mobilidade foram contabilizados pela soma dos comportamentos de “nadar” e “escalar”.

Após a construção dos etogramas com os registros de frequência e duração de cada comportamento, o banco de dados subsequente foi submetido à análise estatística.

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

Ao final do teste comportamental, os animais foram secos e recolocados em suas caixas. Trinta minutos após o teste, os animais foram mortos e o estriado e córtex pré-frontal direito e esquerdo foram retirados e rapidamente congelados em nitrogênio líquido para as análises posteriores da expressão do mRNA e da proteína das subunidades do receptor GABA_A.

4.7 Análise Molecular

4.7.1 RT-PCR

A técnica de reação em cadeia da polimerase por transcrição reversa (RT-PCR) foi utilizada para quantificar o mRNA das subunidades do receptor GABA_A. Inicialmente, o RNA total dos tecidos foi extraído utilizando Trizol (Trizol[®] Isolation Reagent Kit), seguindo o protocolo fornecido pelo fabricante. O RNA total foi quantificado por medidas de absorvância (260/280nm) das amostras em alíquotas de água tratada com dietilpirocarbonato (DEPC). A síntese do cDNA foi realizada utilizando-se o Kit SuperScript[™] First-Strand Synthesis System for RT-PCR

(INVITROGEN), de acordo com o protocolo fornecido pelo fabricante. Realizou-se a técnica de RT-PCR semiquantitativo para a determinação da expressão do mRNA das subunidades $\alpha 1$ e $\gamma 2$ do receptor GABA_A. Os oligonucleotídeos iniciadores (*primers*) utilizados para a amplificação dos fragmentos de cDNA específicos para essas subunidades foram desenhados com base na seqüência de cada gene obtida no *Genebank* (www.ncbi.nlm.nih.gov) para a espécie *Rattus norvegicus*. Os primers para a subunidade $\alpha 1$ tinham a seguinte seqüência, de 5' para 3': sense TAACAGCGTCAGCAAATCG e antisense CAGGAATCACTGCGTTGAGA, gerando um produto de 207 pb. Os primers para a subunidade $\gamma 2$ tinham a seguinte seqüência, de 5' para 3': sense CAGCACCATAGCCCGGAAG e antisense CTGTGCCCTCCTATGTGTAG, gerando um produto de 354 pb. Também, foram realizadas PCR para a amplificação do mRNA relativo ao gene da β -actina, cuja expressão não se altera dentro do uso desses protocolos e dessa forma serviu como gene normalizador do estudo, sendo usado para a avaliação da variação no conteúdo de cDNA entre as diferentes amostras e também para a avaliação da eficiência da PCR. Os primers para a β -actina tinham a seguinte seqüência, de 5' para 3': sense ACGTTCAACACCCCAGCCATG e antisense GGCCATCTCTTGCTCGAAGTC, gerando um produto de 340 pb. As PCR foram realizadas em termocicladores (MJ Research™, Watertown, Mass., EUA) com um volume final de 50 μ L: 1,5 U de Taq DNA polimerase, 1,5 μ L de MgCl₂ 50mM, 0,5-1 μ M de cada primer de sense e antisense, 0,2Mm dNTPs e 2 μ L cDNA após uma desnaturação inicial de 94°C por 5'. Foram utilizados os seguintes programas: β -actina (94°C-1min./55°C-

1'/72°C-1 min.; 32 ciclos), $\alpha 1$ (94°C-1min./55°C-50 seg./72°C-50 seg.; 38 ciclos), $\gamma 2$ para o estriado (94°C-1 min./57°C-1min./72°C-1min.; 38 ciclos) e $\gamma 2$ para o córtex pré-frontal (94°C-1min./57°C-1 min./72°C-1 min.; 40 ciclos). Os produtos de amplificação, 5 – 10 μ L, foram submetidos à eletroforese em gel 1,5% agarose corado com brometo de etídio, em um tampão Tris-Borato-EDTA (TBE) e posteriormente analisados pelo sistema radioanalítico de imagens Image Master VDS® (Pharmacia Biotech). A imagem digitalizada foi exportada para um microcomputador e as bandas específicas foram delimitadas e quantificadas por densitometria óptica, utilizando-se o *software* de processamento de imagens Image Master VDS. Os resultados foram expressos como a razão de unidades densitométricas, tendo como numerador a expressão dos genes em estudo e como denominador a expressão de β -actina.

4.7.2 Western-Blot

Para os experimentos envolvendo a expressão proteica pela técnica de Western Blot, foram utilizadas as mesmas amostras submetidas ao processo de extração de RNA, utilizando-se o método do trizol para a extração das proteínas. Inicialmente, realizou-se o isolamento do DNA a partir do resíduo de trizol descartado para a extração do RNA, realizando-se a precipitação do DNA com 0,3 mL de etanol para cada mL de trizol. Misturou-se por inversão e, após estocagem em temperatura ambiente por 2-3 minutos, as amostras foram centrifugadas a 2000 X g por 5 min a 4°C. Transferiu-se o sobrenadante para novos tubos e foi realizado o isolamento das proteínas, com a precipitação por meio de adição de

1,5mL de isopropanol seguido de estocagem a -20°C *overnight*. Posteriormente, após 10 min em temperatura ambiente, as amostras foram centrifugadas por 10 min a $12.000 \times g$ a 4°C . A seguir, realizou-se a etapa de lavagem, com a remoção do sobrenadante e a adição de 2 mL de etanol ao pellet, seguido de nova estocagem *overnight* a -20°C . Por fim, no último dia de extração, após estocagem por 20 min em temperatura ambiente, as amostras foram centrifugadas por 5 min a $7500g$ a 4°C , o sobrenadante foi desprezado e o pellet dissolvido em 150 μL de SDS 1%. As amostras foram incubadas por 10 min a 50°C seguidas de centrifugação final por 10 min a $10000g$ a 4°C e estocadas a -20°C . As proteínas foram quantificadas pelo método descrito por Bradford e colaboradores (1976), que utiliza como padrão uma solução de albumina bovina na concentração de 1 mg/mL. As medidas foram efetuadas em um espectrofotômetro a 595 nm e os resultados expressos em mg/mL. Após a quantificação de proteínas, foi utilizado o sistema mini-protein (Bio-Rad) para a separação das proteínas por eletroforese em gel SDS-PAGE (poliacrilamida com dodecil sulfato de sódio). As amostras foram preparadas com tampão de carga (Tris 65 mM, SDS 10%, glicerol 50%, azul de bromofenol 0,1%) e colocadas em cada canaleta para a realização da eletroforese, que foi realizada na presença de tampão de corrida (glicina 192 mM, Tris 25 mM e SDS 0,1%, pH de 8,3). O peso molecular das proteínas estudadas foi verificado pela utilização do marcador padrão de peso molecular (Full-Range Rainbow Molecular Weight Markers, GE Healthcare). As amostras foram aquecidas por 1 a 3 minutos a 94°C antes de serem submetidas à eletroforese. A seguir, foi realizada a transferência para membranas de nitrocelulose (Hybond, Amersham Biosciences) com corrente elétrica de 250 mA por aproximadamente

60 minutos na presença do tampão de transferência (Tris 25 mM, glicina 192 mM e metanol a 20%, pH 8,3). As membranas foram bloqueadas com leite em pó (Molico, Nestlé) 8% em TTBS (Tris 25 mM, NaCl 140 mM e Tween 20 a 0,05%) por 60 minutos e posteriormente incubadas por 14 a 18 horas em agitação constante a 4°C com o anticorpo primário na diluição de 1:500 em tampão (TTBS com albumina bovina 2,5%). Foram utilizados anticorpos primários para as subunidades $\alpha 1$ e $\gamma 2$ do receptor GABA_A. A seguir, as membranas foram lavadas com TTBS (três períodos de 10 minutos cada) e incubadas com o anticorpo secundário durante duas horas, sob agitação constante em temperatura ambiente, na diluição de 1:5000 em TTBS. Antes de proceder à revelação por quimioluminescência, as membranas foram lavadas por três períodos de 10 minutos com TBS (Tris 20 mM e NaCl 140 mM). A reação de quimioluminescência ocorreu mediante uso de sistema de detecção baseado em substratos luminescentes, com exposição das membranas ao filme radiográfico (Amersham Hyperfilm, GE Healthcare) por aproximadamente 1 minuto. A autorradiografia gerada foi analisada por meio de analisador de imagem e quantificador densitométrico (Image Master VDS, Pharmacia Biotec).

4.8 Análise Estatística

No estudo comportamental foi realizado o teste da análise da variância (ANOVA) de duas vias seguida pelo pós-teste de comparações múltiplas de Student-Newmann-Keuls (SNK) sempre que apropriado. Os fatores considerados foram sexo (machos e fêmeas nas diversas fases utilizadas) e tratamento (veículo

ou progesterona). De acordo com os resultados obtidos, foram calculadas as médias e os erros padrões da média.

Para a análise da expressão do mRNA das diferentes subunidades do receptor GABA_A, em machos e fêmeas nas diversas fases do ciclo, foi realizada ANOVA de duas vias, com os fatores sexo e hemisfério cerebral (direito e esquerdo) dos tecidos analisados, seguida do pós-teste de SNK. Para a análise da expressão do mRNA das subunidades do receptor GABA_A em animais tratados com progesterona e submetidos ou não ao teste do nado forçado foi realizada uma ANOVA de três vias inicialmente, utilizando-se como fatores sexo (machos e fêmeas em diestro II), tratamento (veículo ou progesterona) e hemisfério cerebral (direito ou esquerdo), seguida do pós-teste de SNK. Também foi realizada ANOVA de três vias para a análise do estresse sobre a expressão das subunidades do receptor GABA_A utilizando os fatores estresse (grupos controle, estressados pelos protocolos de injeções ou pelo estresse adicional do nado forçado). Posteriormente, para o estudo mais apurado das diferenças apontadas pela análise inicial através da ANOVA de três vias, foi realizada uma ANOVA de duas vias seguida pelo pós-teste de SNK, utilizando-se os fatores apontados como significantes na ANOVA de três vias. O estudo da expressão protéica das diferentes subunidades do receptor GABA_A foi realizado através de ANOVA de duas vias seguida do pós-teste de SNK, utilizando-se como fatores o tratamento (veículo ou progesterona) e o hemisfério cerebral (córtex pré-frontal direito ou esquerdo). Para a análise dos resultados de rt-PCR e de Western Blot foram calculadas as médias e os desvios padrões.

Foi realizada Correlação de Pearson para verificar a existência de correlações entre os comportamentos e as expressões do mRNA e da proteína das subunidades do receptor GABA_A.

O nível crítico fixado foi de 5% ($P < 0,05$) para se admitir diferença estatisticamente significativa. O software SigmaStat 2.0 foi utilizado como ferramenta computacional para análise estatística dos dados.

5. RESULTADOS

Os resultados obtidos neste estudo foram descritos sob a forma de artigos para submissão em revistas internacionais indexadas. A divisão dos resultados em três artigos e a ordem de apresentação segue a seqüência da realização dos experimentos.

Artigo 1

Título: Sex-dependent antidepressant effects of lower doses of progesterone in rats

Status: Artigo publicado (Physiology and Behavior, 2010. 99:687-690).

Objetivo: Comparar o comportamento tipo-depressivo entre machos e fêmeas, e avaliar o efeito dos tratamentos agudo e crônico sobre o comportamento tipo-depressivo em ratos Wistar.

Conclusão: Fêmeas apresentam maior comportamento tipo-depressivo do que machos no teste do nado forçado. Progesterona altera o comportamento tipo-depressivo de ratos Wistar de forma dependente do gênero.



Brief communication

Sex-dependent antidepressant effects of lower doses of progesterone in rats

S. Andrade^a, S.L. Silveira^a, B.D. Arbo^b, B.A.M. Batista^a, R. Gomez^b, H.M.T. Barros^b, M.F.M. Ribeiro^{a,*}^a Department of Physiology, ICBS, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Sarmento Leite, 500, Porto Alegre, RS, 90050-170, Brazil^b Division of Pharmacology, Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre, Sarmento Leite, 245, Porto Alegre, RS, 90050-170, Brazil

ARTICLE INFO

Article history:

Received 28 May 2009

Received in revised form 28 January 2010

Accepted 1 February 2010

Keywords:

Forced swim test
 Female rats
 Estrous cycle
 Depression
 Gonadal hormones
 Gender

ABSTRACT

Major depression is more prevalent among women than men, and progesterone might be involved in the mechanisms that generate these differences. Progesterone is clinically used for women in several reproductive events, but its antidepressant effect is unclear. Animal studies showed the interference of progesterone on depressive behaviors of rodents, but they are inconclusive, and no study compared different treatment durations. This study investigated the antidepressant effect of low doses of progesterone in male and female rats under acute or chronic administration. Male and female Wistar rats in different phases of the estrous cycle were acutely administered different doses of progesterone (0.0, 0.4, 0.8 and 1.2 mg/kg) and tested in the forced swimming test (FST). The lowest dose of progesterone (0.4 mg/kg) was chronically administered during two complete estrous cycles and diestrous II female and male rats were tested in the FST. Progesterone decreased depressive-like behaviors only in chronically treated diestrous II female rats and increased immobility in male rats. This low dose of progesterone did not interfere in the hormonal cycling in female rats. Results also showed that diestrous II female rats had greater immobility than male rats in the FST. The greater immobility of diestrous II female rats shows that rats in this estrous phase present more depressive-like behaviors that may be associated with their lower serum levels of progesterone. We showed that progesterone chronically administered at low doses reverses these depressive-like behaviors and has an antidepressant effect during the diestrous II phase of the estrous cycle.

© 2010 Elsevier Inc. All rights reserved.

1. Introduction

Major depression is a disorder that has a higher prevalence among women than men [1,2]. This higher prevalence is more evident during the reproductive years, and gonadal hormones might be at least partly responsible for this difference [3,4]. In fact, depression in women seems to be associated with a sudden change in progesterone plasma levels. Studies have shown that the progesterone metabolism to the $3\alpha,5\alpha$ -reduced allopregnanolone is required for progestins to have an antidepressant effect on women and rodents [5–9]. Some studies suggest that women suffering from depression during the postpartum or perimenopause period fail in converting progesterone to allopregnanolone, or have an irregular response to naturally occurring decreases in central GABA levels combined with decreased levels of allopregnanolone [10–12]. Thus, affective disorders in women during the menstrual cycle, after delivery and during the menopausal transition could be directly or indirectly associated with progesterone fluctuations.

The forced swimming test (FST) is a predictive assay of depressive behavior in rodents [13]. The validity of the FST is supported by evidence that classical and nonclassical antidepressants significantly reduce depressive-like behaviors in rodents [9,14,15]. Also in rodents,

gonadal hormones may influence depressive behavior [16,17]. Changes in endogenous progesterone levels and their association with depressive-like behaviors have been studied in female rodents across the estrous cycle, pregnancy, lactation and postpartum condition [7,18,19]. During proestrus, when levels of progesterone are elevated, female rats have less immobility than male or female rats in other stages of the estrous cycle in the FST [7].

Similarly, pregnant rats have fewer depressive behaviors than postpartum female rats, and hormone withdrawal increases depressive-like behaviors in female rats [18,20]. However, contradictory effects of systemic progesterone administration to male and female rodents have been observed in the FST. Although higher doses of progesterone (10 mg/kg) have been shown to increase or not affect immobility in the FST [21], lower doses (0.5–2.0 mg/kg) seem to decrease depressive-like behaviors in rodents in the FST [6,22]. Additionally, these different behavioral responses also may be related to differences in response to acute and chronic stress [16]. It has been shown that depressive behavior in the FST is sensitive to modification by chronic antidepressant treatments at low doses that were ineffective after acute treatment [16,24,25]. These results suggest that progesterone affects the depressive behavior of male and female rodents, but are inconclusive, and no studies have compared different treatment regimens. This study investigated the antidepressant effect of progesterone in male and female rats under acute or chronic administration using the lowest progesterone dose able to produce

* Corresponding author. Tel.: +55 51 3308 3500; fax: +55 51 3308 3656.

E-mail address: mflavia@ufrgs.br (M.F.M. Ribeiro).

behavioral effect without altering hypothalamus–pituitary–gonadal axis.

2. Materials and methods

2.1. Animals

Experiments were conducted with adult female and male Wistar rats weighing 250–350 g, housed in groups of four in polypropylene cages (40×33×17 cm) under standard environmental conditions, such as room temperature of 22±2 °C, 12 light–dark cycles with lights on at 7:00 pm, and free access to food and water. The animals were bred and raised in the animal facility of Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre – Brazil (UFCSPA). Experimental procedures were carried out in accordance with the National Institute of Health Guide for the Care and Use of Laboratory Animals and in accordance with the Brazilian Law for the Scientific Use of Animals. Study protocols were approved by the Ethics Committee for Experimental Procedures of UFCSPA, Porto Alegre, Brazil.

2.2. Drugs

Progesterone (4-Pregnene-3,20-dione, Sigma, St. Louis, MO, USA) was dispersed in 0.1% Tween 80 and then dissolved in saline solution. The control group received an equal volume of vehicle only. In the acute treatment performed to determine the dose–response curve from progesterone, male and female rats received IP injections of vehicle or progesterone at 0.4, 0.8 or 1.2 mg/kg. These doses were selected considering the lower doses reported in the current literature with effect on depressive behavior of rodents [6,19–22,33]. In the chronic treatment, an IP dose of progesterone was administered daily, for 8 to 10 days, during two complete estrous cycles. To chronic treatment, the lowest dose of acute treatment was chosen (0.4 mg/kg) in order to verify its depressant effect and to avoid possible interference over estrous cycle – commonly reported in progesterone administration [6,19–22,33].

2.3. Estrous cycle

The estrous cycle for all female rats was determined by daily vaginal smears for at least 14 days. Only females showing two regular 4–5 day cycles were used [16]. Female rats in proestrous or diestrous II were selected for the acute experiment, and females in diestrous II, for the chronic experiment. To determine whether chronic progesterone treatment would affect the estrous cycle of the female rats, vaginal smears were performed throughout the treatments.

2.4. Forced swimming test (FST)

The rats were submitted to the FST according to a protocol slightly modified from the one originally described by Porsolt et al. [13]. Briefly, the rats underwent two trials in which they were forced to swim in an inescapable pool (22×22×35 cm) filled with 27 cm of cool water (25 °C). In the acute treatment study, a 5-min re-test was conducted 24 h after the initial 15-min test [13]. Three drug doses were administered 24, 5 and 1 h before the FST re-test, according to Porsolt's protocol [13]. In the chronic treatment study, male and female rats received doses of 0.4 mg/kg of progesterone or vehicle daily.

The experiments were recorded with a videocassette camera for later ethological analysis of the duration of the acts and postures during the 5-min FST re-test. After each swimming session, the animals were gently towel-dried and returned to their cages. To rule out pharmacological effects on general motor activity that might account for behavioral patterns in the FST, the rats were placed in an automated locomotion apparatus (Albarsch, Porto Alegre, Brazil)

immediately before the FST re-test session for 5 min to assess their locomotor activity, as proposed by Porsolt et al. [13] and previously described [16]. The swimming sessions were always conducted between 1 and 3 pm and lasted for 15 min to minimize the effect of circadian rhythms on behavioral results.

2.5. Behavioral analysis

Behavioral analyses were conducted by a trained researcher blinded to the different treatment protocols. The videotapes were analyzed by direct computer keyboard input into Basic-written software, as already described [17,23]. Immobility was defined as the total cessation of all movements except breathing. Additionally, two measures of activity were assessed: climbing and swimming duration. Climbing was defined as moving the forepaws up and down against the pool wall, and swimming was defined as vigorous lateral movements of the forepaws while facing away from the pool wall and moving a distance of at least 15 cm or moving to keep the head above water. The presence of depressive-like activity was inferred from a significant amount of immobility time and a reduction in the amount of time spent in active behaviors, such as climbing or swimming.

2.6. Statistical analysis

The statistical analysis of the acute and chronic experiments was performed using a two-way analysis of variance (2-way ANOVA) for two factors: treatment (progesterone or vehicle) and group (sex/estrous cycle). When appropriate, ANOVA was followed by the Student–Newman–Keuls *post hoc* test. All results were expressed as mean ± standard error of the mean (SEM). In all tests, the level of statistical significance was $P < 0.05$.

3. Results

Acute or chronic progesterone treatment did not affect locomotor activity of rats, which ruled out any unspecific motor effects of progesterone in the doses used.

The antidepressant effects of the acute administration of progesterone in female and male rats during the FST were evaluated by a dose–response curve. The duration of immobility in the FST was not affected by any acute doses of progesterone (Fig. 1). The animals did not show any differences in time to perform movements in the pool, such as climbing and swimming, nor in immobile postures.

No abnormal changes in the estrous cycle were observed at any time during the chronic treatments.

Statistical analysis revealed a significant interaction between gender and treatment in immobility behaviors ($F_{(1,109)} = 11.808$, $P < 0.001$). In fact, chronic progesterone treatment decreased the

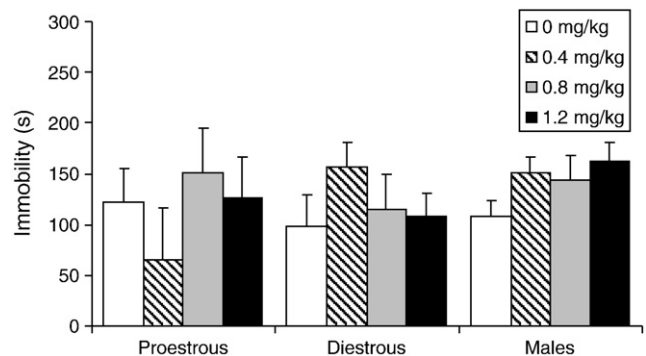


Fig. 1. Effects of acute progesterone administration on immobility behavior of rats submitted to the FST. $n = 7–9$. Mean values ± SEM for each group are shown. The duration of immobility was not altered by any dose of progesterone.

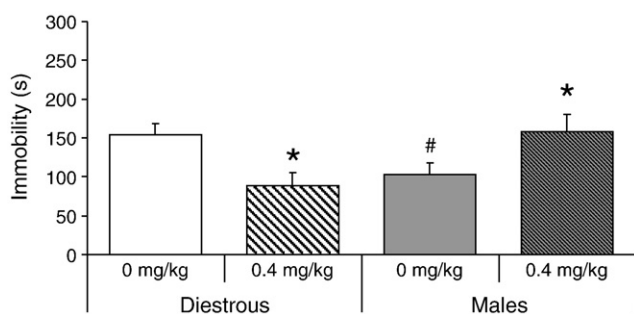


Fig. 2. Effects of chronic progesterone administration on immobility behavior of rats submitted to the FST. $n = 26-32$. Mean values \pm SEM for each group are shown. * $P < 0.05$ vs untreated control group. # $P < 0.05$ vs diestrous II females. Two-way ANOVA revealed that progesterone decreases immobility in diestrous II female and increases immobility in male rats. Additionally, control diestrous II females had a longer immobility than control male rats.

duration of immobility in diestrous II female rats when compared to female control rats, confirming our hypothesis that progesterone has an antidepressant effect (Fig. 2). Similarly to results of previous studies, we also showed that diestrous II female rats had a longer immobility time than male rats. Fig. 2 shows that chronic progesterone treatment increased the immobility in male rats compared with nontreated control male rats.

Analyses of active behaviors confirmed that female rats treated with progesterone swam more than control rats in the diestrous II phase (control: 86.28 ± 13 s; diestrous II: 143.32 ± 15.4 ; $F_{(1,109)} = 8.498$, $P = 0.004$). Additionally, treated male rats had a lower duration of climbing (55 ± 9.4) than control male rats (81.15 ± 7.4). Also, control male rats had a higher duration of climbing (81.15 ± 7.4) than diestrous II control female rats (58.22 ± 7.4 s; $F_{(1,109)} = 4.598$, $P = 0.03$).

4. Discussion

These experiments were designed to test the hypothesis that the administration of low doses of progesterone may have an antidepressant effect on Wistar rats. The acute experiment showed that progesterone did not affect immobility in female and male rats. However, the chronic administration of progesterone (0.4 mg/kg) decreases immobility in diestrous II females and increases immobility in male rats. In a previous study in our laboratory, acute treatment with the neuroactive steroid DHEA did not affect immobility behavior, and the chronic administration of low doses produced significant effects on immobility [16]. Other studies showed that lower, ineffective acute doses became effective after chronic treatment [24,25]. Although antidepressants produce effects on the FST after either short-term or chronic treatment, some authors suggested that chronic treatment increases sensitivity to the behavioral effects of antidepressants during the FST [24,25]. These findings are consistent with those reported by another study, which showed that the duration and intensity of stressful stimuli may deeply affect the biochemical responses during the FST [26].

Tests with the chronic treatment groups also revealed that the antidepressant effect of low doses of progesterone is sex specific. Treated diestrous II females spent significantly less time immobile in the FST than did those that were administered vehicle only. The opposite effect was observed for male rats. Similarly, a number of studies found sex differences in depressive-like behavior [27,28]. The sex-specific response to treatment with the steroid hormone DHEA in rats submitted to the FST was described [16]. Chronically administered corticosterone exerts mildly antidepressant effects on FST behaviors in female rats, but the opposite effect in male rats [27]. Differences of gender have also been shown in responses to the FST in the monoaminergic system [29,30]. Furthermore, our laboratory

[16] demonstrated sex differences in hypothalamic–pituitary–adrenal axis activity after the FST. It has recently been demonstrated that antidepressants induced sex-dependent changes in the brain's glutamate content [31]. These results are associated with other factors, such as type and duration of stressors and brain region under study. These findings may help to explain the mechanisms involved in the sex differences of depression. Our findings reinforce that clinical studies should not neglect sex differences in antidepressant treatments.

Interestingly, in this study, the dose of progesterone which was effective to reverse depressive-like behaviors in rats did not affect female estrous cycle. This non interference on the hormonal cycling supports the idea that our results are not related to indirect effect on peripheral secretion of gonads and adrenals. In fact, this dose is lower than that used as hormone replacement for ovariectomized rodents and to induce behavioral estrous [32,33]. One possible interpretation of this finding is that the brain function that controls depressive-like behavior might be more sensitive to slight variations of progesterone concentrations than the hypothalamic–pituitary–gonadal axis. Other studies reported similar antidepressant effects of systemic administration of low doses of progesterone to female rodents [6,22], and increased or unchanged immobility in this and other animal models of depression at higher dosages [21,34]. The data presented here, though not conclusive, support the hypothesis that lower doses of progesterone than those that affect the reproductive cycle may be used in the treatment of female depression and may mitigate the dramatic decline in levels of progesterone associated with periods of hormonal change, such as premenstrual dysphoric disorder, perimenopause and postpartum.

The effect of progesterone may also be dependent on how and when progesterone is administered. Studies showed that progesterone withdrawal may have depressive-like effects [20,35]. Our current study focused on the effects immediately after the treatment with progesterone; however, attention should be paid to the effects of withdrawal of low doses of progesterone in further studies.

Sex differences were found in the behaviors in the FST during chronic treatment, but not in the acute treatment study. Interestingly, in control groups, diestrous II female rats had greater immobility than males. Although findings in the literature are contradictory about sex differences in the FST, this result is in agreement with another study, which was performed in diestrous female rats [36]. Authors show that diestrous female rats have a longer duration of immobility than male rats. Previous reports in our laboratory failed to demonstrate sex differences [16] or showed increased immobility in male rats [37]. The small number of animals used in such experiments might have played an important role in their results. Studies comparing sex differences found controversial responses. Whereas some authors [38] did not find any sex differences, others reported that females are more active [29,39] or less active [40] than males. These studies used different rodent species, different strains within a given species and different protocols, which makes it difficult to conduct a direct comparison between results. Therefore, it seems that differences do exist, but that a larger number of individuals per group should be used to achieve statistical power due to the great variability of parameters.

The greater immobility of diestrous female rats suggests that females in this estrous phase may have a predisposition to depressive-like behavior. Coincidentally, both diestrous II female rats and women in specific reproductive periods, such as in the premenstrual period, postpartum and perimenopause, have lower serum levels of progesterone and are more susceptible to depressive-like behaviors. The use of diestrous II female rats may, therefore, be more appropriate to provide a valid model of human depression in women.

Data in this study showed that the chronic administration of low doses of progesterone was efficient in reducing depressive-like behavior in female rats. Its mechanisms of action, which may involve modifications of GABA_A membrane receptors, remain to be clarified.

References

- [1] Gorman JM. Gender differences in depression and response to psychotropic medication. *Gen Med* 2006;3:93–109.
- [2] Rouillon F. Epidemiology of mood disorders. *Rev Prat* 2008;58:361–5.
- [3] Frackiewicz EJ, Sramek JJ, Cutler NR. Gender differences in depression and antidepressant pharmacokinetics and adverse events. *Ann Pharmacother* 2000;34:80–8.
- [4] Steiner M, Dunn E, Born L. Hormones and mood: from menarche to menopause and beyond. *J Affect Disord* 2003;74:67–83.
- [5] Khisti RT, Chopde CT, Jain SP. Antidepressant-like effect of the neurosteroid 3 α -hydroxy-5 α -pregnan-20-one in mice forced swim test. *Pharmacol Biochem Behav* 2000;67:137–43.
- [6] Molina-Hernández M, Téllez-Alcántara NP. Antidepressant-like actions of pregnancy, and progesterone in Wistar rats forced to swim. *Psychoneuroendocrinology* 2001;26:479–91.
- [7] Frye CA, Walf AA. Changes in progesterone metabolites in the hippocampus can modulate open field and forced swim test behavior of proestrous rats. *Horm Behav* 2002;41:306–15.
- [8] Klatzkin RR, Morrow AL, Light KC, Pedersen CA, Girdler SS. Histories of depression, allopregnanolone responses to stress, and premenstrual symptoms in women. *Biol Psychol* 2006;71:2–11.
- [9] Nin MS, Salles FB, Azeredo LA, Frazon AP, Gomez R, Barros HM. Antidepressant effect and changes of GABA_A receptor gamma2 subunit mRNA after hippocampal administration of allopregnanolone in rats. *J Psychopharmacol* 2008;22:477–85.
- [10] Amin Z, Mason GF, Cavus I, Krystal JH, Rothman DL, Epperson CN. The interaction of neuroactive steroids and GABA in the development of neuropsychiatric disorders in women. *Pharmacol Biochem Behav* 2006;84:635–43.
- [11] Parry BL. Perimenopausal depression. *Am J Psychiatry* 2008;165:23–7.
- [12] Fan F, Zou Y, Ma A, Yue Y, Mao W, Ma X. Hormonal changes and somatopsychologic manifestations in the first trimester of pregnancy and post partum. *Int J Gynecol Obstet* 2009;105:46–9.
- [13] Porsolt RD, Anton G, Blavet N, Jalife M. Behavioural despair in rats: a new model sensitive to antidepressant treatments. *Eur J Pharmacol* 1978;47:379–91.
- [14] Lucki I. The forced swimming test as a model for core and component behavioral effects of antidepressant drugs. *Behav Pharmacol* 1997;8:523–32.
- [15] Gomez R, Barros HMT. Ethopharmacology of the antidepressant effect of clonazepam in diabetic rats. *Pharmacol Biochem Behav* 2000;66:329–35.
- [16] Andrade S, Silveira SL, Gomez R, Barros HM, Ribeiro MF. Gender differences of acute and chronic administration of dehydroepiandrosterone in rats submitted to the forced swimming test. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* 2007;31:613–21.
- [17] Barros HM, Ferigolo M. Ethopharmacology of imipramine in the forced-swimming test: gender differences. *Neurosci Biobehav Rev* 1998;23:279–86.
- [18] Frye CA, Walf AA. Hippocampal 3 α , 5 α -THP may alter depressive behavior of pregnant and lactating rats. *Pharmacol Biochem Behav* 2004;78:531–54.
- [19] Doornbos B, Fokkema DS, Molhoek M, Tanke MA, Postema F, Korff J. Abrupt rather than gradual hormonal changes induce postpartum blues-like behavior in rats. *Life Sci* 2009;84:69–74.
- [20] Stoffel EC, Craft RM. Ovarian hormone withdrawal-induced “depression” in female rats. *Physiol Behav* 2004;83:505–13.
- [21] Kaur G, Kulkarni SK. Evidence for serotonergic modulation of progesterone-induced hyperphagia, depression and algesia in female mice. *Brain Res* 2002;943:206–15.
- [22] Martínez-Mota L, Contreras CM, Saavedra M. Progesterone reduces immobility in rats forced to swim. *Arch Med Res* 1999;30:286–9.
- [23] Gomez R, Barros HM. Ethopharmacology of the antidepressant effect of clonazepam in diabetic rats. *Pharmacol Biochem Behav* 2000;66:329–35.
- [24] Detke MJ, Johnson J, Lucki I. Acute and chronic antidepressant drug treatment in the rat forced swimming test model of depression. *Exp Clin Psychopharmacol* 1997;5:107–12.
- [25] Cryan JF, Page ME, Lucki I. Differential behavioral effects of the antidepressants reboxetine, fluoxetine, and moclobemide in a modified forced swim test following chronic treatment. *Psychopharmacology (Berl)* 2005;182:335–44.
- [26] Consoli D, Fedotova J, Micale V, Saponov NS, Drago F. Stressors affect the response of male and female rats to clomipramine in a model of behavioral despair (forced swim test). *Eur J Pharmacol* 2005;520:100–7.
- [27] Brotto LA, Gorzalka BB, Barr AM. Paradoxical effects of chronic corticosterone on forced swim behaviours in aged male and female rats. *Eur J Pharmacol* 2001;424:203–9.
- [28] Bielajew C, Conkole AT, Kentner AC, Baker SL, Stewart A, Hutchins AA, et al. Strain and gender specific effects in the forced swim test: effects of previous stress exposure. *Stress* 2003;6:269–80.
- [29] Dalla C, Antoniou K, Kokras N, Drossopoulou G, Papathanasiou G, Bekris S, et al. Sex differences in the effects of two stress paradigms on dopaminergic neurotransmission. *Physiol Behav* 2008;93:595–605.
- [30] Drossopoulou G, Antoniou K, Kitraki E, Papathanasiou G, Papalexi E, Dalla C, et al. Sex differences in behavioral, neurochemical and neuroendocrine effects induced by the forced swim test in rats. *Neuroscience* 2004;126:849–57.
- [31] Kokras N, Antoniou K, Polissidis A, Papadopoulou-Daifoti Z. Antidepressants induce regionally discrete, sex-dependent changes in brain's glutamate content. *Neurosci Lett* 2009;464:98–102.
- [32] Asarian L, Geary N. Cyclic estradiol treatment normalizes body weight and restores physiological patterns of spontaneous feeding and sexual receptivity in ovariectomized rats. *Horm Behav* 2002;42:461–71.
- [33] Walf AA, Sumida K, Frye CA. Inhibiting 5 α -reductase in the amygdala attenuates antianxiety and antidepressive behavior of naturally receptive and hormone-primed ovariectomized rats. *Psychopharmacology (Berl)* 2006;186:302–11.
- [34] Reddy DS, Kaur G, Kulkarni SK. Sigma (sigma1) receptor mediated antidepressant-like effects of neurosteroids in the Porsolt forced swim test. *NeuroReport* 1998;9:3069–73.
- [35] Beckley EH, Finn DA. Inhibition of progesterone metabolism mimics the effect of progesterone withdrawal on forced swim test immobility. *Pharmacol Biochem Behav* 2007;87:412–9.
- [36] Frye CA, Wawrzycki J. Effect of prenatal stress and gonadal hormone condition on depressive behaviors of female and male rats. *Horm Behav* 2003;44:319–26.
- [37] Ferigolo M, Barros HM, Marquardt AR, Tannhauser M. Comparison of behavioral effects of moclobemide and deprenyl during forced swimming. *Pharmacol Biochem Behav* 1998;60:431–7.
- [38] David DJ, Nic Dhonnchadha BA, Jolliet P, Hascoët M, Bourin M. Are there gender differences in the temperature profile of mice after acute antidepressant administration and exposure to two animal models of depression? *Behav Brain Res* 2001;119:203–11.
- [39] Yang Y, Li W, Zhu B, Liu Y, Yang B, Wang H, et al. Sex differences in antidepressant-like effect of chronic repetitive transcranial magnetic stimulation in rats. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* 2007;31:735–40.
- [40] Paré WP, Redei E. Sex differences and stress response of WKY rats. *Physiol Behav* 1993;54:1179–85.

Artigo 2

Título: The effects of progesterone on the subunits of the GABA_A receptor in the striatum of rats are dependent on brain hemisphere, stress and gender

Status: Artigo submetido (Brain Research)

Objetivo: Verificar a expressão do mRNA das subunidades alfa1 e gama2 do receptor GABA_A nos estriados direito e esquerdo de ratos Wistar submetidos ou não a diferentes estressores e ao tratamento crônico com progesterona.

Conclusão: A expressão das subunidades $\alpha 1$ e $\gamma 2$ no estriado é específica ao gênero, sofrendo interação com o estresse e com o hemisfério cerebral. Estes fatores interferem, conjuntamente, na alteração destas subunidades em resposta ao tratamento com progesterona. O efeito pró-depressivo da progesterona nos machos está correlacionado com o aumento da expressão da subunidade $\gamma 2$ no estriado direito destes ratos.

Manuscript Number:

Title: THE EFFECTS OF PROGESTERONE ON THE SUBUNITS OF THE GABAA RECEPTOR IN THE STRIATUM OF RATS ARE DEPENDENT ON BRAIN HEMISPHERE, STRESS AND GENDER

Article Type: Research Report

Section/Category: Cellular and Molecular Biology of Nervous Systems

Keywords: GABAA, striatum, gender, asymmetry, progesterone and stress

Corresponding Author: Mrs susie andrade,

Corresponding Author's Institution: UFRGS

First Author: susie andrade

Order of Authors: susie andrade; Susie Andrade; Bruno D Arbo; Bruna A Batista; Alice M Neves; Gisele Branchini; Rosane Gomez; Ilma S Brum; Helena T Barros

Manuscript Region of Origin: BRAZIL

Abstract: γ -aminobutyric acid (GABA) is the main inhibitory neurotransmitter in the central nervous system, and generally consists of a combination of $2\alpha 1$, $2\beta 2$ and $1\gamma 2$ subunits. Alterations in the GABAA receptor subunits are involved in the responses to acute or repeated stress, and in the modulation of emotional behavior. The striatum is an input station for the basal ganglia, which is involved in behavioral responses. In this structure, there is evidence of brain asymmetry in the GABAergic system related to depression. Female and male rats under different stress conditions received progesterone, and the effects on the GABAA $\alpha 1$ and $\gamma 2$ receptor subunit mRNA expressions in the striatum were examined. The expression of the $\gamma 2$ subunit displayed a gender-specific asymmetry. The stress caused by injections decreased the expression of $\gamma 2$ and $\alpha 1$ mRNA in the striatum of both male and female rats, while stress caused by forced swimming decreased only the expression of $\gamma 2$. Also, the expression of the $\gamma 2$ and $\alpha 1$ subunits modified in according to the nature of the stressor. Chronic progesterone treatment increased both, $\gamma 2$ and $\alpha 1$ subunits, depending on the brain hemisphere, the level of stress, and the gender. A positive correlation between depression-like behavior in male rats treated with progesterone and the expression of the $\gamma 2$ subunit in the right hemisphere was noted. Our findings suggest that the $\gamma 2$ subunit of GABAAR can play an important role in the regulation of depressive behavior under certain stress conditions.



Maria Flávia Marques Ribeiro
UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
Instituto de Ciências Básicas da Saúde
Departamento de Fisiologia
Rua Sarmiento Leite, 500 – 2º andar
Porto Alegre - RS, BRASIL - CEP 90050-170
FAX: +55 51 3316-3656
mflavia@ufrgs.br

April 8, 2010.

Brain Research

Dear Editor

We are submitting to your appreciation the manuscript entitled “The Effects of progesterone on the subunits of the gaba_a receptor in the striatum of rats are dependent on brain hemisphere, stress and gender “ which we would like you to consider for publication in Brain Research. Our study was performed in accordance with the National Institute of Health Guide for the Care and Use of Laboratory Animals (1996) and the Brazilian Law for the Scientific Use of Animals (11794/08). Also, this study was approved by the Ethics Committee for Experimental Procedures of UFCSPA (272/07) and of UFRGS (610/06). This manuscript has not been published and is not under consideration for publication in any other journal.

We look forward to hearing from you regarding the status of our manuscript. In the meantime, please feel free to contact us if you need any additional information.

Sincerely,

Maria Flávia Marques Ribeiro, M.S., Ph.D.
Corresponding author
Department of Physiology, UFRGS
Rua Sarmiento Leite, 500
90050-170 - Porto Alegre, RS, Brazil
Phone.: + 55 51 3316 3500
Fax: + 55 51 3316 3656
E-mail: mflavia@ufrgs.br



Maria Flávia Marques Ribeiro
UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
Instituto de Ciências Básicas da Saúde
Departamento de Fisiologia
Rua Sarmiento Leite, 500 – 2º andar
Porto Alegre - RS, BRASIL - CEP 90050-170
FAX: +55 51 3316-3656
mflavia@ufrgs.br

Dear Editor

Suggested Reviewers:

1. Giovanni Biggio

e-mail: biggio@unica.it

2. Thelma A. Lovick

e-mail: t.a.lovick@bham.ac.uk

3. Cheryl A. Frye

e-mail: fryeca@gmail.com <fryeca@gmail.com>

Sincerely

Maria Flávia Marques Ribeiro

THE EFFECTS OF PROGESTERONE ON THE SUBUNITS OF THE GABA_A RECEPTOR IN
THE STRIATUM OF RATS ARE DEPENDENT ON BRAIN HEMISPHERE, STRESS AND
GENDER

Authors:

Susie de Andrade ^a, Bruno D. Arbo ^b, Bruna A.M. Batista ^a, Alice M. Neves ^a, Gisele Branchini ^a,
Rosane Gomez ^b, Ilma Brum ^a, Helena M.T. Barros ^b, Maria Flávia M. Ribeiro. ^a

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

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

Total pages: 26

The number of figures: 3

Corresponding author:

Maria Flávia Marques Ribeiro

Department of Physiology, ICBS, Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Sarmiento Leite, 500, Porto Alegre, RS, 90050-170, Brazil.

Tel.: + 55 51 3308 3500; fax: +55 51 3308 3656.

E-mail address: mflavia@ufrgs.br

ABSTRACT

Y-aminobutyric acid (GABA) is the main inhibitory neurotransmitter in the central nervous system, and generally consists of a combination of $2\alpha 1$, $2\beta 2$ and $1\gamma 2$ subunits. Alterations in the GABA_A receptor subunits are involved in the responses to acute or repeated stress, and in the modulation of emotional behavior. The striatum is an input station for the basal ganglia, which is involved in behavioral responses. In this structure, there is evidence of brain asymmetry in the GABAergic system related to depression. Female and male rats under different stress conditions received progesterone, and the effects on the GABA_A $\alpha 1$ and $\gamma 2$ receptor subunit mRNA expressions in the striatum were examined. The expression of the $\gamma 2$ subunit displayed a gender-specific asymmetry. The stress caused by injections decreased the expression of $\gamma 2$ and $\alpha 1$ mRNA in the striatum of both male and female rats, while stress caused by forced swimming decreased only the expression of $\gamma 2$. Also, the expression of the $\gamma 2$ and $\alpha 1$ subunits modified in according to the nature of the stressor. Chronic progesterone treatment increased both, $\gamma 2$ and $\alpha 1$ subunits, depending on the brain hemisphere, the level of stress, and the gender. A positive correlation between depression-like behavior in male rats treated with progesterone and the expression of the $\gamma 2$ subunit in the right hemisphere was noted. Our findings suggest that the $\gamma 2$ subunit of GABA_AR can play an important role in the regulation of depressive behavior under certain stress conditions.

Section: Cellular and Molecular Biology of Nervous Systems

Keywords: GABA_A, striatum, gender, asymmetry, progesterone and stress.

1. Introduction

γ-Aminobutyric acid (GABA) is the main inhibitory neurotransmitter in the mammalian central nervous system. GABA_A receptors (GABA_AR) are heteropentamers consisting of a combination of subunits. The most prevalent combination of GABA_AR subunits in the mammalian brain is made up of 2α1, 2β2 and 1γ2 subunits arranged around the central pore (Baur et al., 2006; Minier and Sigel, 2004). The specific GABA_AR subunit combinations dictate the different developmental expression patterns, as well as the physiological and pharmacological properties of the neuron (Mody 2008; Hevers and Luddens, 1998). GABA_AR subunits are also confined to specific compartments of a given cell. The alpha-subunit content of the receptor is particularly important in determining its pharmacological characteristics. The GABA_A receptor α1 subunit is the most abundant subunit in the adult human brain (Kralic et al., 2002). The γ2 containing-GABA_ARs are also widely distributed throughout the brain (Pirker et al., 2000) and, like the α subunit, are localized synaptically, mediating the “synaptic” or ‘phasic” form of GABAergic inhibition (Farrant and Nusser, 2005).

Earlier studies have reported alterations in GABA_A receptor subunit levels in specific brain regions in response to acute or repeated stress (Martijena et al., 2002; Gruen et al., 1995). In fact, the protein and mRNA of GABA_AR(α1) were affected in the hippocampus and prefrontal cortex by acute restraint stress (Zheng et al., 2007). In addition, other data suggest a significant role for GABA_AR subunits in the modulation of emotional behavior and mood (Nin et al., 2008; Amin et al., 2006; Epperson et al., 2006; Brambilla et al., 2003; Tunnick and Malatynska, 2003). For example, a transcript of the α1 subunit is underexpressed in the brain of suicide/major depressive disorder subjects (Merali et al., 2004).

Some authors have reported modifications in GABA_AR subunits in the estrous cycle or pos-partum in female rodents (Byrnes et al., 2007; Griffiths and Lovick, 2005). In the diestrous phase a hormonal reduction occurs, which is probably related to the higher predisposition to depressive behavior of female rats than male rats (Andrade et al., 2010)

Progesterone is an ovarian steroid which acts upon the central nervous system. In addition, this neuroactive steroid can be synthesized *de novo* from the cholesterol in the rodent's brain, thus characterizing it as a neurosteroid (Compagnone and Mellon, 2000; Baulieu et al., 1998; Robel et al., 1995). Administration of low doses of progesterone alter the depressive behavior so dependent on gender in rats (Andrade et al., 2010; Saavedra, 2006; Frye et al., 2004).

Cerebral asymmetry has been described in humans (Galaburda, 1978) and the concept of cortical lateralization is well-established, but lateralization of subcortical structures is less clear. The predominance of the left striatal pathway related to non-motor function was described in a recent study (Capper-Loup and Kaelin-Lang, 2008). The striatum is the main input structure of the basal ganglia (Alexander and Crutcher, 1990). The role of the basal ganglia in emotion and motivation is not as well-defined as their role in the motor and cognitive functions. Alterations in striatal volume have been observed in some mood disorders, such as major depressive disorder (MDD) (Forbes et al., 2009; Starkman et al., 2007; Parashos et al., 1998; Aylward et al., 1994). These results are not yet conclusive, since other researchers have not found any structural or functional changes in depressive patients (Hajek et al., 2009; Campbell and MacQueen, 2006). In addition, left-hemisphere functional predominance has been noted in the GABAergic system in the striatum of rodents (Guarneri et al., 1988).

As both the striatum and the GABAergic system are involved in mood disorders, the aim of this study was to examine the effects of progesterone on the expression of GABA_A α 1 and γ 2 receptor mRNA subunits in both the right and left striatum of female and male rats under stress conditions.

2. Results

Initially, we sought to determine the expression of the $\alpha 1$ and $\gamma 2$ subunits of the female rats during the diestrous phase and of the male rats without progesterone administration or a stressor procedure. We then verified how different stressor regimens (injections, and injections plus forced swimming) and low doses of chronic progesterone treatment alter the $\gamma 2$ and $\alpha 1$ GABA_AR subunit expression.

2.1 Striatal lateralization and gender differences in the control rats

In the control animals, the analysis of the differences in gender and asymmetry in the expression of the subunits $\gamma 2$ and $\alpha 1$ in the striatum revealed that the expression of the $\gamma 2$ mRNA in the right striatum of the female rats was greater than in the right striatum of the males (ANOVA $F_{(4,31)} = 2.972$ $P = 0,03$) (Fig. 1A). In the case of the males only, we observed that the expression of the $\gamma 2$ subunit was greater in the left striatum in comparison to the right (ANOVA $F_{(5,37)} = 3.156$ $P = 0,01$) (Fig. 1A). However, there was no difference in the expression of the $\alpha 1$ subunit between the male and female rats, or between the cerebral hemispheres (Fig 1B).

2.2 Striatal lateralization and gender differences in rats submitted to stress

When the expression of the $\gamma 2$ subunit was compared to different stressors, we observed an interaction between stress and gender. The male rats stressed by injections plus forced swimming test had a lower expression of the $\gamma 2$ subunit than the females (ANOVA $F_{(5,37)} = 19.172$ $P < 0,001$). The stress undergone by the animals reduced the expression of the $\gamma 2$ subunit asymmetrically and related to the gender. The stressors, regardless of the type administered, reduced the expression of $\gamma 2$ subunit in the left striatum of the male rats, and bilaterally in the female rats in comparison to the control groups (ANOVA $F_{(5,37)} = 3.156$ $P = 0,02$) (Fig. 2A). Furthermore, the expression of $\gamma 2$ subunit in the left striatum of the female rats who received injections and were submitted to the forced swimming test was greater than in those which

received only injections but were not forced to swim (ANOVA $F_{(5,37)} = 3.156$ $P = 0,02$) (Fig. 2A).

Thus the stress caused by the forced swimming test partly reversed the reduction of γ_2 subunit caused by receiving the injections.

The expression of the α_1 subunit was altered by the stress-inducing procedure of receiving injections depending on the gender of the rats: the males which received only injections displayed a lower expression of the α_1 subunit than the females, irrespective of hemisphere (ANOVA $F_{(3,17)} = 3.398$ $P = 0,04$) (Fig. 2B). Moreover, in the males the stress of receiving injections reduced the expression of the α_1 subunit in comparison to the control animals, and the forced swimming significantly reversed this reduction to the level of the control animals (Fig 2B). In addition, the expression of the subunit α_1 was lower in the left than in the right striatum in the male and female rats which were submitted to the stress of the injections (ANOVA $F_{(1,9)} = 44.636$ $P < 0,001$).

2.3 Striatal lateralization and gender differences in rats submitted to stress and treated with progesterone

The effect of chronic treatment with low doses of progesterone was verified in two protocols: the animals which received only the progesterone treatment and those which were also subjected to the forced swimming test. The chronic progesterone treatment increased the expression of the γ_2 subunit in the left striatum of the male rats, and bilaterally in the female rats, in relation to those which had received injections of the vehicle only (ANOVA $F_{(3,23)} = 5.354$ $P = 0,006$) (Fig. 3A).

In the case of the animals which were subjected to the forced swimming test, there was an interaction between gender, treatment and hemisphere in the expression of γ_2 subunit:

Progesterone increased γ_2 subunit in the right and left striatum of the male rats subjected to the forced swimming test in relation to those others which were part of the same protocol, but which received only the vehicle. The expression of γ_2 subunit in the females which were subjected to the forced swimming test remained unaltered (ANOVA $F_{(3,24)} = 10.379$ $P < 0,001$) (Fig. 3A).

As regards the $\alpha 1$ subunit, the progesterone treatment increased its expression only in the male rats which were not subjected to the forced swimming test (ANOVA $F_{(1,9)} = 14.763$ $P = 0,004$) (Fig 3B), and in these animals the expression of $\alpha 1$ subunit in the left striatum was lower than in the right striatum (ANOVA $F_{(1,9)} = 44.636$ $P < 0,001$) (Fig. 3B). However, in the male rats which received the progesterone treatment and were subjected to the forced swimming test, the expression of the $\alpha 1$ subunit of the left striatum was, surprisingly, greater than in that of the right striatum (ANOVA $F_{(7,50)} = 3.545$ $P = 0,004$) (Fig 3B). There was no significant difference in the expression of the $\alpha 1$ subunit following chronic progesterone treatment in the female rats.

3. Discussion

This investigation demonstrated for the first time the gender modulation and asymmetric dependence of the $\alpha 1$ and $\gamma 2$ subunits on the GABA_A receptors expression in the striatum following exposure to stressors. This is particularly important as the striatum is believed to constitute an input station of the basal ganglia involved in behavioral responses which are related to reward-association learning and anhedonia (Di Filippo et al., 2009; Steele et al., 2007).

The neurotransmitter GABA, acting through the GABA_A receptors, mediates the majority of “fast” inhibitory synaptic signaling in the mammalian central nervous system and consequently has a profound influence on our mood and behavior (Amin et al., 2006; Brambilla et al., 2003). Women present a higher risk of depression than men (Rouillon, 2008; Gorman, 2006). Sexual hormones, such as progesterone, may be partly responsible for this difference. Progesterone alters neuronal excitability through its metabolite allopregnanolone, a potent agonist of the GABA_AR (Harrison et al., 1987; Majewska et al., 1986). In our analysis, we showed that the $\gamma 2$ subunit expression of the GABA_AR is greater in the striatum of female than of male rats, thus demonstrating a gender-specific expression for this GABA_AR subunit.

This study also showed that the expression of the $\gamma 2$ subunit displayed a gender-specific asymmetry in the striatum of rats. The male rats showed a greater expression of the $\gamma 2$ subunit in the left than in the right striatum. This asymmetry did not occur in the female rats. Cerebral

asymmetry has been described in humans in a number of previous studies, with prevalent lateralization of the left hemisphere functions in healthy humans, as well as in responders to antidepressant treatment (Spronk et al., 2008; Accorrtt and Allen, 2006; Galaburda, 1978). In addition, prevalent lateralization of the GABAergic system has been noted in the striatum of rats for the left hemisphere (Capper-Loup and Kaelin-Lang 2008; Guarneri et al., 1988). The left hemisphere is responsible for the goal-oriented behavior that includes search activity (Chiesa et al., 2006). Search activity is designed to change the situation or the attitude of subjects to their most adaptive form of behavior in stressful conditions (Rotenberg, 2008). Renunciation of search activity is believed to be a maladaptive condition and manifests itself in giving up and helplessness. Both behaviors are considered as etiological factors in explaining the onset and maintenance of depression (Henkel et al., 2002) and correspond to the most important factors that characterize major depression (McGlinchey et al., 2006). In accordance with these observations, the $\gamma 2$ asymmetry displayed in the male rats replicates the physiological asymmetry demonstrated in healthy humans, and may characterize a lower risk of depression. In fact, our previous results showed that male rats had less depressive-like behavior than females in the forced swimming test, which is an animal model of depression (Andrade et al., 2010). Thus the absence of asymmetry in the expression of $\gamma 2$ in the striatum of female subjects may be an additional explanation for depression as a predominantly female disorder.

This study also demonstrated hemispheric and gender specificity in the expression of the $\gamma 2$ subunit in response to stress. Injections plus being subjected to the forced swimming test decreased the $\gamma 2$ subunit expression in both hemispheres in female rats, but only in the left striatum in stressed male rats compared with non-stressed male rats. These results are in accordance with findings that showed a gender-specific lateralization in response to stressors in the striatum with respect to serotonin metabolism following the selective attention test (Molodtsova, 2001). In the male rats, the serotonergic metabolism changed bilaterally, while in the female rats it changed only in the left hemisphere.

The stressor procedures were associated with changes in the expression of the $\gamma 2$ and $\alpha 1$ subunits of GABA_AR, according to the nature of the stressor and gender of the rats tested. The stress caused by injections decreased the expression of $\alpha 1$ mRNA, and its expression returned to control values after the forced swimming test only in the male rats. The expression of $\alpha 1$ subunit was not altered by stress in the females. Previous findings showed a decreasing in the $\alpha 1$ subunit of the GABA_AR in other structures such as cortex and hippocampus of rats after stress (Zheng et al, 2007; Orchinik et al, 1995). The stress caused by injections also diminished the expression of the $\gamma 2$ subunit in both, female and male rats, and the stress caused by the forced swimming test partly reversed this reduction only in the female rats. It is likely that factors like unpredictability or uncontrollability of stress may mediate the reversion of the expression of $\alpha 1$ and $\gamma 2$ subunits here observed. It was demonstrated that a prior experience with a controllable stressor blocks the typical behavioral consequences of later unpredictable stressors (Radley et al., 2009; Amat et al, 2008). This “desensitization” is proposed to be mediated by GABAergic inhibition of the prefrontal cortex on the neuroendocrine response to stress (Radley et al., 2009; Amat et al, 2008). The predictive stress may restore the inhibitory effect of the GABAergic system on the hypothalamic-pituitary-adrenal axis in rats (Radley et al., 2009; Amat et al, 2008; Andrade et al., 2007).

In addition, we demonstrated that exogenous progesterone was also able to recover the decreasing of the $\gamma 2$ and $\alpha 1$ expression caused by injections stress. The reduction of the $\gamma 2$ subunit in the left hemisphere in male rats and bilaterally in female rats was reversed by progesterone. In same way, progesterone increased bilaterally the expression of the $\alpha 1$ subunit in striatum of the male rats stressed by injections. Interestingly, when associated with stress caused by forced swimming test, progesterone has effect only in the groups that forced swim stress did not reverse the reduction of expression of the subunits to the values of the controls. Both, $\gamma 2$ and $\alpha 1$ subunits were increased by progesterone only in the male rats. By correlating the results of this study with data previously published by this research group (Andrade et al., 2010), we found a positive correlation between the depressive-like behaviors in the male rats

treated with progesterone, and the expression of the $\gamma 2$ subunit expression in the right hemisphere. However, there was no effect of the progesterone in the expression of the $\gamma 2$ subunit in the striatum of the females neither correlation between the expression of the $\gamma 2$ subunit in the striatum and the immobility behavior of female rats. As progesterone has some antidepressant activity, we cannot discard the possibility that, in the striatum of both males and females, other neurotransmitter systems in addition to GABA could be involved in the antidepressant effect of this neurosteroid (Andrade et al., 2010; Saeed and Bano, 2007).

In this study, no correlation was found between the expression of the $\alpha 1$ subunit and depressive-like behavior in rats. Indeed, it is unclear what role the $\alpha 1$ subunit expression plays in depression. Serretti et al. (1998), showed that the $\alpha 1$ mRNA subunit gene is not associated with depressive symptoms in unipolar and bipolar disorder. Other studies have shown that $\alpha 1$ mRNA was under-estimated in suicide/ major depressive disorder (Merali et al., 2004). Studies in female rats have demonstrated that progesterone alters the expression of the $\alpha 1$ subunit GABA_AR gene in a specific manner, according to the protocol and the brain region studied (Fénelon and Herbison, 2000; Weiland and Orchinik, 1995). Our results are in accordance with studies performed on pregnant rats, where the high levels of endogenous progesterone do not change the individual expression levels of the GABA_AR $\alpha 1$ subunit, but decrease the relative distribution of GABA_AR $\alpha 1,2$ subunits in different brain regions (Foley et al., 2003; Brussaard et al., 1999). It is possible that analysis involving subunits organization, rather than just differences in absolute levels, may contribute to clarify the GABA_A-related psychopathology although this does not exclude the possibility that relations involving specific subunits could be particularly relevant to psychological disturbances (Poulter et al., 2010).

Overall, our results provide evidence for a gender- and subunit-specific regulation of the GABA_AR expression profile within the striatum, following exposure to stress-inducing procedures and treatment with progesterone. The findings here presented suggest that, at least in part, the stress effects may be associated to change of the $\alpha 1$ subunit expression in the striatum of male rats and of $\gamma 2$ subunit in the female rats. Moreover, these data provide ground of suggesting that

progesterone plays a role in the regulation of depressive behavior according with gender and brain hemisphery associated with subunits GABA_AR expression in striatum.

4. Experimental Procedures

4.1 Animals

The experiments were conducted using adult female and male Wistar rats weighing 250-350g, housed in groups of four in polypropylene cages (40x33x17cm) under standard environmental conditions, i.e. room temperature of $22\pm 2^{\circ}\text{C}$, 12-hour light-dark cycles with lights on at 7:00 p.m, and free access to food and water. The animals were bred in the experimental animal facility of the Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre – Brazil (UFCSPA). All experimental procedures were carried out in accordance with the National Institute of Health Guide for the Care and Use of Laboratory Animals and with the Brazilian Law for the Scientific Use of Animals. The protocols were approved by the Ethics Committee for Experimental Procedures of UFCSPA, Porto Alegre, Brazil.

4.2 Drugs

Progesterone (4-Pregnene-3,20-dione, Sigma, St. Louis, MO, USA) was dispersed in 0.1% Tween 80 and then dissolved in saline solution. The control group received the same volume of the vehicle only. Both male and female rats received injections (i.p.) of the vehicle or of progesterone at 0.4 mg/kg dose of progesterone (i.p) daily for 8 to 10 days during two complete estrous cycles. These doses were chosen because of their behavioral effects, and because they do not alter the gonadal axis (Andrade et al., 2010).

4.3 Estrous cycle

The estrous cycle for all female rats was determined by daily vaginal smears performed for at least 14 days. Only females in the diestrus II phase showing two regular 4-5 day cycles were used in this experiment (Andrade et al., 2007). To determine whether chronic progesterone treatment would affect the estrous cycle of the female rats, vaginal smears were performed throughout the treatment period.

4.4 Stressor procedure

The analysis of GABA_A receptor subunit expression was performed in rats submitted to two stressor procedures: daily injections and forced swimming. Forced swimming is a behavioral test which was slightly modified (Ferigolo et al., 1998) from the original described by Porsolt (Porsolt, 1978). Immobility is a measure of the depressive-like behavior of the rats evaluated in this test. The rats underwent two tests during which they were forced to swim in an inescapable pool (22x22x35cm) filled with 27 cm of cool water (25°C). After each swimming test, the animals were returned to their cages. A behavioral analysis of the animals was performed, and the results were published (Andrade et al., 2010). Both male and female rats received doses of 0.4 mg/kg of progesterone, or of the vehicle only, on a daily basis. Thirty minutes after the end of the behavioral testing, all the rats, even those who had not been subjected to the forced swimming test, were euthanized by means of decapitation. The right and left striatum were rapidly removed, frozen in liquid nitrogen, and then placed in a freezer (-80° C) for subsequent analysis of GABA_A receptor subunit expression by RT-PCR.

4.5 RT-PCR (Reverse transcription polymerase chain reaction)

Total RNA was isolated using a Brazol Isolation Reagent Kit (LGC- Biotecnologia, São Paulo, Brazil) in accordance with the instructions of the manufacturer. The optical density ratios obtained (260/280 nm) of the RNA preparations were greater than 1.6. A 2µg aliquot of total RNA extracted from the striatum was reverse transcribed using the SuperScript™ First-Strand Synthesis System for RT-PCR (Invitrogen Life Technologies), in accordance with the instructions of the manufacturer. The cDNA obtained was PCR-amplified using specific primers derived from the coding region α 1 and γ 2 GABA_A subunits of *Rattus norvegicus*. The set of the specific α 1 subunit was from 5' to 3', sense TAACAGCGTCAGCAAATCG and antisense CAGGAATCACTGCGTTGAGA, which generates a 207 bp product. The set of the specific γ 2 subunit was from 5' to 3', sense CAGCACCATAGCCCGGAAG and antisense CTGTGCCCTCCTATGTGTAG, which generates a 354 bp product. The set of the γ 2 and α 1

GABAA subunit primers was determined in accordance with National Center for Biotechnology Information (γ 2-**NM_183327**; α 1- **29705**) from *Rattus norvegicus*. The RT-PCR reaction amplification was performed in a final volume of 50 μ L and contained 2 μ L of cDNA products (with an expected cDNA yield of 4 ng), 1 U *Taq* DNA polymerase (LGC-Biotecnologia, São Paulo, Brazil), 50 mM MgCl₂, 0.5-1 specific primer pairs and 0,2Mm dNTPs. γ 2 amplification was performed with an initial denaturation step at 94°C for 2 min followed by 38 cycles; each cycle at 94°C for 1 min, 57°C for 1min and 72°C for 1 min; with a final extension at 72°C for 5 min. The α 1 amplification was performed with an initial denaturation step at 94°C for 2 min followed by 38 cycles; each cycle at 94°C for 1 min, 55°C for 50 s and 72°C for 50 s, with a final extension at 72°C for 5 min. Of the final product of PCR, 10 μ L was separated by electrophoresis in 1.5% agarose gel containing ethidium bromide. The bands were quantified through densitometric analysis by means of an image-capturing system (ImageMaster VDS, Pharmacia Biotech, Uppsala, Sweden), and the result of normalization of the gene versus β -actin was used for statistical analysis.

4.6 Statistical Analysis

The statistical analysis of the control animals was performed using a two-way analysis of variance (ANOVA-two way) for two factors: group (sex/estrous cycle) and hemisphere (right or left). An ANOVA-three way test was performed to analyze groups which had received treatment and which had (or not) been submitted to the forced swimming test. The factors utilized were: treatment (progesterone or vehicle), group (sex/estrous cycle) and hemisphere (right or left). When appropriate, ANOVA was followed by the Student-Newman-Keuls *post hoc* test. All results were expressed as mean \pm standard deviation. In all the tests, the level of statistical significance was $P < 0.05$. A Pearson test was also performed to verify the possible correlations between the expression of the GABA_AR subunits and immobility behavior.

Acknowledgements

This work received support from the CNPq, CAPES and FAPERGS

Legends

Figure 1. Expression of the mRNA γ_2 (A) and α_1 (B) subunits of the GABAA receptor in the striatum of control Wistar rats. a= differ from right striatum; b= differ from females. $P < 0.05$ (ANOVA followed by SNK *pos hoc*).

Figure 2. Effect of different stressors on the mRNA γ_2 (A) and α_1 (B) subunits of the GABAA receptor in the striatum of Wistar rats. a= differ from right striatum; b= differ from female; c= differ from control; d=differ from injection; #= differ from swim group. $P < 0.05$ (ANOVA followed by SNK *pos hoc*).

Figure 3. Effect of chronic treatment with progesterone (0.4 mg/kg) in the γ_2 (A) and α_1 (B) mRNA subunits of the GABAA receptor in the striatum of Wistar rats submitted or not submitted to forced swim test. * Differ from vehicle rats in the same group; a= differ from right striatum. $P < 0.05$ (ANOVA followed by SNK *pos hoc*).

References

- Accortt, E.E., Allen, J.J., 2006. Frontal EEG asymmetry and premenstrual dysphoric symptomatology. *J Abnorm Psychol.* 115,179-184.
- Alexander, G.E., Crutcher, M.D., 1990. Functional architecture of basal ganglia circuits: neural substrates of parallel processing. *Trends Neurosci.* 13, 266–271.
- Amat, J., Paul, E., Watkins, L.R., Maier, S.F., 2008. Activation of the ventral medial prefrontal cortex during an uncontrollable stressor reproduces both the immediate and long-term protective effects of behavioral control. *Neuroscience* 154, 1178-1186.
- Amin, Z., Mason, G.F., Cavus, I., Krystal, J.H., Rothman, D.L., Epperson, C.N., 2006. The interaction of neuroactive steroids and GABA in the development of neuropsychiatric disorders in women. *Pharmacol Biochem Behav* 84,635-643.
- Andrade, S., Silveira, S.L., Arbo, B.D., Batista, B.A., Gomez, R., Barros, H.M., Ribeiro, M.F., 2010. Sex-dependent antidepressant effects of lower doses of progesterone in rats. *Physiol Behav.* 99,687-690.
- Andrade, S., Silveira, S.L., Gomez, R., Barros, H.M., Ribeiro, M.F., 2007. Gender differences of acute and chronic administration of dehydroepiandrosterone in rats submitted to the forced swimming test. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* 31,613-621.
- Aylward, E.H., Roberts-Twillie, J.V., Barta, P.E., Kumar, A.J., Harris, G.J., Geer, M., Peyser, C.E., Pearlson, G.D., 1994. Basal ganglia volumes and white matter hyperintensities in patients with bipolar disorder. *Am J Psychiatry.* 151,687-693.
- Baulieu, E.E., 1998. Neurosteroids: a novel function of the brain. *Psychoneuroendocrinology.* 23,963-987.
- Baur, R., Minier, F., Sigel, E., A., 2006. GABA(A) receptor of defined subunit composition and positioning: concatenation of five subunits. *FEBS Lett.* 580,1616-1620.

Brambilla, P., Perez, J., Barale, F., Schettini, G., Soares, J.C., 2003. GABAergic dysfunction in mood disorders. *Mol Psychiatry* 8,721-737.

Brody, A.L., Saxena, S., Stoessel, P., Gillies, L.A., Fairbanks, L.A., Alborzian, S., Phelps, M.E., Huang, S.C., Wu, H.M., Ho, M.L., Ho, M.K., Au, S.C., Maidmen, K., Baxter, L.R., Jr., 2001. Regional brain metabolic changes in patients with major depression treated with either paroxetine or interpersonal therapy: preliminary findings. *Arch Gen Psychiatry*. 58,631-640

Brussaard, A.B., Devay, P., Leyting-Vermeulen, J.L., Kits, K.S., 1999. Changes in properties and neurosteroid regulation of GABAergic synapses in the supraoptic nucleus during the mammalian female reproductive cycle. *J Physiol*. 15, 513-524.

Byrnes, E.M., Lee, J.O., Bridges, R.S., 2007. Alterations in GABA(A) receptor alpha2 subunit mRNA expression following reproductive experience in rats. *Neuroendocrinology*. 85, 148-156.

Campbell, S., MacQueen, G., 2006. An update on regional brain volume differences associated with mood disorders. *Curr Opin Psychiatry*. 19,25-33.

Capper-Loup, C., Kaelin-Lang, A., 2008. Lateralization of dynorphin gene expression in the rat striatum *Neurosci Lett*. 447,106-108.

Chiesa, A.D., Pecchia, T., Tommasi, L., Vallortigara, G., 2006. Multiple landmarks, the encoding of environmental geometry and the spatial logics of a dual brain. *Anim Cogn*. 9, 281-293.

Compagnone, N.A., Mellon, S.H., 2000. Neurosteroids: biosynthesis and function of these novel neuromodulators. *Front Neuroendocrinol*. 21,1-56.

Di Filippo M, Picconi B, Tantucci M, Ghiglieri V, Bagetta V, Sgobio C, Tozzi A, Parnetti L, Calabresi P. *Behav Brain Res*. 2009. Short-term and long-term plasticity at corticostriatal synapses: implications for learning and memory. 199, 108-118.

Epperson, C.N., Gueorguieva, R., Czarkowski, K.A., Stiklus, S., Sellers, E., Krystal, J.H., Rothman, D.L., Mason, G.F., 2006. Preliminary evidence of reduced occipital GABA concentrations in puerperal women: a 1H-MRS study. *Psychopharmacology*. 186,425-433.

Farrant, M., Nusser, Z., 2005. Variations on an inhibitory theme: phasic and tonic activation of GABA(A) receptors. *Nat Rev Neurosci*. 6,215-229.

Fénelon, V.S., Herbison, A.E., 2000. Progesterone regulation of GABA_A receptor plasticity in adult rat supraoptic nucleus. *Eur J Neurosci*. 12,1617-1623.

Ferigolo, M., Barros, H.M., Marquardt, A.R., Tannhauser, M., 1998. Comparison of behavioral effects of moclobemide and deprenyl during forced swimming. *Pharmacol Biochem Behav*. 60,431-437.

Foley, C.M., Stanton, J.J., Price, E.M., Cunningham, J.T., Hasser, E.M., Heesch, C.M., 2003. GABA(A) alpha1 and alpha2 receptor subunit expression in rostral ventrolateral medulla in nonpregnant and pregnant rats. *Brain Res*. 975,196-206.

Forbes, E.E., Hariri, A.R., Martin, S.L., Silk, J.S., Moyses, D.L., Fisher, P.M., Brown, S.M., Ryan, N.D., Birmaher, B., Axelson, D.A., Dahl, R.E., 2009. Altered striatal activation predicting real-world positive affect in adolescent major depressive disorder. *Am J Psychiatry*. 166,64-73.

Frye, C.A., Walf, A.A., Rhodes, M.E., Harney, J.P., 2004. Progesterone enhances motor, anxiolytic, analgesic, and antidepressive behavior of wild-type mice, but not those deficient in type 1 5 alpha-reductase. *Brain Res*. 1004,116-124.

Galaburda, A.M., Lemay, M., Kemper, T.L., Geschwind, N., 1978. Right-left asymmetries in the brain. *Science*. 199, 852-856.

Gorman, J.M., 2006. Gender differences in depression and response to psychotropic medication. *Gend Med*. 3,93-109.

Griffiths, J.L., Lovick, T.A., 2005. GABAergic neurones in the rat periaqueductal grey matter express alpha4, beta1 and delta GABAA receptor subunits: plasticity of expression during the estrous cycle. *Neuroscience*. 136,457-466.

Gruen, R.J., Wenberg, K., Elahi, R., Friedhoff, A.J., 1995. Alterations in GABAA receptor binding in the prefrontal cortex following exposure to chronic stress. *Brain Res*. 684,112-114.

Guarneri, P., Guarneri, R., La Bella, V., Scondotto, S., Scoppa, F., Piccoli, F., 1988. Lateral differences in GABA binding sites in rat brain. *Neurochem Res*. 13, 209-211.

Hajek, T., Gunde, E., Slaney, C., Propper, L., MacQueen, G., Duffy, A., Alda, M., 2009. Striatal volumes in affected and unaffected relatives of bipolar patients-high-risk study. *Psychiatr Res*. 43,724-729.

Harrison, N.L., Majewska, M.D., Harrington, J.W., Barker, J.L., 1987. Structure-activity relationships for steroid interaction with the gamma-aminobutyric acidA receptor complex. *J Pharmacol Exp Ther*. 241, 346-353.

Henkel, V., Bussfeld, P., Moller, H.J., Hegerl, U., 2002. Cognitive-behavioural theories of helplessness/hopelessness: valid models of depression? *Eur Arch Psychiatry Clin Neurosci*. 252,240-249.

Hevers, W., Lüddens, H., 1998. The diversity of GABAA receptors. Pharmacological and electrophysiological properties of GABAA channel subtypes. *Mol Neurobiol*. 18,35-86.

Kralic, J.E., Korpi, E.R., O'buckley, T.K., Homanics, G.E., Morrow, A.L., 2002. Molecular and pharmacological characterization of GABA(A) receptor alpha1 subunit knockout mice. *J Pharmacol Exp Ther*. 302,1037-1045.

Majewska, M.D., Harrison, N.L., Schwartz, R.D., Barker, J.L., Paul, S.M., 1986. Steroid hormone metabolites are barbiturate-like modulators of the GABA receptor. *Science*. 232,1004-1007.

Martijena, I.D., Rodríguez, Mandanares, P.A., Lacerra, C., Molina, V.A., 2002. Gabaergic modulation of the stress response in frontal cortex and amygdala Synapse. 45,86-94.

Mcglinchey, J.B., Zimmerman, M., Young, D., Chelminski, I., 2006. Diagnosing major depressive disorder VIII: are some symptoms better than others? J Nerv Ment Dis. 194,785-790.

Merali Z, D.U. L., Hrdina, P., Palkovits, M., Faludi, G., Poulter, M.O., Anisman, H., 2004. Dysregulation in the suicide brain: mRNA expression of corticotropin-releasing hormone receptors and GABA(A) receptor subunits in frontal cortical brain region. J Neurosci. 24,1478-1485.

Minier, F., and Sigel, E., 2004. Positioning of the alpha-subunit isoforms confers a functional signature to gamma-aminobutyric acid type A receptors. Proc Natl Acad Sci USA 101,7769–7774.

Mody, I., 2008. Extrasynaptic GABAA receptors in the crosshairs of hormones and ethanol. Neurochem Int. 52, 60-64.

Molodtsova, G.F., 2001. Effects of sex factors and hemispheric localization on the involvement of serotonin from the frontal cortex, striatum, and nucleus accumbens into the processing of novel and repeatedly presented information in rats. Zh Vyssh Nerv Deiat Im I P Pavlova. 51,56-60.

Nin, M.S., Salles, F.B., Azeredo, L.A., Frazon, A.P., Gomez, R., Barros, H.M., 2008. Antidepressant effect and changes of GABAA receptor gamma2 subunit mRNA after hippocampal administration of allopregnanolone in rats. J Psychopharmacol. 22,477-485.

Orchinik, M., Weiland, N.G., Mcewen, B.S., 1995. Chronic exposure to stress levels of corticosterone alters GABAA receptor subunit mRNA levels in rat hippocampus. Brain Res Mol Brain Res. 34, 29-37.

Parashos, I.A., Tupler, L.A., Blitchington, T., Krishnan, K.R.R., 1998. Magnetic- resonance morphometry in patients with major depression. Psychiatry Res.: Neuroimaging 84, 7–15.

Pirker, S., Schwarzer, C., Wieselthaler, A., Sieghart, W., Sperk, G., 2000. GABA(A) receptors: immunocytochemical distribution of 13 subunits in the adult rat brain. *Neuroscience*.101,815-850.

Porsolt, R.D., Anton, G., Blavet, N., Jalfre, M., 1978. Behavioural despair in rats: a new model sensitive to antidepressant treatments. *Eur J Pharmacol*. 47,379-391.

Poulter, M.O., DU, D., Zhurov, V., Merali, Z., Anisman, H., 2010. Plasticity of the GABAA receptor subunit cassette in response to stressors in reactive versus resilient mice. *Neuroscience*. 165,1039-1051.

Radley, J.J., Gosselink, K.L., Sawchenko, P.E., 2009. A discrete GABAergic relay mediates medial prefrontal cortical inhibition of the neuroendocrine stress response. *J Neurosci*. 29, 7330-7340.

Robel, P., Young, J., Corpéchet, C., Mayo, W., Perché, F., Haug, M., Simon, H., Baulieu, E.E., 1995. Biosynthesis and assay of neurosteroids in rats and mice: functional correlates. *J Steroid Biochem Mol Biol*. 53,355-360.

Rotenberg, V.S., 2008. Functional brain asymmetry as a determinative factor in the treatment of depression: theoretical implications. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*. 32,1772-1777.

Rouillon, F., 2008. Epidemiology of mood disorders. *Rev Prat*. 58,361-365.

Saavedra, M., Contreras, C.M., Azamar-Arizmendi, G., Hernández-Lozano, M., 2006. Differential progesterone effects on defensive burying and forced swimming tests depending upon a gradual decrease or an abrupt suppression schedules. *Pharmacol Biochem Behav*. 83,130-135.

Saeed, S., Bano, S., 2007. Inhibition of tryptophan pyrrolase activity in restraint female rats following medroxyprogesterone administration. *J Coll Physicians Surg Pak*. 17, 63-68.

Serretti, A., Macciardi, F., Cusin, C., Lattuada, E., Lilli, R., Di Bella, D., Catalano, M., Smeraldi, E., 1998. GABAA alpha-1 subunit gene not associated with depressive symptomatology in mood disorders. *Psychiatr Genet*. 8,251-254.

Spronk, D., Arns, M., Bootsma, A., van, Ruth, R., Fitzgerald, P.B., 2008. Long-term effects of left frontal rTMS on EEG and ERPs in patients with depression. *Clin EEG Neurosci.* 39,118-124.

Starkman, M.N., Giordani, B., Gebarski, S.S., Schteingart, D.E., 2007. Improvement in mood and ideation associated with increase in right caudate volume. *J Affect Disord.* 101,139-147.

Steele, J.D., Kumar, P., Ebmeier, K.P., 2007. Blunted response to feedback information in depressive illness. *Brain.* 130,2367-2374.

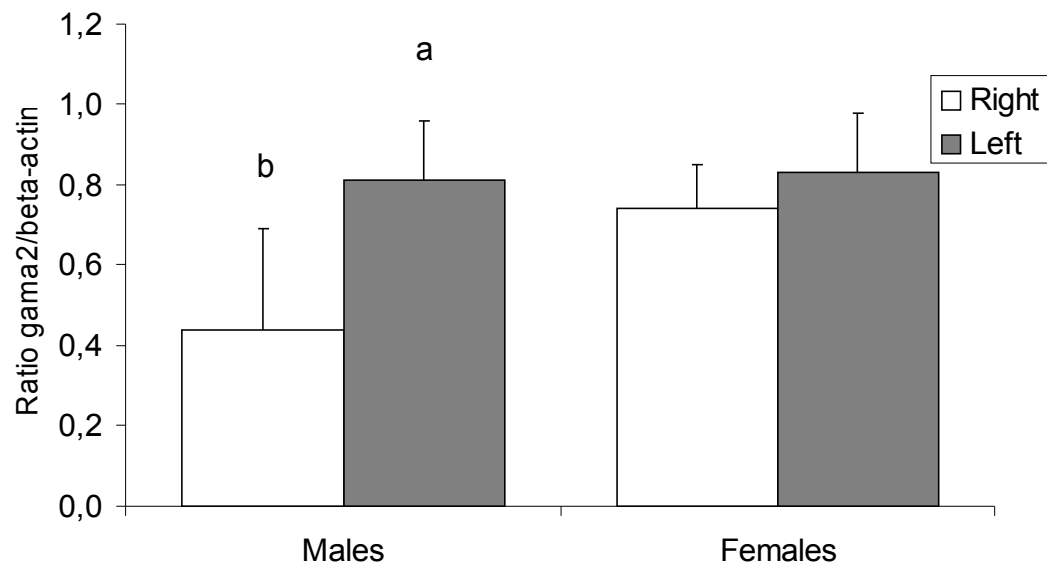
Tunnicliff, G., Malatynska, E., 2003. Central GABAergic systems and depressive illness. *Neurochem Res.* 28,965-976.

Weiland, N.G., Orchinik, M., 1995. Specific subunit mRNAs of the GABAA receptor are regulated by progesterone in subfields of the hippocampus. *Brain Res Mol Brain Res.* 32,271-278

Zheng, G., Zhang, X., Chen, Y., Zhang, Y., Luo, W., Chen, J., 2007. Evidence for a role of GABAA receptor in the acute restraint stress-induced enhancement of spatial memory. *Brain Res.* 1181,61-73.

Figure 1

A



B

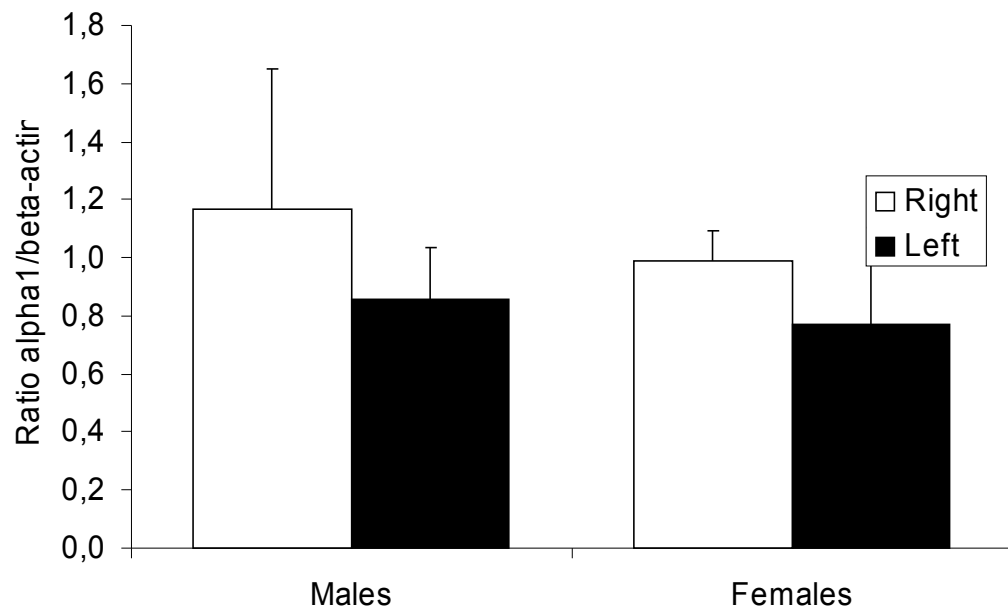
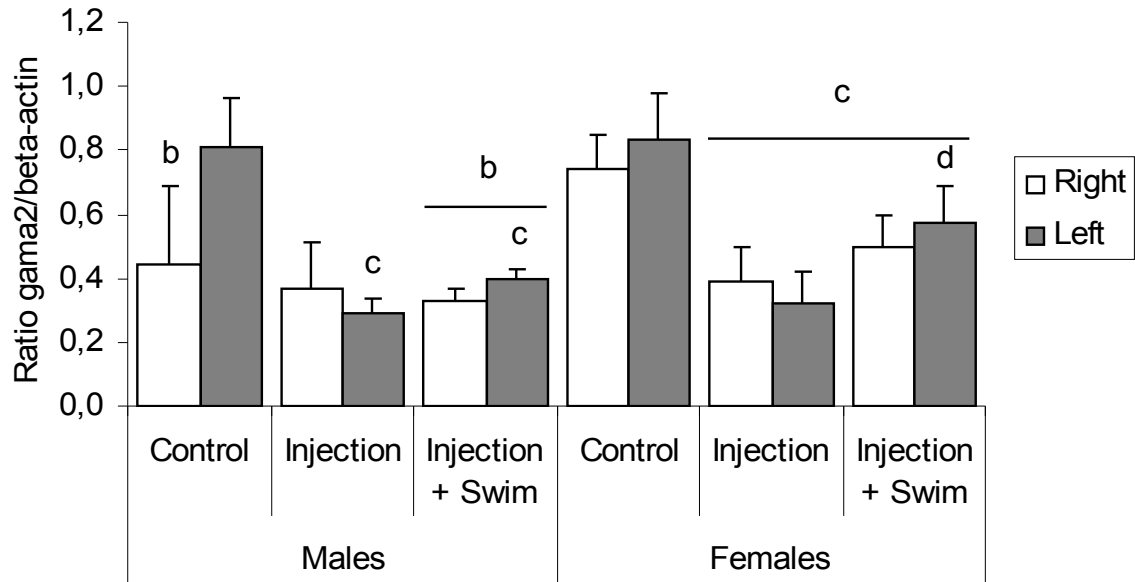


Figure 2

A



B

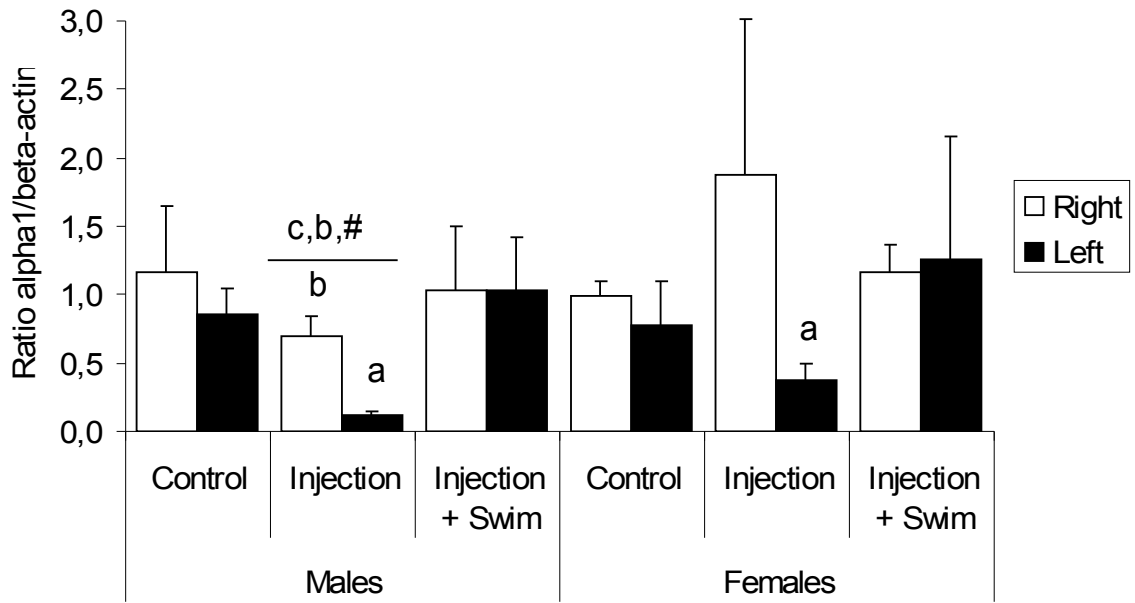
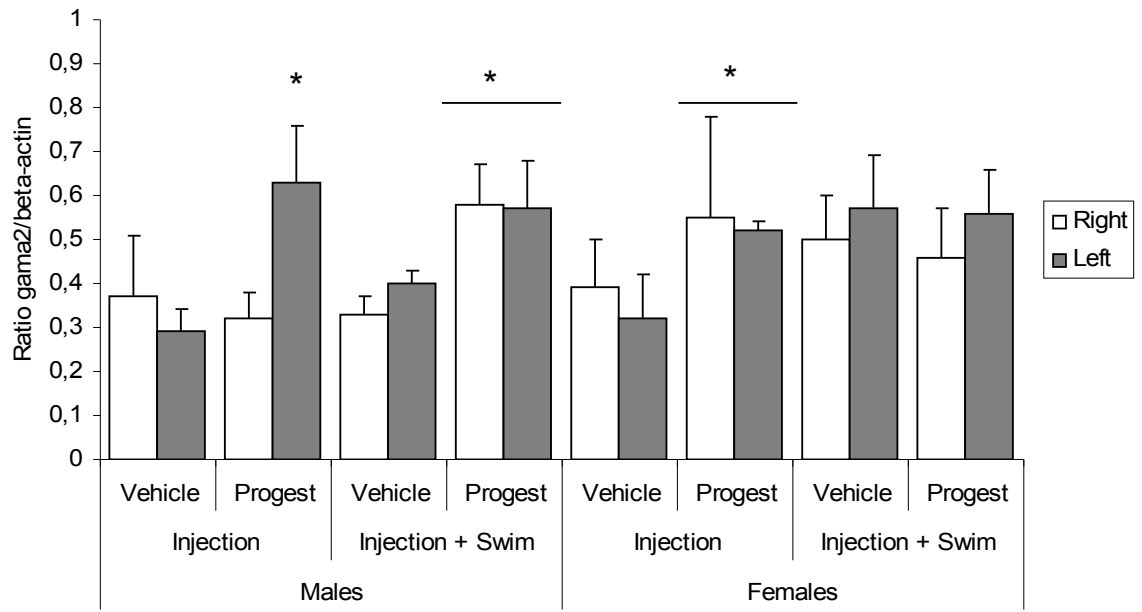
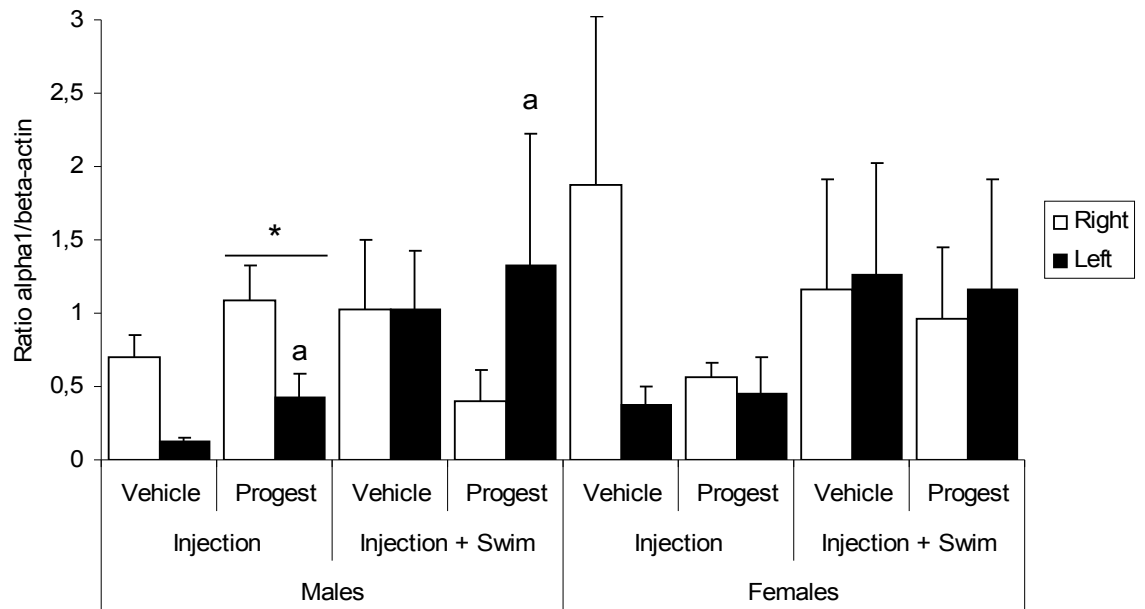


Figure 3

A



B



Artigo 3

Título: Expression of GABA_AR subunits in the prefrontal cortex in rats: effect of progesterone and implications of gender, brain hemisphere and stress

Status: Artigo submetido (Brain Research)

Objetivo: Verificar a expressão do mRNA e da proteína das subunidades alfa1 e gama2 do receptor GABA_A no córtex pré-frontal direito e esquerdo de ratos Wistar submetidos ou não a diferentes estressores e ao tratamento crônico com progesterona.

Conclusão: A expressão das subunidades α 1 e γ 2 no córtex pré-frontal é específica ao gênero, sofrendo interação com o estresse e com o hemisfério cerebral. Estes fatores interferem, conjuntamente, na alteração destas subunidades em resposta ao tratamento com progesterona. O efeito antidepressivo da progesterona nas fêmeas está correlacionado com a maior expressão da subunidade α 1 no córtex pré-frontal direito destes animais. Progesterona e o nado forçado podem alterar diferencialmente o mRNA e a proteína das subunidades α 1 e γ 2 do receptor GABA_A indicando a existência de possíveis mecanismos de modificação pós-transcricional no córtex pré-frontal.

EXPRESSION OF GABA_AR SUBUNITS IN THE PREFRONTAL CORTEX IN
RATS: EFFECT OF PROGESTERONE AND IMPLICATIONS OF GENDER, BRAIN
HEMISPHERE AND STRESS

Authors:

Andrade, S. ^a, Arbo, B.D. ^b, Batista, B.A.M. ^a, Neves, M.A. ^a, Branchini, G.,
Gomez, R. ^b, Brum, I. ^a, H.M.T. Barros ^b, M.F.M. Ribeiro ^a

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

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

Corresponding author.

Maria Flávia Marques Ribeiro

Department of Physiology, ICBS, Universidade Federal do Rio Grande do
Sul, Sarmiento Leite, 500, Porto Alegre, RS, 90050-170,

Brazil. Tel.: + 55 51 3308 3500; fax: +55 51 3308 3656.

E-mail address: mflavia@ufrgs.br

ABSTRACT

Prefrontal cortex is a nodal point of a limbic circuit involved in the control of stress situations. Studies have shown a sex-related functional asymmetry in this region mediating adaptive coping responses to stress and emotional processing in humans. Progesterone has been implicated in behavioral changes in rodents and is associated with GABA_AR activity modulation. We evaluated the GABA_A α 1 and γ 2 receptor subunit mRNA and protein expression in the right and left prefrontal cortex of Wistar rats under different stress conditions and progesterone treatment. The expression of α 1 and γ 2 mRNA subunits are gender-specific in the control and stressed rats. It occurred a hemispheric specificity in the expression of the α 1 and γ 2 subunits in response to injections stress as well as to progesterone treatment differentially regulated by gender. The mRNA and protein expression analysis demonstrated that progesterone plus forced swimming increased bilaterally the expression of α 1 mRNA, but the protein expression was increased only in the right hemisphere. Moreover, progesterone did not modify the γ 2 mRNA but it increased its protein expression, indicating the existence of possible post-transcriptional modifications. Also, there was a negative correlation between the mRNA and protein expression of α 1 subunit in the right prefrontal cortex and the immobility behavior in female rats. Thus, progesterone may improve the depressive behavior of females restoring the efficiency of system GABA_A of right prefrontal cortex.

Section: Cellular and Molecular Biology of Nervous System

Keywords: GABA_A, prefrontal cortex, gender, asymmetry, progesterone and stress.

1. Introduction

The γ -aminobutyric acid (GABA) is the main inhibitory neurotransmitter in the mammalian nervous system and its receptor is composed by a combination of five subunits. Accumulating data suggest a role of GABA_AR subunits in the modulation of emotional behavior and mood (Nin et al., 2008; Amin et al., 2006; Epperson et al., 2006; Tunnicliff and Malatynska, 2003; Brambilla et al., 2003). The most prevalent combination is 2 α 1, 2 β 2 and 1 γ 2 subunits (Baur et al., 2006; Minier and Sigel, 2004) and the α 1 subunit is highly expressed in the brain (Kralic et al., 2002). The γ 2 subunit is also widely distributed throughout the brain, and like the α 1 subunit, it is localized in the synaptic cleft, mediating the “synaptic” or ‘phasic’ form of GABAergic inhibition (Farrant and Nusser, 2005). Contradictory findings have associated depressive behaviors and changes in the α 1 subunit (Merali et al., 2004; Serretti et al., 1998).

Studies also showed alterations in GABA_AR subunit levels in specific brain regions in response to stress (Gruen et al., 1995; Martijena et al., 2002). Prefrontal cortex is a nodal point of the limbic forebrain circuit that modulates stress-related homeostatic mechanisms (Amat et al., 2005). Some findings evidence a hemispheric specialization in this region mediating adaptive coping responses to stress (Stevenson et al., 2008). Additionally, studies have shown that structural and functional abnormalities in this brain area are associated with symptoms of depression (Akiyama et al., 2008; Jaracz, 2008; Levy-Cooperman et al., 2008). Moreover, It has been reported a sex-related functional asymmetry of the prefrontal cortex as to emotional processing in humans (Tranel et al., 2005).

Gonadal hormones, such as progesterone, can alter the expression and function of the GABA_AR system, because its metabolite, allopregnanolone, is the most potent positive endogenous modulator of this receptor (Harrison et al., 1987; Majewska et al., 1986). The ability of allopregnanolone to positively modulate GABA receptor function is related to the GABA_A subunit composition in the anion channel. Studies with pregnant rats, as well as *in vitro* studies, showed changes in the α 1 and γ 2 subunits of the GABA_AR in the cerebral cortex of rats related with the brain levels of progesterone and allopregnanolone (Follesa et al., 2000; Concas et al., 1999). Allopregnenolone and other neuroactive steroids have been implicated in the modulation of GABA_AR activity and they are associated with behavioral changes in animals (Nim et al., 2008; Eser et al., 2006; Tunnicliff e Malatynska, 2003; Brambilla et al., 2003). Furthermore, the administration of low doses of progesterone alters depressive gender-dependent behavior in rats (Andrade et al., 2010; Saavedra, 2006, Frye et al., 2004).

Given the important role of the prefrontal cortex in the emotional processing, including hedonia, social conduct and behavioral planning (Asplund et al, 2010; Gorwood, 2008; Tranel et al., 2002), we evaluated the GABA_A α 1 and γ 2 receptor subunit mRNA and protein expression in both, the right and left prefrontal cortex of female and male rats under different stressful conditions and under progesterone treatment.

2. Results

The $\alpha 1$ expression subunit was lower in control females than in male rats (ANOVA, $F_{(1,15)} = 11.533$; $P = 0,004$) and daily injections also presented a gender effect, decreasing it in the right hemisphere of female rats in relation to male rats (ANOVA, $F_{(9,70)} = 8.365$; $P < 0,001$). However, male and female responded in the same way during the swimming stress (Fig 1A).

The stress caused by injections increased the expression of $\alpha 1$ subunit in the right prefrontal cortex in the male and female rats (ANOVA, $F_{(9,70)} = 8.365$; $P < 0,001$) (Fig 1A). Therefore, the expression of $\alpha 1$ subunit was greater in the right prefrontal cortex in comparison to the left (ANOVA, $F_{(9,70)} = 8.365$; $P < 0,001$) (Fig 1A). In addition, in the male rats, the additional stress caused by the forced swimming test reversed the increase of $\alpha 1$ subunit caused by injections in the right hemisphere to the level of the control animals (ANOVA, $F_{(9,70)} = 8.365$; $P < 0,001$) (Fig 1A). Also, in the females stressed by forced swimming test, the expression of $\alpha 1$ subunit is lower in the right hemisphere in respect to control rats (ANOVA, $F_{(9,70)} = 8.365$; $P < 0,001$) (Fig 1A). There was no difference in the expression of the $\alpha 1$ mRNA between the cerebral hemispheres (Fig 1A). The protein expression of $\alpha 1$ subunit was also greater in the right hemisphere than in the left one in the females submitted to the forced swimming test (ANOVA, $F_{(3,11)} = 17.341$; $P = 0,002$) (Fig 3A).

There was no significant difference in the expression of the $\gamma 2$ subunit between the cerebral hemispheres in the prefrontal cortex of control animals. However, in the males stressed by forced swimming test, the expression of $\gamma 2$

subunit was greater in the left hemisphere than in the right (ANOVA, $F_{(3,25)} = 5.894$; $P = 0,003$) (Fig 1A). The expression of both, protein and mRNA of γ_2 subunit in the females submitted to the forced swimming test remained unaltered.

The stressors, regardless of the type administered, reduced bilaterally the expression of γ_2 subunit in the prefrontal cortex of the male and female rats (ANOVA, $F_{(9,61)} = 32.094$; $P < 0,001$). In addition, the expression of the stressed females was lower than male rats (ANOVA, $F_{(9,61)} = 32.094$; $P < 0,001$) (Fig 1A).

The chronic progesterone treatment increased the expression of the α_1 mRNA in the left prefrontal cortex, and decreased in the right hemisphere of male rats (ANOVA, $F_{(3,28)} = 16.357$; $P < 0,001$) reversing the asymmetry caused by stress (Fig. 2A). There was no significant difference in the expression of the α_1 subunit following chronic progesterone treatment in the female rats. In the case of the animals submitted to the forced swimming test, progesterone increased the expression of α_1 subunit of the male and female rats (ANOVA, $F_{(3,27)} = 7.737$; $P < 0,001$) (Fig 2A). However, in the females, the protein expression was increased only in the right prefrontal cortex (ANOVA, $F_{(3,11)} = 17.341$; $P = 0,002$) (Fig 3A). There was a positive correlation between the mRNA and the protein expression of the α_1 subunit in the prefrontal cortex of the female rats ($r = 0,743$; $P = 0,01$). Also, we found a negative correlation between the mRNA ($r = -0,823$; $P = 0,04$) and protein ($r = -0,954$; $P = 0,0008$) expression of α_1 subunit in the right prefrontal cortex and the immobility behavior in the female rats.

As to γ_2 subunit, chronic progesterone plus forced swimming test decreased the expression of γ_2 mRNA only in the left prefrontal cortex in the male rats. The γ_2

mRNA in the females remained unaltered (ANOVA, $F_{(3,14)} = 7,164$; $P = 0,02$) (Fig 2B), but, surprisingly, its proteic expression was increased bilaterally by progesterone (ANOVA, $F_{(3,13)} = 9,223$; $P = 0,01$) (Fig 3B). There was no correlation between the mRNA and the protein of $\gamma 2$ subunit and immobility behavior of the female or male rats submitted to the forced swimming test.

It was found a negative correlation between the mRNA of the $\alpha 1$ and $\gamma 2$ subunits in the male rats ($r = -0,835$; $P = 0,01$).

3. Discussion

This study showed that the expression of $\alpha 1$ and $\gamma 2$ mRNA subunits of the GABA_A receptor in the prefrontal cortex of rats is gender-specific. These expressions are also dependent of the stress condition and brain hemisphere. In addition, progesterone affects these responses. While male rats showed a higher expression of the $\alpha 1$ subunit than female rats, female rats showed a higher expression in the prefrontal cortex of the $\gamma 2$ subunit than male rats. Previous results from our group also showed that $\gamma 2$ subunit expression was higher in the striatum of female rats (Andrade, et al., 2010, submitted). Although studies have shown that progesterone and its metabolite alter the $\alpha 1$ and $\gamma 2$ subunit expression of the GABA_AR in cerebral cortex, gender differences were not considered (Follesa et al., 2000; Concas et al., 1998).

Here, the expression of the $\alpha 1$ and $\gamma 2$ subunits in the prefrontal cortex of male and female rats did not show asymmetry. There are no other studies comparing the expression of the GABA_AR subunits between the right and left brain hemispheres.

But data obtained by other techniques such as binding found asymmetry in cortical brain areas, as well as higher GABA binding in the left hemisphere (Guarneri et al., 1988).

Our results demonstrated that uncontrollable stress of the forced swimming test reversed the increased expression of $\alpha 1$ mRNA of GABA_AR caused by previous stress of injections. This bimodal response did not occur with the $\gamma 2$ subunit expression, indicating that GABA_AR subunits might be differentially regulated in the prefrontal cortex of rats in accordance with the stress condition. Prefrontal cortex is a nodal point of a limbic circuit that is involved in the control of stress situations (Amat et al., 2008; Baratta et al., 2008; Amat et al., 2005). The degree of behavioral control an organism has over a stressor is a potent modulator of the stress impact (Baratta et al., 2008; Mayer et al., 2006). Uncontrollable stressors produce numerous outcomes which do not occur if the stressor is controllable. It was demonstrated that a prior experience with a controllable stressor has blocked the typical behavioral consequences of later uncontrollable stressor (Radley et al., 2009; Amat et al., 2008). This “desensitization” is supposed to be mediated by gabaergic inhibition in the prefrontal cortex (Radley et al., 2009; Amat et al., 2008).

In the present study, there was a hemispheric specificity in the expression of the $\alpha 1$ subunit in response to injections stress and progesterone treatment as well. Stressed rats by injections had increased expression of the $\alpha 1$ subunit in the right prefrontal cortex. Progesterone increased the expression of the $\alpha 1$ subunit in the male and female rats exposed to the swimming stress. Interestingly, there was a

negative correlation between depressive like-behavior in female rats treated with progesterone and, protein and mRNA expression of $\alpha 1$ subunit in the right hemisphere (Andrade et al., 2010). It was recently described that the core reason for depression is related to the inability of the right-hemisphere response to the demands of the polydimensional environment (Rotenberg, 2008). Thus, our results suggest that the increase of the expression of $\alpha 1$ subunit by progesterone may restore the right prefrontal cortex efficiency in females. Although progesterone presents some effect on the depressive-like behavior in male rats, there was no correlation between the $\alpha 1$ subunit expression in the prefrontal cortex and the immobility behavior of these animals. We do not discard the hypothesis that other neurotransmitters systems than GABA could be involved in the behavioral effect of this neurosteroid in the prefrontal cortex of male and female rats (Andrade et al., 2010; Saeed and Bano, 2007).

Progesterone decreased the $\gamma 2$ subunit expression only in the left prefrontal cortex of male rats, without altering the $\gamma 2$ mRNA of female rats. The very low level of expression of $\gamma 2$ mRNA in the prefrontal cortex showed by stressed female rats may be responsible for it . Other techniques may be required for a more accurate investigation of $\gamma 2$ subunit in the prefrontal cortex of the stressed female rats. Other authors showed a decrease of $\gamma 2$ mRNA and protein in the cortex and hippocampus associated with higher levels of progesterone in pregnant rats (Sanna et al., 2009; Concas et al., 1999). Here, we used a low dose of progesterone which does not alter the hypothalamus-pituitary-gonadal axis (Andrade et al., 2010). Previous results from our group showed that, in the hippocampus of male rats, allopregnenolone treatment

increases $\gamma 2$ subunit expression (Nim et al., 2008). Also, progesterone increased $\gamma 2$ subunit expression in the striatum of male and female rats (Andrade et al., 2010, submitted).

Analysing the mRNA and protein expression following progesterone treatment, we showed that progesterone plus swimming stress do not alter the $\gamma 2$ mRNA of GABA_AR in female rats but increase the $\gamma 2$ protein. On the other hand, progesterone increased bilaterally $\alpha 1$ mRNA expression in female rats, but its protein expression increased only in the right prefrontal cortex. These results suggest a post-transcriptional or a post-translational regulation over the $\alpha 1$ and $\gamma 2$ subunits of GABA_AR. Recent studies have shown a reversible post-translational modification, such as phosphorylation and ubiquitination of motifs within the intracellular domain of the $\gamma 2$ subunit of the GABA_AR (Arancibia-Cárcamo et al., 2009; Kittler et al., 2008). Thus, our findings reinforce the need to analyze both, mRNA and protein expression, to obtain a more complete understanding about the modulation of function of neurotransmitters receptors.

In conclusion, in the prefrontal cortex, the expression of $\alpha 1$ and $\gamma 2$ subunits GABA_AR is dependent of gender and stress conditions. Also, the modulation of depressive behavior by progesterone is associated with changes of $\alpha 1$ subunit expression in a manner dependent of gender and hemisphere. Finally, the mRNA and the protein of the GABA_AR subunits may be differentially altered, indicating the existence of possible post-transcriptional modifications.

4. Experimental Procedures

4.1 Animals

Experiments were conducted with adult female and male Wistar rats weighing 250-350 g, housed in groups of four in polypropylene cages (40x33x17cm) under standard environmental conditions, as follows, room temperature of $22\pm 2^{\circ}\text{C}$, 12 light-dark cycles with lights on at 7:00 p.m, and free access to food and water. The animals were bred and raised in the animal facility of Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre – Brazil (UFCSPA). Experimental procedures were carried out in accordance with the National Institute of Health Guide for the Care and Use of Laboratory Animals and in accordance with the Brazilian Law for the Scientific Use of Animals. Protocols were approved by the Ethics Committee for Experimental Procedures of UFCSPA, Porto Alegre, Brazil.

4.2 Drugs

Progesterone (4-Pregnene-3,20-dione, Sigma, St. Louis, MO, USA) was dispersed in 0.1% Tween 80 and then dissolved in saline solution. The control group only received an equal volume of vehicle. Male and female rats received injections (i.p.) of vehicle or progesterone at 0.4, mg/kg dose of progesterone (i.p) daily, for 8 to 10 days, during two complete estrous cycles. These doses were picked because they have behavioral effects, and do not alter the gonadal axis (Andrade et al., 2010).

4.3 Estrous cycle

The estrous cycle for all female rats was determined by daily vaginal smears for at least 14 days. Only females in diestrus II phase showing two regular 4-5 day cycles

were included in this experiment (Andrade et al., 2007). To determine whether chronic progesterone treatment would affect the estrous cycle of the female rats, vaginal smears were performed throughout the treatment period.

4.4 Stressor procedure

The analysis of GABAA receptor subunit expression was performed after two stressor procedures: daily injections and forced swimming. The forced swimming is a behavioral test slightly modified (Ferigolo et al., 1998) from the originally described by Porsolt et al., (1978). The immobility is a measure of the depressive-like behavior in rodents evaluated in this test, and, from this experiment, results were analyzed and published in Andrade et al, (2010). Briefly, the rats underwent two trials in which they were forced to swim in an inescapable pool (22x22x35cm) filled with 27 cm of cool water (25°C). After each swimming session, the animals returned to their cages. The behavioral analysis of these animals was performed and published (Andrade et al., 2010). Male and female rats received doses of 0.4 mg/kg of progesterone or vehicle daily. Thirty minutes after the end of the behavioral testing, animals which had swam or not, were euthanized by decapitation. The right and left prefrontal cortex were rapidly removed, frozen in liquid nitrogen and then kept in a freezer (-80° C) for posterior analysis of GABAA receptor subunit expression by RT-PCR.

4.5 RT-PCR (Reverse transcription polymerase chain reaction)

Total RNA was isolated using Brazol Isolation Reagent Kit (LGC- Biotecnologia, São Paulo, Brazil) according to the manufacturer's instruction . The optical density ratios

of the RNA preparations obtained (260/280 nm) were greater than 1.6. A 2µg aliquot of total RNA extracted from the prefrontal cortex was reverse transcribed by using the SuperScript™ First-Strand Synthesis System for RT-PCR (Invitrogen Life Technologies) according to the manufacturer's instructions. The cDNA obtained was PCR amplified using specific primers derived from the coding region $\alpha 1$ e $\gamma 2$ GABAA subunits from *Rattus norvegicus*. The following set of specific $\alpha 1$ subunit was from 5' to 3': sense TAACAGCGTCAGCAAATCG and antisense CAGGAATCACTGCGTTGAGA, generating a 207 bp product. The following set of specific $\gamma 2$ subunit was from 5' to 3': sense CAGCACCATAGCCCGGAAG and antisense CTGTGCCCTCCTATGTGTAG, generating a 354 bp product. The set $\gamma 2$ and $\alpha 1$ GABAA subunit primers were determined based on the National Center for Biotechnology Information ($\gamma 2$ -NM_183327; $\alpha 1$ - 29705) from *Rattus norvegicus*. The RT-PCR reaction amplification was performed in a final volume of 50µL containing 2 µL of cDNA products (with an expected cDNA yield of 4 ng), 1 U *Taq* DNA polymerase (LGC-Biotecnologia, São Paulo, Brazil), 50 mM MgCl₂, 0.5-1 specific primer pairs and 0,2Mm dNTPs. The $\gamma 2$ amplification was performed with an initial denaturation step at 94°C for 2 min followed by 40 cycles; each cycle at 94°C, for 1 min; 57°C, for 1min and 72°C, for 1 min; and final extension at 72°C, for 5 min. The $\alpha 1$ amplification was performed with an initial denaturation step at 94°C, for 2 min followed by 38 cycles; each cycle at 94°C, for 1 min; 55°C for 50 s and 72°C, for 50 s; and final extension at 72°C for 5 min. Following PCR, 10 µL were separated by electrophoresis in 1.5% agarose gel containing ethidium bromide. The bands were quantified by densitometric analysis through an image capturing system

(ImageMaster VDS, Pharmacia Biotech, Uppsala, Sweden), and the result of normalization of the gene versus β -actin was used for statistical analysis.

4.6 Western blotting

Proteins were precipitated from the phenol-ethanol supernatant obtained after precipitation of DNA with ethanol according to the instructions of the manufacturer (Brazol Isolation Reagent Kit -LGC- Biotecnologia, São Paulo, Brazil). The resulting preparation was analyzed for the presence of α 1 and γ 2 GABA_A subunits protein by Western blotting. Electrophoresis and protein transference were performed as described elsewhere. (Laemmli 1970; Jacob et al, 2008) The nitrocellulose membranes were processed for immunodetection using rabbit polyclonal antibodies for γ 2 GABA_A subunit (46 kDa) and α 1 GABA_A subunit (51 kDa) (ZIMED Laboratories). The bound primary antibodies were detected using goat anti-rabbit horseradish peroxidase-conjugate secondary antibody and the membranes were revealed by chemiluminescence. The autoradiographies generated were quantitatively analysed for the protein levels with an image densitometer (Imagemaster VDS CI, Amersham Biosciences). The molecular weights of the bands were determined by reference to a standard molecular weight marker (Rainbow full range, Amersham). The results from each membrane were normalized to the Ponceau values (5% in acetic acid) in accordance with Klein (1995). Samples from all experimental groups were processed in parallel to decrease interassay variations. Proteins were measured by the method of Bradford (1976).

4.7 Statistical Analysis

The statistical analysis of the control animals was performed using a two-way analysis of variance (ANOVA-two way) for two factors: group (sex/estrous cycle) and hemisphere (right or left). An ANOVA-three-way test was performed to analyze groups that received treatment and that were submitted to the forced swimming test or not. The factors used were: treatment (progesterone or vehicle), group (sex/estrous cycle) and hemisphere (right or left). When appropriate, ANOVA was followed by the Student-Newman-Keuls *post hoc* test. All results were expressed as mean \pm standard deviation. In all tests, the level of statistical significance was $P < 0.05$. Pearson test was run to evaluate the correlations between GABA_AR mRNA subunits, protein and immobility behavior.

Acknowledgements

This work received support from de CNPq, CAPES and FAPERGS.

Legends

Figure 1. Effect of different stressors on the mRNA $\alpha 1$ (A) and γ_2 (B) subunits of the GABA_A receptor in the prefrontal cortex of Wistar rats. Male and female rats were submitted to stress of chronic saline injections (*i.p.*) and were submitted or not to forced swim test. n= 3-6 per group. Results expressed as mean \pm SD. a= differ from right prefrontal cortex; b= differ from female; c= differ from control; d=differ from injection + Swim. P< 0.05 (ANOVA followed by SNK *post hoc*).

Figure 2. Effect of chronic treatment with progesterone (0.4 mg/kg, *i.p.*) in the $\alpha 1$ (A) and γ_2 (B) mRNA subunits of the GABA_A receptor in the prefrontal cortex of Wistar rats submitted or not submitted to forced swim test. n= 3-6 per group. Results expressed as mean \pm SD. * Differ from vehicle rats in the same group; a= differ from right prefrontal cortex P< 0.05 (ANOVA followed by SNK *post hoc*).

Figure 3. Effect of chronic treatment with progesterone (0.4 mg/kg, *i.p.*) in the $\alpha 1$ (A) and γ_2 (B) protein subunits of GABA_A receptor in pre-frontal cortex of females Wistar rats submitted or not to forced swim test. n= 3-6 per group. Results expressed as mean \pm SD. * Differ from vehicle rats in the same group; a= differ from right prefrontal cortex. P< 0.05 (ANOVA followed by SNK *post hoc*).

References

Akiyama H, Hashimoto H, Kawabe J, Higashiyama S, Kai T, Kataoka K, Shimada A, Inoue K, Shiomi S, Kiriike N. The relationship between depressive symptoms and prefrontal hypoperfusion demonstrated by eZIS in patients with DAT. *Neurosci Lett* 2008;441:328-31.

Amat J, Baratta MV, Paul E, Bland ST, Watkins LR, Maier SF. Medial prefrontal cortex determines how stressor controllability affects behavior and dorsal raphe nucleus. *Nat Neurosci* 2005;8:365-71.

Amat J, Paul E, Watkins LR, Maier SF. Activation of the ventral medial prefrontal cortex during an uncontrollable stressor reproduces both the immediate and long-term protective effects of behavioral control. *Neuroscience* 2008;154:1178-86.

Amin Z, Mason GF, Cavus I, Krystal JH, Rothman DL, Epperson CN. The interaction of neuroactive steroids and GABA in the development of neuropsychiatric disorders in women. *Pharmacol Biochem Behav* 2006;84:635-43.

Andrade S, Silveira SL, Arbo BD, Batista BA, Gomez R, Barros HM, Ribeiro MF. [Sex-dependent antidepressant effects of lower doses of progesterone in rats.](#) *Physiol Behav* 2010;99:687-90.

Andrade S, Silveira SL, Arbo BD, Batista BA, Gomez R, Barros HM, Ribeiro MF. Gender differences of acute and chronic administration of dehydroepiandrosterone in rats submitted to the forced swimming test. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* 2007;31:613-21.

Arancibia-Cárcamo IL, Yuen EY, Muir J, Lumb MJ, Michels G, Saliba RS, Smart TG, Yan Z, Kittler JT, Moss SJ. Ubiquitin-dependent lysosomal targeting of GABA(A) receptors regulates neuronal inhibition *Proc Natl Acad Sci U S A* 2009; 106:17552-57.

Asplund CL, Todd JJ, Snyder AP, Marois R. A central role for the lateral prefrontal cortex in goal-directed and stimulus-driven attention. *Nat Neurosci* 2010; Mar 7. [Epub ahead of print]

Baratta MV, Lucero TR, Amat J, Watkins LR, Maier SF. Role of the ventral medial prefrontal cortex in mediating behavioral control-induced reduction of later conditioned fear. *Learn Mem* 2008;15:84-7.

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

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

Brambilla P, Perez J, Barale F, Schettini G, Soares JC. GABAergic dysfunction in mood disorders. *Mol Psychiatry* 2003;8:721-37.

Concas A, Follesa P, Barbaccia ML, Purdy RH, Biggio G. Physiological modulation of GABA(A) receptor plasticity by progesterone metabolites. *Eur J Pharmacol* 1999;375:225-35.

Epperson CN, Gueorguieva R, Czarkowski KA, Stiklus S, Sellers E, Krystal JH, Rothman DL, Mason GF. Preliminary evidence of reduced occipital GABA concentrations in puerperal women: a 1H-MRS study. *Psychopharmacology (Berl)* 2006;186: 425-33.

Eser D, Schule C, Romeo E, Baghai TC, Di Michele F, Pasini A, Zwanzger P, Padberg F, Rupprecht R. Neuropsychopharmacological properties of neuroactive steroids in depression and anxiety disorders. *Psychopharmacology (Berl)* 2006;186: 373-87.

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

Ferigolo M, Barros HM, Marquardt AR, Tannhauser M. [Comparison of behavioral effects of moclobemide and deprenyl during forced swimming.](#) *Pharmacol Biochem Behav* 1998;60:431-37.

Follesa P, Serra M, Cagetti E, Pisu MG, Porta S, Floris S, Massa F, Sanna E, Biggio G. Allopregnanolone synthesis in cerebellar granule cells: roles in regulation of GABA(A) receptor expression and function during progesterone treatment and withdrawal. *Mol Pharmacol* 2000;57:1262-70.

Frye CA, Walf AA, Rhodes ME, Harney JP. Progesterone enhances motor, anxiolytic, analgesic, and antidepressive behavior of wild-type mice, but not those deficient in type 15 alpha-reductase. *Brain Res* 2004;1004:116-24.

Gorwood P. Neurobiological mechanisms of anhedonia. *Dialogues Clin Neurosci* 2008;10:291-99.

Gruen RJ, Wenberg K, Elahi R, Friedhoff AJ. Alterations in GABAA receptor binding in the prefrontal cortex following exposure to chronic stress. *Brain Res* 1995;684:112-14.

Guarneri P, Guarneri R, La Bella V, Scondotto S, Scoppa F, Piccoli F. Lateral differences in GABA binding sites in rat brain. *Neurochem Res* 1988;13:209-11.

Harrison NL, Majewska MD, Harrington JW, Barker JL. Structure-activity relationships for steroid interaction with the gamma-aminobutyric acidA receptor complex. *J Pharmacol Exp Ther* 1987;241:346-53.

Jacob MHVM, Janner DR, Bello'-Klein A, Llesuy SF, Ribeiro MFM. Dehydroepiandrosterone modulates antioxidant enzymes and Akt signaling in healthy Wistar rat hearts. *J Steroid Biochem Mol Biol* 2008;112:138-44.

Jaracz J. The anatomy of depression in light of evidence from neuroimaging studies. *Psychiatr Pol* 2008;42:875-88.

Kittler JT, Chen G, Kukhtina V, Vahedi-Faridi A, Gu Z, Tretter V, Smith KR, McAinsh K, Arancibia-Carcamo IL, Saenger W, Haucke V, Yan Z, Moss SJ.

Regulation of synaptic inhibition by phospho-dependent binding of the AP2 complex to a YECL motif in the GABAA receptor gamma2 subunit. Proc Natl Acad Sci U S A 2008;105:3616-21.

Klein AE and Rocci ML Jr. GMP criteria for retest and failure analysis. Handling out-of-specification results in the pharmaceutical quality control laboratory. Qual Assur [1995](#);4:247-51.

Kralic JE, Korpi ER, O'buckley TK, Homanics GE, Morrow AL. Molecular and pharmacological characterization of GABA(A) receptor alpha1 subunit knockout mice. J Pharmacol Exp Ther 2002;302:1037-45.

Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. Nature 1970; 227:680–85.

Levy-Cooperman N, Burhan AM, Rafi-Tari S, Kusano M, Ramirez J, Caldwell C, Black SE. Frontal lobe hypoperfusion and depressive symptoms in Alzheimer disease. J Psychiatry Neurosci 2008;33:218-26.

Maier SF, Amat J, Baratta MV, Paul E, Watkins LR. Behavioral control, the medial prefrontal cortex, and resilience. Dialogues Clin Neurosci 2006;8:397-06.

Majewska MD, Harrison NL, Schwartz RD, Barker JL, Paul SM. Steroid hormone metabolites are barbiturate-like modulators of the GABA receptor. Science 1986;232:1004-07.

Martijena ID, Rodríguez Manzanares PA, Lacerra C, Molina VA. Gabaergic modulation of the stress response in frontal cortex and amygdala *Synapse* 2002; 45:86-94.

Merali Z, Du L, Hrdina P, Palkovits M, Faludi G, Poulter MO, Anisman H. Dysregulation in the suicide brain: mRNA expression of corticotropin-releasing hormone receptors and GABA(A) receptor subunits in frontal cortical brain region *J Neurosci* 2004;24:1478-85.

Minier F and Sigel E. Positioning of the α -subunit isoforms confers a functional signature to γ -aminobutyric acid type A receptors. *Proc Natl Acad Sci USA* 2004;101:7769–74.

Nin MS, Salles FB, Azeredo LA, Frazon AP, Gomez R, Barros HM. Antidepressant effect and changes of GABAA receptor gamma2 subunit mRNA after hippocampal administration of allopregnanolone in rats. *J Psychopharmacol* 2008; 22:477-85.

Porsolt RD, Anton G, Blavet N, Jalfre M. Behavioural despair in rats: a new model sensitive to antidepressant treatments. *Eur J Pharmacol* 1978;47:379-91.

Radley JJ, Gosselink KL, Sawchenko PE. A discrete GABAergic relay mediates medial prefrontal cortical inhibition of the neuroendocrine stress response. *J Neurosci* 2009;29:7330-40.

Rotenberg VS. Functional brain asymmetry as a determinative factor in the treatment of depression: theoretical implications. Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry 2008;32:1772-77.

Saavedra M, Contreras CM, Azamar-Arizmendi G, Hernández-Lozano M. [Differential progesterone effects on defensive burying and forced swimming tests depending upon a gradual decrease or an abrupt suppression schedules.](#) Pharmacol Biochem Behav 2006;83:130-35.

Saeed S and Bano S. Inhibition of tryptophan pyrrolase activity in restraint female rats following medroxyprogesterone administration. J Coll Physicians Surg Pak 2007;17:63-8.

Sanna, E, Mostallino MC, Murru L, Carta M, Talani G, Zucca S, Mura ML, Maciocco E, Biggio G. Changes in expression and function of extrasynaptic GABAA receptors in the rat hippocampus during pregnancy and after delivery. J Neurosci 2009;29:1755-65.

Serretti A, Macciardi F, Cusin C, Lattuada E, Lilli R, Di Bella D, Catalano M, Smeraldi E. GABAA alpha-1 subunit gene not associated with depressive symptomatology in mood disorders. Psychiatr Genet 1998;8:251-54.

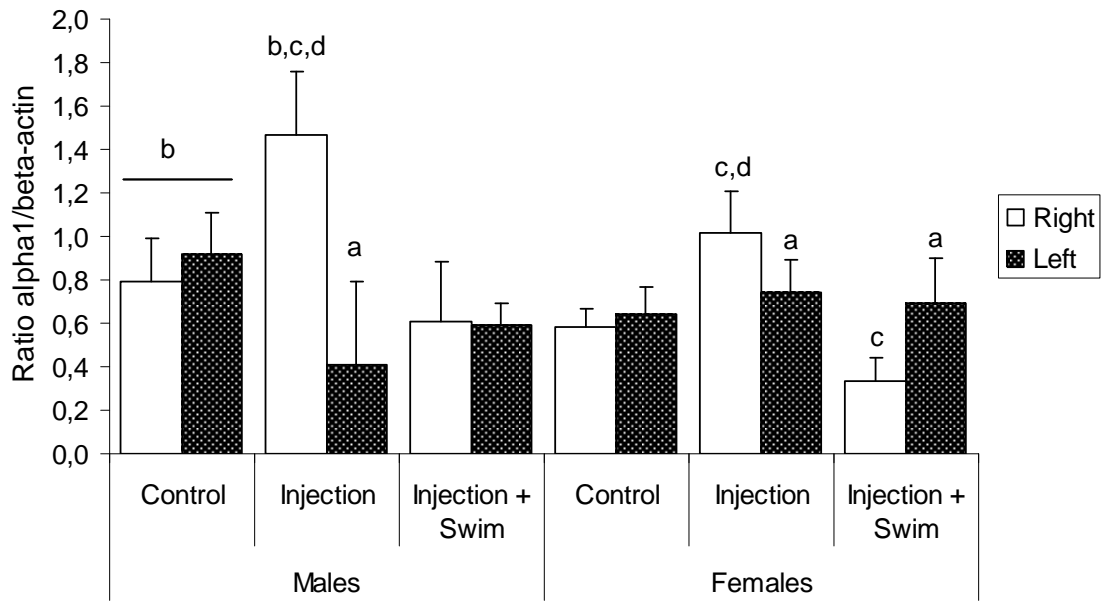
Stevenson CW, Halliday DM, Marsden CA, Mason R. Early life programming of hemispheric lateralization and synchronization in the adult medial prefrontal cortex. Neuroscience 2008;155:852-63.

Tranel D, Bechara A, Denburg NL. Asymmetric functional roles of right and left ventromedial prefrontal cortices in social conduct, decision-making and emotional processing. *Cortex* 2002;38:589-12.

Tranel D, Damasio H, Denburg NL, Bechara A. Does gender play a role in functional asymmetry of ventromedial prefrontal cortex? *Brain* 2005;128:2872–81.

Tunnicliff G, Malatynska E. Central GABAergic systems and depressive illness. *Neurochem Res* 2003;28:965-76.

A



B

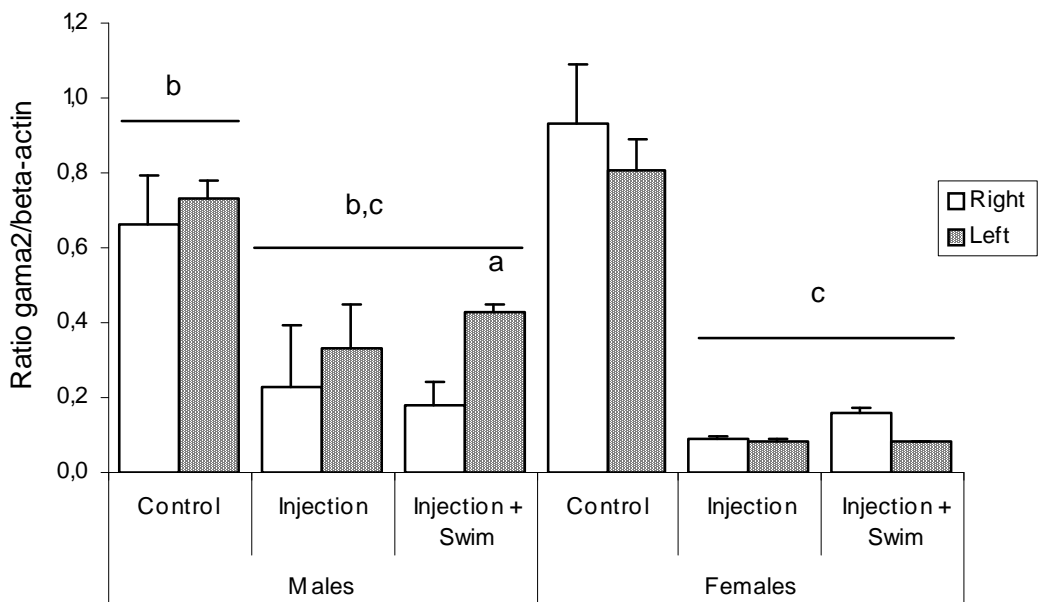
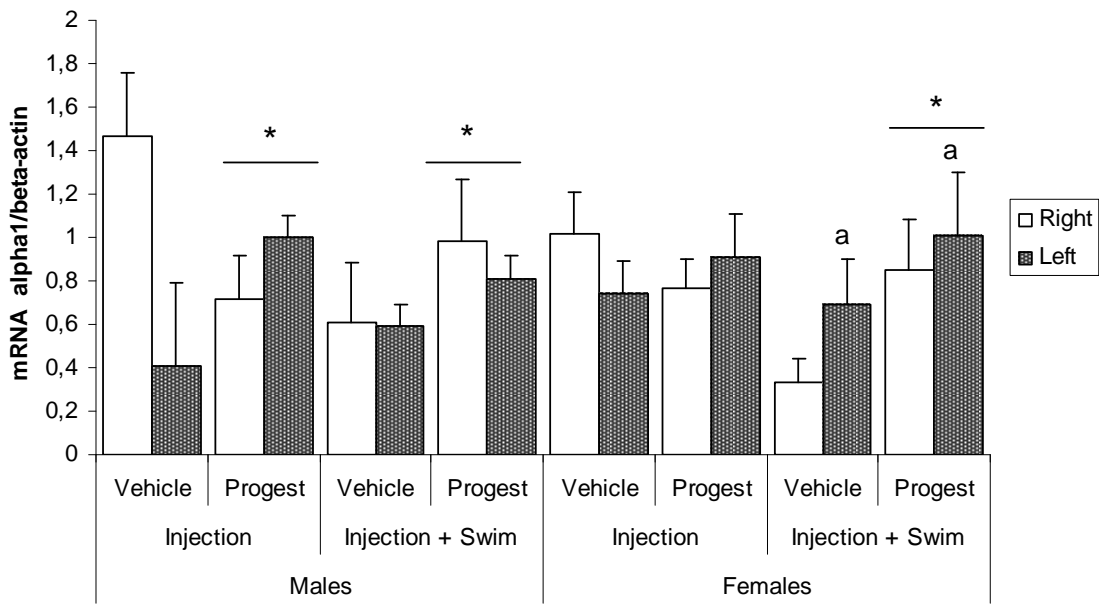


Fig 1 Effect of different stressors on the mRNA $\alpha 1$ (A) and $\gamma 2$ (B) subunits of the GABA_A receptor in the prefrontal cortex of Wistar rats. a= differ from right prefrontal cortex; b= differ from female; c= differ from control; d=differ from injection + Swim. P< 0.05 (ANOVA followed by SNK *pos hoc*).

A



B

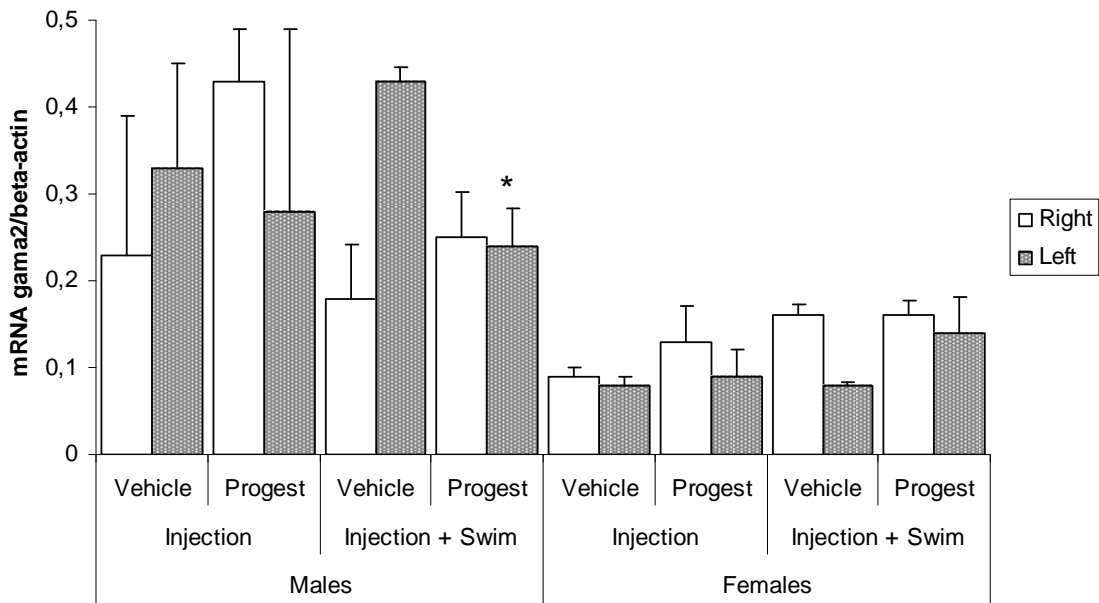


Fig 2 Effect of chronic treatment with progesterone (0.4 mg/kg) in the $\alpha 1$ (A) and $\gamma 2$ (B) mRNA subunits of the GABA_A receptor in the prefrontal cortex of Wistar rats submitted or not submitted to forced swim test. * Differ from vehicle rats in the same group; a= differ from right prefrontal cortex P< 0.05 (ANOVA followed by SNK *pos hoc*).

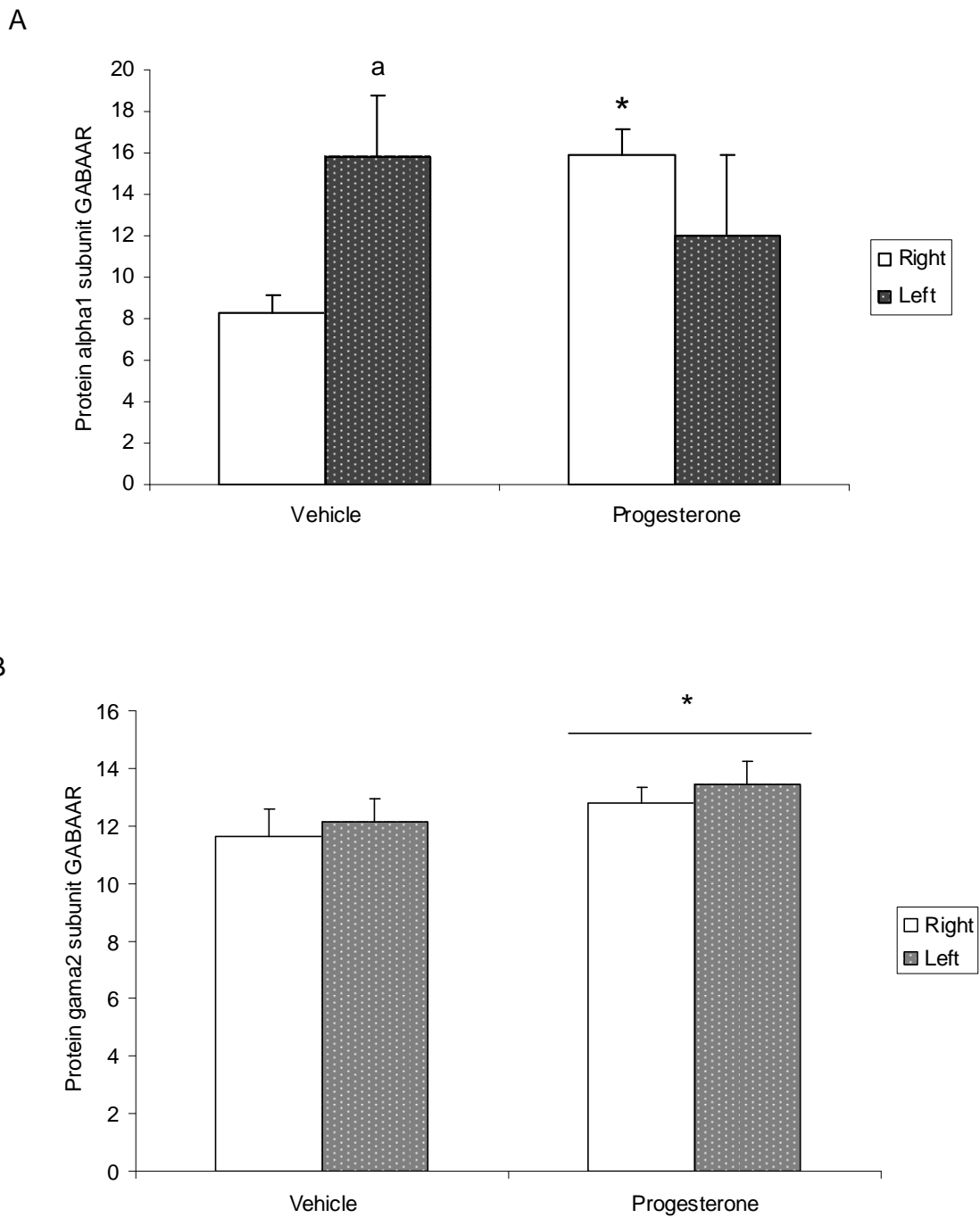


Fig 3 Effect of chronic treatment with progesterone (0.4 mg/kg) in the α 1 (A) and γ 2 (B) protein subunits of GABA_A receptor in pre-frontal cortex of females Wistar rats submitted or not to forced swim test. * Differ from vehicle rats in the same group; a= differ from right prefrontal cortex. P< 0.05 (ANOVA followed by SNK *post hoc*).

6. DISCUSSÃO CONCLUSIVA

Foi verificado o efeito da administração de baixas doses de progesterona sobre o comportamento tipo-depressivo em ratos Wistar (primeiro artigo). A progesterona não afetou a imobilidade dos animais após o protocolo agudo do teste do nado forçado. No entanto, a administração crônica de progesterona diminuiu a imobilidade das fêmeas em diestro II e aumentou a imobilidade dos machos. Portanto, houve efeito antidepressivo para as fêmeas e pró-depressivo para os ratos machos. Resultados semelhantes foram encontrados previamente com a administração do esteróide neuroativo DHEA, onde também não houve diferença após tratamento agudo, e a imobilidade foi alterada após tratamento crônico com baixas doses (Andrade, et al, 2007). Outros estudos mostraram que tratamentos com baixas doses de antidepressivos que foram ineficazes após tratamento agudo passaram a ser eficazes quando administradas em regime crônico (Detke et al., 1997; Cryan et al., 2005). Embora os antidepressivos possam produzir efeitos no teste do nado forçado em tratamento agudo ou crônico, alguns autores sugerem que o tratamento crônico aumenta a sensibilidade para os efeitos comportamentais dos antidepressivos (Detke et al., 1997; Cryan et al., 2005).

Outro resultado interessante que o primeiro artigo revela é o efeito da progesterona dependente do gênero, pois o tratamento crônico com este esteróide produziu efeito antidepressivo nas fêmeas e pró-depressivo nos machos. Este resultado está de acordo com os de outros autores, que demonstraram diferenças no comportamento tipo-depressivo relacionadas ao gênero (Brotto et al., 2001;

Bielajew et al., 2003). Foram descritos efeitos opostos sobre o comportamento tipo depressivo em machos e fêmeas após administração crônica de corticosterona (Brotto et al., 2001) e no sistema monoaminérgico (Dalla et al., 2008; Drossopoulou et al., 2004). Em trabalho prévio, nós também encontramos resposta comportamental específica ao gênero no teste do nado forçado após administração do esteróide neuroativo DHEA (Andrade et al., 2007). Ainda, demonstramos diferenças dependentes do gênero na atividade do eixo hipotálamo-hipófise-adrenal após o teste do nado forçado (Andrade et al., 2007). Desta forma, nossos resultados reforçam a importância de pesquisar o efeito de antidepressivos em machos e em fêmeas.

Interessantemente, a dose de progesterona utilizada diminuiu o comportamento tipo-depressivo das fêmeas em diestro II, sem alterar seu ciclo estral. Esta dose foi menor do que a utilizada para induzir o estro comportamental (Asarian et al., 2002; Walf et al., 2006). Assim, sugerimos que os centros encefálicos responsáveis pelo controle do comportamento tipo-depressivo poderiam ser mais sensíveis às baixas doses de progesterona do que o eixo hipotálamo-hipófise-gonadal. Outros autores têm demonstrado o efeito antidepressivo de doses baixas de progesterona em roedores fêmeas (Molina-Hernández e Téllez-Alcántara, 2001; Martínez-Mota et al., 1999). Também foi relatado que a progesterona em doses mais altas aumenta ou não altera o comportamento tipo depressivo neste e em outros modelos animais (Kaur et al., 2002; Reddy et al., 1998). Sugerimos que doses baixas de progesterona que não alterem o ciclo reprodutivo poderiam ser utilizadas no tratamento para a depressão em fêmeas, suavizando o brusco declínio da progesterona que ocorre em

períodos específicos da vida reprodutiva como o pré-menstrual, a perimenopausa e após o parto.

Os efeitos comportamentais da progesterona nos ratos machos e fêmeas também podem ser dependentes do protocolo de tratamento utilizado. Nossos resultados mostraram os efeitos que ocorrem imediatamente após o tratamento. Outros estudos demonstraram um aumento do comportamento tipo-depressivo em modelo de retirada da progesterona (Stoffel e Craft, 2004; Beckley e Finn, 2007). Ainda não foram avaliados os efeitos da retirada de baixas doses de progesterona. É possível que essa retirada não produza os resultados obtidos com as doses mais altas, ou seja, o aumento do comportamento depressivo pela redução da progesterona circulante. Seria interessante também estabelecer um esquema de tratamento pelo menor período possível capaz de minimizar essa variação dos níveis de progesterona e, portanto, de impedir a alteração comportamental.

Também no primeiro artigo, foi demonstrado que as fêmeas foram mais depressivas do que os machos no teste do nado forçado após protocolo crônico. Há relato de maior imobilidade (ou seja, maior comportamento depressivo) nas fêmeas em diestro II (Frye e Wawrzycki, 2003) embora a literatura traga resultados diversos, com maior duração de imobilidade nos machos (Dalla et al., 2008; Ferigolo et al., 1998; Yang et al., 2007) ou que não há diferença de sexo no teste do nado forçado (David et al., 2001; Andrade et al., 2007). Um dos fatores que podem influenciar estas diferentes respostas é o número reduzido de animais por grupo utilizados em alguns estudos. Também salientamos as diferenças decorrentes das distintas espécies e protocolos utilizados. Além disso, a maior imobilidade das fêmeas em diestro II sugere que ratas fêmeas nesta fase do ciclo

estral podem ter uma predisposição ao comportamento tipo-depressivo. Da mesma forma que as fêmeas em diestro II, as mulheres nos períodos pré-menstrual, pós-parto e durante a perimenopausa apresentam níveis séricos de progesterona abruptamente reduzidos e são mais susceptíveis à depressão. Assim, demonstramos uma diferença de gênero no comportamento tipo-depressivo em ratos similar a que ocorre nos humanos, com prevalência feminina. Concluimos, portanto, que o uso de fêmeas em diestro II parece ser o mais indicado para o estudo da depressão feminina no teste do nado forçado.

A partir destes resultados, buscamos esclarecer o mecanismo de ação da progesterona responsável por seus efeitos sobre o comportamento tipo-depressivo dos ratos machos e fêmeas. Há um número crescente de estudos relatando um envolvimento importante do sistema GABAérgico na modulação do comportamento emocional e do humor (Tunnicliff and Malatynska, 2003; Brambilla et al., 2003; Amin et al., 2006; Epperson et al., 2006; Nin et al., 2008). Além disso, sabe-se que a progesterona é capaz de alterar a função do sistema GABA_A devido à ação do seu metabólito alopregnanolona, um potente modulador positivo deste receptor (Harrison et al., 1987; Majewska et al., 1986). Assim, o objetivo do segundo e terceiro artigos foi verificar a expressão de subunidades do receptor GABA_A de ratos Wistar machos e fêmeas, em duas estruturas encefálicas importantes na regulação comportamental relacionada ao humor: o estriado e o córtex pré-frontal. O estriado é a principal estação de entrada dos núcleos da base e está envolvido em respostas comportamentais relacionadas a anedonia e ao aprendizado associado à recompensa (Steele et al., 2007; Massimiliano et al., 2009). O córtex pré-frontal é um ponto crucial do circuito límbico que está

envolvido na controlabilidade de situações estressoras (Amat et al. 2005; Amat et al, 2008; Baratta et al, 2008). O grau de controle comportamental que um organismo tem sobre o estressor é um potente modulador do impacto deste estressor: estressores não-controláveis produzem efeitos que não ocorrem se o estressor for controlável (Baratta et al, 2008; Mayer et al, 2006). Desta forma, também foi avaliada a interferência do estresse, bem como da administração de baixas doses de progesterona sobre a expressão das subunidades $\alpha 1$ e $\gamma 2$. Estas subunidades são amplamente expressas por todo o encéfalo (Kralic et al., 2002; Pirker et al., 2000) e medeiam a transmissão GABAérgica sináptica ou fásica (Farrant and Nusser, 2005).

Verificamos que a expressão das subunidades $\alpha 1$ e $\gamma 2$ no córtex pré-frontal e no estriado é específica ao gênero, sofrendo interação com o estresse e com o hemisfério cerebral. Estes fatores interferem, conjuntamente, na alteração destas subunidades em resposta ao tratamento com progesterona.

No presente estudo, a expressão da subunidade $\gamma 2$ do receptor GABA_A nos animais controle foi mais alta no estriado e no córtex pré-frontal das fêmeas do que dos machos. Em relação à subunidade $\alpha 1$, a expressão foi dependente da estrutura analisada: no estriado, não houve diferença de gênero na expressão da subunidade $\alpha 1$, enquanto no córtex pré-frontal os machos tiveram maior expressão desta subunidade do que as fêmeas. Outros estudos têm demonstrado modificações na expressão das subunidades $\alpha 1$ e $\gamma 2$ relacionadas com os níveis encefálicos de progesterona e do seu metabólito alopregnanolona em várias estruturas do encéfalo, tais como córtex cerebral, hipocampo e hipotálamo (Concas et al, 1998;

Clark et al,1998; Follesa et al, 2000, Nine et al, 2008). Porém, estes estudos não comparam a expressão gênica destas subunidades entre os machos e as fêmeas.

A expressão da subunidade $\gamma 2$ no estriado dos ratos controle foi assimétrica, onde machos mostraram maior expressão no hemisfério esquerdo do que no direito. Esta assimetria está em conformidade com a encontrada em humanos saudáveis e naqueles que respondem ao tratamento antidepressivo (Spronk et al., 2008; Accortt and Allen, 2006; Galaburda, 1978). Sugerimos que a assimetria da subunidade $\gamma 2$ dos machos pode representar uma característica de risco mais baixo para depressão. De fato, estes machos apresentaram menor comportamento tipo-depressivo no teste do nado forçado. As fêmeas, por outro lado, não apresentaram assimetria na expressão da subunidade $\gamma 2$. Este pode ser um fator que influencie no fato da depressão ser uma desordem predominantemente feminina. Já no córtex pré-frontal dos ratos controle não houve assimetria em nenhuma das subunidades analisadas. Embora não haja estudos comparando a expressão das subunidades do receptor GABA_A entre os hemisférios direito e esquerdo, outras técnicas revelaram a existência de assimetria no sistema GABAérgico no córtex pré-frontal de ratos (Guarneri et al., 1988).

É interessante observar que o estresse altera a simetria da expressão da subunidade $\alpha 1$ do receptor GABA_A, induzindo maior expressão no lado direito do que no esquerdo. Esta resposta assimétrica ocorreu no estriado e no córtex pré-frontal de ratos machos e fêmeas submetidos ao estresse específico das injeções. O mesmo padrão assimétrico foi demonstrado no hipocampo de ratos machos que

foram submetidos ao nado forçado e tratados com alopregnanolona (Nin et al., 2008). Estes achados, em conjunto, indicam uma importante modulação de estressores específicos sobre a expressão da subunidade $\alpha 1$ no lado direito. Corroborando nossos resultados, foi recentemente descrito que a causa principal da depressão está relacionada à inabilidade do hemisfério cerebral direito em responder às demandas do ambiente polidimensional (Rotenberg, 2008).

A expressão das subunidades $\alpha 1$ e $\gamma 2$ também foi alterada pela exposição ao estresse de forma dependente do gênero e de acordo com a estrutura estudada. No estriado, a expressão da subunidade $\alpha 1$ não foi alterada pelo estresse nas ratas fêmeas. No entanto, o estresse das injeções diminuiu a expressão desta subunidade nos ratos machos. Por outro lado, no córtex pré-frontal, o estresse das injeções aumentou a expressão da subunidade $\alpha 1$ no hemisfério direito dos ratos machos e das fêmeas. Nas duas estruturas, a expressão da subunidade $\alpha 1$ nos machos retornou aos valores dos animais controle após o estresse adicional do nado forçado. Portanto, os machos respondem ao estresse pela alteração da expressão da subunidade $\alpha 1$ e têm a capacidade de se recuperar desta alteração após a exposição a outro tipo de estressor. Estes resultados nos permitem sugerir que, no estriado e no córtex pré-frontal, a resposta ao estresse em machos pode estar associada a modificações da expressão da subunidade $\alpha 1$. Foi descrito aumento (Kang et al., 1991) bem como diminuição (Zheng et al., 2007) a expressão da subunidade $\alpha 1$ no córtex após diferentes protocolos de estresse (Zheng et al, 2007; Orchinik et al, 1995; Qin et al., 2004; Kang et al, 1991). No estriado não foram encontradas diferenças

significativas na expressão da subunidade $\alpha 1$ em resposta ao estresse, (Zheng et al., 2007)

O fator controlabilidade parece ser importante na aparente recuperação da expressão da subunidade $\alpha 1$ em resposta ao estresse no estriado e no córtex pré-frontal. Foi recentemente demonstrado que uma exposição prévia a um estressor controlável bloqueia as conseqüências comportamentais típicas causadas por estressores incontroláveis (Radley et al., 2009; Amat et al., 2008). Esse bloqueio é dado pela potencialização da inibição GABAérgica pelo córtex pré-frontal sobre a resposta neuroendócrina ao estresse (Radley et al., 2009; Amat et al., 2008).

Deve-se salientar que a expressão da subunidade $\alpha 1$ aumenta numa estrutura e diminui na outra após o estresse. É possível que os diferentes papéis exercidos pelo córtex pré-frontal e pelo estriado em respostas ao estresse requeiram diferentes modulações da expressão da subunidade $\alpha 1$.

Também foi demonstrado que o estresse, independente do tipo, diminui a expressão da subunidade $\gamma 2$, tanto no estriado como no córtex pré-frontal. No estriado, houve uma recuperação parcial da diminuição da expressão da subunidade $\gamma 2$ nas fêmeas após o nado forçado. A administração de progesterona também foi capaz de recuperar a diminuição da expressão da subunidade $\gamma 2$ causada pelo estresse das injeções, aumentando a expressão da subunidade $\gamma 2$ bilateralmente nas fêmeas e no hemisfério esquerdo nos machos. Interessantemente, quando associada ao estresse do nado, a progesterona teve efeito apenas nos grupos em que o estresse do nado não reverteu esta diminuição causada pelas injeções. Ou seja, a progesterona aumentou a expressão da

subunidade $\gamma 2$ somente nos ratos machos. Correlacionando os resultados da expressão das subunidades do receptor GABA_A com o comportamento tipo-depressivo destes animais, foi verificada a existência de uma correlação positiva entre o comportamento tipo-depressivo e a expressão da subunidade $\gamma 2$ no hemisfério direito dos machos tratados com progesterona.

No córtex pré-frontal, o estresse controlável das injeções aumentou a expressão da subunidade $\alpha 1$ no hemisfério direito nos machos e nas fêmeas, e o tratamento com progesterona teve o mesmo efeito que o estresse das injeções nos machos, porém, com aumento bilateral. Apenas os machos recuperaram a expressão da subunidade $\alpha 1$ no córtex pré-frontal direito após o nado. Por outro lado, houve correlação negativa entre o comportamento tipo-depressivo das fêmeas tratadas com progesterona e o mRNA, bem como com a proteína da subunidade $\alpha 1$ também no córtex pré-frontal direito. Como visto anteriormente no resultado do efeito do estresse sobre a expressão da subunidade $\alpha 1$, encontramos uma importante modulação desta subunidade no hemisfério direito do córtex pré-frontal. Considerando a importância do córtex pré-frontal na controlabilidade das situações estressoras (Amat et al. 2005; Amat et al, 2008; Baratta et al, 2008), nossos resultados permitem sugerir que o aumento da subunidade $\alpha 1$ pela progesterona pode restaurar a eficiência do córtex pré-frontal direito. Este pode ser um mecanismo pelo qual a progesterona atua no comportamento depressivo em fêmeas. Não houve correlação entre o comportamento tipo-depressivo dos machos tratados com a expressão da subunidade $\alpha 1$ no córtex pré-frontal.

Outro aspecto importante a considerar é que a subunidade $\gamma 2$ no córtex pré-frontal das fêmeas apresenta uma maior suscetibilidade ao efeito do estresse, observada na grande redução da expressão do seu mRNA. Esta redução é ainda maior do que a observada nos machos. Isto, associado ao fato de que foram utilizadas baixas doses de progesterona, pode ter impedido o efeito deste hormônio sobre a expressão da subunidade $\gamma 2$ nas fêmeas, embora haja relatos da alteração desta subunidade em diversas estruturas do SNC, incluindo o córtex pré frontal, em resposta à progesterona e à alopregnanolona (Sanna et al., 2009; Nim et al., 2008; Concas et al., 1999).

A comparação da expressão do mRNA e da proteína no córtex pré-frontal dos machos que nadaram mostrou resultados muito interessantes. Embora o tratamento com progesterona e o estresse do nado não alterem o mRNA da subunidade $\gamma 2$ nas fêmeas, a expressão protéica desta subunidade foi aumentada. Por outro lado, a progesterona aumentou bilateralmente a expressão do mRNA da subunidade $\alpha 1$ nas fêmeas, enquanto a expressão protéica foi alterada apenas no córtex pré-frontal direito destas ratas. Estes resultados sugerem uma regulação pós transcricional ou pós-traducional sobre as subunidades $\alpha 1$ e $\gamma 2$ do receptor GABA_A. Desta forma, nossos dados indicam a necessidade de analisar o mRNA e a expressão protéica conjuntamente para obter um conhecimento mais completo acerca da modulação da função desses receptores. Corroborando nossa hipótese, estudos recentes demonstraram uma modificação pós-traducional reversível, como fosforilação e ubiquitinação de motivos dentro do domínio intracelular da

subunidade $\gamma 2$ do receptor GABA_A (Kittler et al, 2008; Arancibia-Cárcamo et al, 2009).

Em resumo, foi demonstrado que a administração crônica de baixas doses de progesterona, que não alteram o ciclo reprodutivo nas fêmeas, têm efeito antidepressivo para as fêmeas e pró-depressivo para os ratos machos. Além disso, as fêmeas são mais depressivas do que os machos no teste do nado forçado. O efeito antidepressivo da progesterona nas fêmeas está correlacionado com a maior expressão da subunidade $\alpha 1$ no córtex pré-frontal. O efeito pró-depressivo nos machos está correlacionado com o aumento da expressão da subunidade $\gamma 2$ no estriado. Nestas estruturas, o hemisfério direito participa da modulação do comportamento tipo depressivo.

No estriado e no córtex pré-frontal, há uma importante modulação de estressores específicos sobre a expressão da subunidade $\alpha 1$ no hemisfério direito. A progesterona, por sua vez, recupera a alteração da expressão das subunidades $\alpha 1$ e $\gamma 2$ causada pelo estresse das injeções nos grupos em que o estresse do nado não reverteu esta diminuição.

As diferenças de gênero e efeitos comportamentais só apareceram após protocolo crônico, demonstrando que o tempo de tratamento e de manuseio é importante para a verificação de resultados comportamentais.

Finalmente, no córtex pré-frontal o mRNA e a proteína das subunidades do receptor GABA_A podem ser diferentemente alteradas, indicando a existência de possíveis mecanismos de modificação pós-transcricional.

Considerando os resultados obtidos nesta tese, onde houve diferença no comportamento tipo depressivo e na expressão de subunidades do receptor GABA_A entre machos e fêmeas, bem como nas estruturas dos hemisférios cerebrais direito e esquerdo, e na expressão do RNAm e da proteína, sugerimos que todos esses fatores sejam considerados no planejamento de experimentos animais. Além disso, não deve ser ignorado que injeções crônicas representam um fator estressor capaz de causar alterações na expressão de subunidades do receptor GABA_A, e possivelmente também alterem outros sistemas não estudados neste trabalho. Finalmente, os dados obtidos neste trabalho indicam que o tratamento com baixas doses de progesterona deveria ser investigado para que se estabeleça sua possível aplicação no tratamento da depressão em mulheres.

7. PERSPECTIVAS

São perspectivas para a continuidade deste estudo:

- Determinar a expressão das subunidades δ e $\alpha 4$ do receptor $GABA_A$ seguindo o mesmo protocolo experimental descrito neste trabalho.
- Comparar a expressão do mRNA das subunidades $\alpha 1$, $\alpha 4$, $\gamma 2$, e δ e entre os machos e as fêmeas durante todas as fases do ciclo estral, sem outros fatores estressores adicionais.
- Verificar a influência do gênero e das diferentes fases do ciclo estral sobre a expressão do mRNA e da proteína das subunidades $\alpha 1$ e $\gamma 2$ do receptor $GABA_A$ no hipocampo de ratos Wistar machos e fêmeas.
- Avaliar o comportamento tipo-depressivo de ratos Wistar após retirada de baixas doses de progesterona.
- Determinar a menor janela temporal de tratamento efetivo com baixas doses de progesterona sobre o comportamento tipo-depressivo.

8. BIBLIOGRAFIA

Abe, H., Hidaka, N., Kawagoe, C., Odagiri, K., Watanabe, Y., Ikeda, T., Ishizuka, Y., Hashiguchi, H., Takeda, R., Nishimori, T., Ishida, Y., 2007. Prenatal psychological stress causes higher emotionality, depression-like behavior, and elevated activity in the hypothalamo-pituitary-adrenal axis. *Neurosci Res.* 59, 145-151.

Accortt, E.E., Allen, J.J., 2006. Frontal EEG asymmetry and premenstrual dysphoric symptomatology. *J Abnorm Psychol.* 115,179-184.

Akiyama, H., Hashimoto, H., Kawabe, J., Higashiyama, S., Kai, T., Kataoka, K., Shimada, A., Inoue, K., Shiomi, S., Kiriike, N., 2008. The relationship between depressive symptoms and prefrontal hypoperfusion demonstrated by eZIS in patients with DAT. *Neurosci Lett.* 441, 328-31.

Alexander, G.E., Crutcher, M.D., 1990. Functional architecture of basal ganglia circuits: neural substrates of parallel processing. *Trends Neurosci.* 13, 266–271.

Alonso S.J., Castellano D., 1991. Sex differences in behavioral despair: relationships between behavioral despair and open field activity. *Physiol Behav.* 49:69-72.

Amat, J., Baratta, M.V., Paul, E., Bland, S.T., Watkins, L.R., Maier, S.F., 2005. Medial prefrontal cortex determines how stressor controllability affects behavior and dorsal raphe nucleus. *Nat Neurosci.* 8, 365-371.

Amat, J., Paul, E., Watkins, L.R., Maier, S.F., 2008. Activation of the ventral medial prefrontal cortex during an uncontrollable stressor reproduces both the immediate and long-term protective effects of behavioral control. *Neuroscience* 154, 1178-1186.

Amin, Z., Mason, G.F., Cavus, I., Krystal, J.H., Rothman, D.L., Epperson, C.N., 2006. The interaction of neuroactive steroids and GABA in the development of neuropsychiatric disorders in women. *Pharmacol Biochem Behav* 84,635-643.

Andrade, S., Silveira, S.L., Arbo, B.D., Batista, B.A., Gomez, R., Barros, H.M., Ribeiro, M.F., 2010. Sex-dependent antidepressant effects of lower doses of progesterone in rats. *Physiol Behav.* 99,687-690.

Andrade, S., Silveira, S.L., Gomez, R., Barros, H.M., Ribeiro, M.F., 2007. Gender differences of acute and chronic administration of dehydroepiandrosterone in rats submitted to the forced swimming test. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* 31,613-621.

Arancibia-Cárcamo, I.L., Yuen, E.Y., Muir, J., Lumb, M.J., Michels, G., Saliba, R.S., Smart, T.G., Yan, Z., Kittler, J.T., Moss, S.J., 2009. Ubiquitin-dependent lysosomal targeting of GABA(A) receptors regulates neuronal inhibition *Proc Natl Acad Sci U S A.* 106, 17552-17557.

Asarian, L., Geary, N., 2002. Cyclic estradiol treatment normalizes body weight and restores physiological patterns of spontaneous feeding and sexual receptivity in ovariectomized rats. *Horm Behav*;42:461-71.

Asplund, C.L., Todd, J.J., Snyder, A.P., Marois, R., 2010. A central role for the lateral prefrontal cortex in goal-directed and stimulus-driven attention. *Nat Neurosci.* Mar 7. [Epub ahead of print]

Aylward, E.H., Roberts-Twillie, J.V., Barta, P.E., Kumar, A.J., Harris, G.J., Geer, M., Peyser, C.E., Pearlson, G.D., 1994. Basal ganglia volumes and white matter hyperintensities in patients with bipolar disorder. *Am J Psychiatry.* 151,687-693.

Baratta, M.V., Lucero, T.R., Amat, J., Watkins, L.R., Maier, S.F., 2008. Role of the ventral medial prefrontal cortex in mediating behavioral control-induced reduction of later conditioned fear. *Learn Mem.* 15, 84-87.

Barnard, E.A., Skolnick, P., Olsen, R.W., Mohler, H., Sieghart, W., Biggio, G., Braestrup, C., Bateson, A.N., Langer, S.Z., 1998. International Union of Pharmacology. XV. Subtypes of gamma-aminobutyric acidA receptors: classification on the basis of subunit structure and receptor function. *Pharmacol Rev.* 50, 291-313.

Barros H.M., Ferigolo, M., 1998. Ethopharmacology of imipramine in the forced-swimming test: gender differences. *Neurosci Biobehav Rev.* 23, 279-286.

Baulieu, E.E., 1998. Neurosteroids: a novel function of the brain. *Psychoneuroendocrinology.* 23,963-987.

Baur, R., Minier, F., Sigel, E., A., 2006. GABA(A) receptor of defined subunit composition and positioning: concatenation of five subunits. *FEBS Lett.* 580,1616-1620.

Beckley E.H., Finn, D.A., 2007. Inhibition of progesterone metabolism mimics the effect of progesterone withdrawal on forced swim test immobility. *Pharmacol Biochem Behav.* 87, 412-419.

Belelli, D.; Casula, A.; Ling, A.; Lambert, J.J., 2002. The influence of subunit composition on the interaction of neurosteroids with GABA(A) receptors. *Neuropharmacology.* 43, 651-661.

Bielajew, C., Konkle, A.T., Kentner, A.C., Baker, S.L., Stewart, A., Hutchins, A.A., Santa-Maria, B. L., Fouriez, G., 2003. Strain and gender specific effects in the forced swim test: effects of previous stress exposure. *Stress.* 6, 269-280.

Bloch, M., Rotenberg, N., Koren, D., Klein, E., 2006. Risk factors for early postpartum depressive symptoms. *Gen. Hosp. Psychiatry* 28, 3–8.

Bormann, J., 2000. The 'ABC' of GABA receptors. *Trends Pharmacol. Sci.* 21, 16–19

Bradford, M.M., 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 72, 248–254.

Brambilla, P., Perez, J., Barale, F., Schettini, G., Soares, J.C., 2003. GABAergic dysfunction in mood disorders. *Mol Psychiatry* 8,721-737.

Brambilla, P., Perez, J., Barale, F., Schettini, G., Soares, J.C., 2003. GABAergic dysfunction in mood disorders. *Mol Psychiatry.* 8, 721-737.

Braverman, P.K., 2007. Premenstrual syndrome and premenstrual dysphoric disorder. *J Pediatr Adolesc Gynecol.* 20, 3-12.

Brody, A.L., Saxena, S., Stoessel, P., Gillies, L.A., Fairbanks, L.A., Alborzian, S., Phelps, M.E., Huang, S.C., Wu, H.M., Ho, M.L., Ho., M.K., Au., S.C., Maidmen, K., Baxter, L.R., Jr., 2001. Regional brain metabolic changes in patients with major depression treated with either paroxetine or interpersonal therapy: preliminary findings. *Arch Gen Psychiatry.* 58, 631-640

Brotto, L.A., Gorzalka, B.B., Barr, A.M., 2001. Paradoxical effects of chronic corticosterone on forced swim behaviours in aged male and female rats. *Eur J Pharmacol* 424, 203-209.

Brown, N., Kerby, J., Bonnert, T.P., Whiting, P.J., Wafford, K.A. 2002. Pharmacological characterization of a novel cell line expressing human alpha(4)beta(3)delta GABA(A) receptors. *Br J Pharmacol.* 136, 965-974.

Brussaard, A.B., Devay, P., Leyting-Vermeulen, J.L., Kits, K.S., 1999. Changes in properties and neurosteroid regulation of GABAergic synapses in the supraoptic nucleus during the mammalian female reproductive cycle. *J Physiol.* 15, 513-524.

Byrnes, E.M., Lee, J.O., Bridges, R.S., 2007. Alterations in GABA(A) receptor alpha2 subunit mRNA expression following reproductive experience in rats. *Neuroendocrinology.* 85, 148-156.

Campbell, T., Lin, S., Devries, C., Lambert, K., 2003. Coping strategies in male and female rats exposed to multiple stressors. *Physiol Behav.* 78:495-504.

Campbell, S., MacQueen, G., 2006. An update on regional brain volume differences associated with mood disorders. *Curr Opin Psychiatry*. 19,25-33.

Capper-Loup, C., Kaelin-Lang, A., 2008. Lateralization of dynorphin gene expression in the rat striatum *Neurosci Lett*. 447,106-108.

Chiesa, A.D., Pecchia, T., Tommasi, L., Vallortigara, G., 2006. Multiple landmarks, the encoding of environmental geometry and the spatial logics of a dual brain. *Anim Cogn*. 9, 281-293.

CID-10 – 1993 - Classificação Estatística Internacional de Doenças e Problemas Relacionados à Saúde. Décima Revisão. Centro Colaborador da OMS para a Classificação de Doenças em Português (Centro Brasileiro de Classificação de Doenças) - Faculdade de Saúde Pública da Universidade de São Paulo/Organização Mundial de Saúde/Organização Pan-Americana de Saúde

Compagnone, N.A., Mellon, S.H., 2000. Neurosteroids: biosynthesis and function of these novel neuromodulators. *Front Neuroendocrinol*. 21,1-56.

Concas, A., Follesa, P., Barbaccia, M.L., Purdy, R.H., Biggio, G., 1999. Physiological modulation of GABA(A) receptor plasticity by progesterone metabolites. *Eur J Pharmacol* 375, 225-235.

Consoli, D., Fedotova, J., Micale, V., Sapronov, N.S., Drago, F., 2005. Stressors affect the response of male and female rats to clomipramine in a model of behavioral despair (forced swim test). *Eur J Pharmacol*. 520, 100-107.

Cryan, J.F., Page, M.E., Lucki, I., 2005. Differential behavioral effects of the antidepressants reboxetine, fluoxetine, and moclobemide in a modified forced swim test following chronic treatment. *Psychopharmacology (Berl)*.182, 335-344.

Czéh, B., Perez-cruz, C., Fuchs, E., Flügge, G. 2008. Chronic stress-induced cellular changes in the medial prefrontal cortex and their potential clinical implications: does hemisphere location matter? *Behav Brain Res*. 26;190, 1-13.

Dalla, C., Antoniou, K., Kokras, N., Drossopoulou, G., Papathanasiou, G., Bekris, S., Daskas, S., Papadopoulou-Daifoti, Z., 2008. Sex differences in the effects of two stress paradigms on dopaminergic neurotransmission. *Physiol Behav*. 93, 595-605.

David, D.J., Nic Dhonnchadha, B.A., Jolliet, P., Hascoët, M., Bourin, M. 2001. Are there gender differences in the temperature profile of mice after acute antidepressant administration and exposure to two animal models of depression? *Behav Brain Res*.119, 203-211.

De Blas, A.L., 1996. Brain GABAA receptors studied with subunit-specific antibodies. *Mol Neurobiol*. 12, 55-71.

Dennerstein, L., Soares, C.N., 2008. The unique challenges of managing depression in mid-life women. *World Psychiatry*.7, 137-142.

Detke, M.J., Johnson, J., Lucki, I., 1997. Acute and chronic antidepressant drug treatment in the rat forced swimming test model of depression. *Exp Clin Psychopharmacol*. 5, 107-112.

Di Filippo, M., Picconi, B., Tantucci, M., Ghiglieri, V., Bagetta, V., Sgobio, C., Tozzi, A., Parnetti, L., Calabresi, P., 2009. Short-term and long-term plasticity at corticostriatal synapses: implications for learning and memory. *Behav Brain Res.* 199, 108-118.

Doornbos, B., Fokkema, D.S., Molhoek, M., Tanke, M.A., Postema, F., Korf, J., 2009. Abrupt rather than gradual hormonal changes induce postpartum blues-like behavior in rats. *Life Sci.* 84, 69-74.

Drossopoulou, G., Antoniou, K., Kitraki, E., Papathanasiou, G., Papalexi, E., Dalla, C., Papadopoulou-Daifoti, Z., 2004. Sex differences in behavioral, neurochemical and neuroendocrine effects induced by the forced swim test in rats. *Neuroscience.* 126, 849-857.

DSM-IV - 1994 - Manual de Diagnóstico e Estatística da Associação Norte-Americana de Psiquiatria, IV - Revisão. 4ª edição, publicado pela Associação Psiquiátrica Americana, em Washington.

Dubrovsky, B., 2006. Neurosteroids, neuroactive steroids, and symptoms of affective disorders. *Pharmacol Biochem Behav.* 84, 644-655.

Duke, J.M., Sibbritt, D.W., Young, A.F., 2007. Is there an association between the use of oral contraception and depressive symptoms in young Australian women? *Contraception.* 75, 27-31.

Elovainio, M., Teperi, J., Alto, A.M., Grenman, S., Kivelä, A., Kujansuu, E., Vuorma, S., Yliskoski, M., Paavonen, J., Hurskainen, R., 2007. Depressive

symptoms as predictors of discontinuation of treatment of menorrhagia by levonorgestrel-releasing intrauterine system. *Int J Behav Med.*14, 70-75.

Epperson, C.N., Haga, K., Mason, G.F., Sellers, E., Gueorguieva, R., Zhang, W., Weiss, E., Rothman, D.L., Krystal, J.H., 2002. Cortical gamma-aminobutyric acid levels across the menstrual cycle in healthy women and those with premenstrual dysphoric disorder: a proton magnetic resonance spectroscopy study. *Arch Gen Psychiatry.* 59, 851-858.

Epperson, C.N., Gueorguieva, R., Czarkowski, K.A., Stiklus, S., Sellers, E., Krystal, J.H., Rothman, D.L., Mason, G.F., 2006. Preliminary evidence of reduced occipital GABA concentrations in puerperal women: a ¹H-MRS study. *Psychopharmacology.*186, 425-433.

Eser, D.; Schule, C.; Romeo, E.; Baghai, T.C.; Di Michele, F.; Pasini, A.; Zwanzger, P.; Padberg, F.; Rupprecht, R., 2006. Neuropsychopharmacological properties of neuroactive steroids in depression and anxiety disorders. *Psychopharmacology (Berl).* 186, 373-387.

Evans, H.M., Long, J.A., 1922. Characteristic Effects upon Growth, Oestrus and Ovulation Induced by the Intraperitoneal Administration of Fresh Anterior Hypophyseal Substance. *Proc Natl Acad Sci.* Mar;8(3):38-9

Fan, F., Zou, Y., Ma, A., Yue, Y., Mao, W., Ma, X., 2009. Hormonal changes and somatopsychologic manifestations in the first trimester of pregnancy and post partum. *Int J Gynecol Obstet.* 105, 46-49.

Farrant, M., Nusser, Z., 2005. Variations on an inhibitory theme: phasic and tonic activation of GABA(A) receptors. *Nat Rev Neurosci.* 6,215-229.

Fénelon, V.S., Herbison, A.E., 2000. Progesterone regulation of GABA_A receptor plasticity in adult rat supraoptic nucleus. *Eur J Neurosci.* 12,1617-1623.

Ferigolo, M., Barros, H.M., Marquardt, A.R., Tannhauser, M., 1998. Comparison of behavioral effects of moclobemide and deprenyl during forced swimming. *Pharmacol Biochem Behav.* 60,431-437.

Foley, C.M., Stanton, J.J., Price, E.M., Cunningham, J.T., Hasser, E.M., Heesch, C.M., 2003. GABA(A) alpha1 and alpha2 receptor subunit expression in rostral ventrolateral medulla in nonpregnant and pregnant rats. *Brain Res.* 975,196-206.

Follesa, P., Porcu, P., Sogliano, C., Cinus, M., Biggio, F., Mancuso, L., Mostallino, M.C., Paoletti, A.M., Purdy, R.H., Biggio, G., Concas, A., 2002. Changes in GABA_A receptor gamma 2 subunit gene expression induced by long-term administration of oral contraceptives in rats. *Neuropharmacology.* 42, 325-336.

Follesa, P., Serra, M., Cagetti, E., Pisu, M.G., Porta, S., Floris, S., Massa, F., Sanna, E., Biggio, G., 2000. Allopregnanolone synthesis in cerebellar granule cells: roles in regulation of GABA(A) receptor expression and function during progesterone treatment and withdrawal. *Mol Pharmacol.* 57, 1262-1270.

Follesa, P., Mostallino, M.C., Biggio, F., Gorini, G., Caria, S., Busonero, F., Murru, L., Mura, M.L., Sanna, E., Biggio, G., 2005. Distinct patterns of expression and

regulation of GABA receptors containing the delta subunit in cerebellar granule and hippocampal neurons. *J Neurochem.* 94, 659-671.

Forbes, E.E., Hariri, A.R., Martin, S.L., Silk, J.S., Moyles, D.L., Fisher, P.M., Brown, S.M., Ryan, N.D., Birmaher, B., Axelson, D.A., Dahl, R.E., 2009. Altered striatal activation predicting real-world positive affect in adolescent major depressive disorder. *Am J Psychiatry.* 166,64-73.

Frackiewicz, E.J., Sramek, J.J., Cutler, N.R., 2000. Gender differences in depression and antidepressant pharmacokinetics and adverse events. *Ann Pharmacother.* 34, 80-88.

Freeman, E.W., Sammel, M.D., Liu, L., Gracia, C.R., Nelson, D.B., Hollander, L., 2004. Hormones and menopausal status as predictors of depression in women in transition to menopause. *Arch Gen Psychiatry.* 61, 62-70.

Freeman, L.N., Shaffer, D., Smith, H., 1996. Neglected victims of homicide: the needs of young siblings of murder victims. *Am J Orthopsychiatry.* 66, 337-345.

Freichel, C., Potschka, H., Ebert, U., Brandt, C., Löscher, W., 2006. Acute changes in the neuronal expression of GABA and glutamate decarboxylase isoforms in the rat piriform cortex following status epilepticus. *Neuroscience.* 141, 2177-2194.

Frye, C.A., Bayon, L.E., 1999. Mating stimuli influence endogenous variations in the neurosteroids 3alpha,5alpha-THP and 3alpha-Diol. *J Neuroendocrinol.* 11, 839-847.

Frye, C.A., Petralia, S.M., Rhodes, M.E., 2000. Estrous cycle and sex differences in performance on anxiety tasks coincide with increases in hippocampal progesterone and 3 α ,5 α -THP. *Pharmacol Biochem Behav.* 67,587-596.

Frye, C.A., Walf, A.A., 2002. Changes in progesterone metabolites in the hippocampus can modulate open field and forced swim test behavior of proestrous rats. *Horm Behav.* 41, 306-315.

Frye, C.A., Walf, A.A., 2004. Hippocampal 3 α ,5 α -THP may alter depressive behavior of pregnant and lactating rats. *Pharmacology Biochemistry and Behavior.* 78, 531-554.

Frye, C.A., Wawrzycki, J., 2003. Effect of prenatal stress and gonadal hormone condition on depressive behaviors of female and male rats. *Horm Behav.* 44, 319-326.

Frye, C.A., Walf, A.A., Rhodes, M.E., Harney, J.P., 2004. Progesterone enhances motor, anxiolytic, analgesic, and antidepressive behavior of wild-type mice, but not those deficient in type 1 5 α -reductase. *Brain Res.* 1004,116-124.

Galaburda, A.M., Lemay, M., Kemper, T.L., Geschwind, N., 1978. Right-left asymmetries in the brain. *Science.* 199, 852–856.

Gavin, N.I., Gaynes, B.N., Lohr, K.N., Meltzer-Brody, S., Gartlehner, G., Swinson, T., 2005. Perinatal depression: a systematic review of prevalence and incidence. *Obstet. Gynecol.* 106, 1071–1083.

Gerdeman, G.L., Partridge, J.G., Lupica, C.R., Lovinger, D.M., 2003. It could be habit forming: drugs of abuse and striatal synaptic plasticity. *Trends Neurosci.* 26, 184-192.

Gomez, R., Barros, H.M., 2000. Ethopharmacology of the antidepressant effect of clonazepam in diabetic rats. *Pharmacol Biochem Behav.* 66, 329-335.

Gorman, J.M., 2006. Gender differences in depression and response to psychotropic medication. *Gend Med.* 3,93-109.

Gorwood, P., 2008. Neurobiological mechanisms of anhedonia. *Dialogues Clin Neurosci* 10, 291-299.

Griffiths, J.L., Lovick, T.A., 2005. GABAergic neurones in the rat periaqueductal grey matter express alpha4, beta1 and delta GABAA receptor subunits: plasticity of expression during the estrous cycle. *Neuroscience.* 136,457-466.

Gruen, R.J., Wenberg, K., Elahi, R., Friedhoff, A.J., 1995. Alterations in GABAA receptor binding in the prefrontal cortex following exposure to chronic stress. *Brain Res.* 684,112-114.

Guarneri, P., Guarneri, R., La Bella, V., Scondotto, S., Scoppa, F., Piccoli, F., 1988. Lateral differences in GABA binding sites in rat brain. *Neurochem Res.* 13, 209-211.

Gulinello, M., Orman, R., Smith, S.S., 2003. Sex differences in anxiety, sensorimotor gating and expression of the alpha4 subunit of the GABAA receptor in the amygdala after progesterone withdrawal. *Eur J Neurosci.* 17, 641-648.

Hajek, T., Gunde, E., Slaney, C., Propper, L., MacQueen, G., Duffy, A., Alda, M., 2009. Striatal volumes in affected and unaffected relatives of bipolar patients-high-risk study. *Psychiatr Res.* 43,724-729.

Halbreich, U., 2003. The etiology, biology, and evolving pathology of premenstrual syndromes. *Psychoneuroendocrinology.* 28; Suppl 3, 55-99.

Harrison, N.L., Majewska, M.D., Harrington, J.W., Barker, J.L., 1987. Structure-activity relationships for steroid interaction with the gamma-aminobutyric acidA receptor complex. *J Pharmacol Exp Ther.* 241, 346-353.

Henkel, V., Bussfeld, P., Moller, H.J., Hegerl, U., 2002. Cognitive-behavioural theories of helplessness/hopelessness: valid models of depression? *Eur Arch Psychiatry Clin Neurosci.* 252,240-249.

Herd, M.B., Belelli, D., Lambert, J.J., 2007. Neurosteroid modulation of synaptic and extrasynaptic GABA(A) receptors. *Pharmacol Ther.* 116, 20-34.

Hevers, W., Lüddens, H., 1998. The diversity of GABAA receptors. Pharmacological and electrophysiological properties of GABAA channel subtypes. *Mol Neurobiol.* 18,35-86.

Huang, C.C., Wei, I.H., Chou, Y.H., Su, T.P., 2008. Effect of age, gender, menopausal status, and ovarian hormonal level on rTMS in treatment-resistant depression. *Psychoneuroendocrinology*. 33, 821-831.

Jacob, M.H.V.M., Janner, D.R., Bello-Klein, A., Llesuy, S.F., Ribeiro, M.F.M., 2008. Dehydroepiandrosterone modulates antioxidant enzymes and Akt signaling in healthy Wistar rat hearts. *J Steroid Biochem Mol Biol* 112 , 138–144.

Jaracz, J., 2008. The anatomy of depression in light of evidence from neuroimaging studies. *Psychiatr Pol* 42, 875-888.

Joffe, H., Petrillo, L.F., Viguera, A.C., Gottshcall, H., Soares, C.N., Hall, J.E., Cohen, L.S., 2007. Treatment of premenstrual worsening of depression with adjunctive oral contraceptive pills: a preliminary report. *J Clin Psychiatry*. 68,1954-1962.

Kang, I., Thompson, M.L., Heller, J., Miller, L.G., 1991. Persistent elevation in GABAA receptor subunit mRNAs following social stress. *Brain Res Bull*. 26, 809-812.

Kaur, G., Kulkarni, S.K., 2002. Evidence for serotonergic modulation of progesterone-induced hyperphagia, depression and algesia in female mice. *Brain Res*. 943, 206-215.

Kawaguchi, Y., Wilson, C.J., Augood, S.J., Emson, P.C., 1995. Striatal interneurons: chemical, physiological and morphological characterization. *Trends Neurosci*. 18, 527-535.

Kennet, G.A., Chaouloff, F., Marcou, M., Cruzon, G., 1986. Female rats are more vulnerable than males in an animal model of depression: the possible role of serotonin. *Brain Res.* 382, 416-421.

Kessler, R.C., Mcgonagle, K.A., Zhao, S., Nelson, C.B., Hughes, M., Eshleman, S., Wittchen, H.U., Kendler, K.S., 1994. Life-time and 12 month prevalence of DSM-iii-r psychiatric disorders in the United States. *Arch Gen Psychiatry.* 51:8-19.

Khisti, R.T., Chopde, C.T., Jain, S.P., 2000. Antidepressant-like effect of the neurosteroid 3alpha-hydroxy-5alpha-pregnan-20-one in mice forced swim test. *Pharmacol Biochem Behav.* 67, 137-143.

Kim, H., Lim S.W., Kim, S., Kim, J.W., Chang, Y.H., Carroll, B.J., Kim, D.K., 2006. Monoamine Transporter Gene Polymorphisms and Antidepressant Response in Koreans With Late-Life Depression. *JAMA.* 296,1609-1618.

Kittler, J.T., Chen, G., Kukhtina, V., Vahedi-Faridi, A., Gu, Z., Tretter, V., Smith, K.R., McAinsh, K., Arancibia-Carcamo, I.L., Saenger, W., Haucke, V., Yan, Z., Moss, S.J., 2008. Regulation of synaptic inhibition by phospho-dependent binding of the AP2 complex to a YECL motif in the GABAA receptor gamma2 subunit. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 105, 3616-3621.

Klatzkin, R.R., Morrow, A.L., Light, K.C., Pedersen, C.A., Girdler, S.S., 2006. Histories of depression, allopregnanolone responses to stress, and premenstrual symptoms in women. *Biol Psychol.* 71, 2-11.

Klein, A.E., Rocci, M.L. Jr., 1995. GMP criteria for retest and failure analysis. Handling out-of-specification results in the pharmaceutical quality control laboratory. *Qual Assur.* 4, 247-251.

Kokras, N., Antoniou, K., Polissidis, A., Papadopoulou-Daifoti, Z., 2009. Antidepressants induce regionally discrete, sex-dependent changes in brain's glutamate content. *Neurosci Lett.* 464, 98-102.

Kralic, J.E., Korpi, E.R., O'buckley, T.K., Homanics, G.E., Morrow, A.L., 2002. Molecular and pharmacological characterization of GABA(A) receptor alpha1 subunit knockout mice. *J Pharmacol Exp Ther.* 302,1037-1045.

Kulkarni, J. 2007. Depression as a side effect of the contraceptive pill. *Expert Opin Drug Saf.* 6, 371-374.

Laemmli, U.K., 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227, 680–685.

[Leuner, B.](#), [Mendolia-Loffredo, S.](#), [Shors, T.J.](#), 2004. Males and females respond differently to controllability and antidepressant treatment. [Biol Psychiatry.](#) 15;56, 964-970.

Levy-Cooperman, N., Burhan, A.M., Rafi-Tari, S., Kusano, M., Ramirez, J., Caldwell, C., Black, S.E., 2008. Frontal lobe hypoperfusion and depressive symptoms in Alzheimer disease. *J Psychiatry Neurosci.* 33, 218-226.

Maier, S.F., Amat, J., Baratta, M.V., Paul, E., Watkins, L.R., 2006. Behavioral control, the medial prefrontal cortex, and resilience. *Dialogues Clin Neurosci.* 8, 397-406.

Lovick, T.A., 2006. Plasticity of GABAA receptor subunit expression during the oestrous cycle of the rat: implications for premenstrual syndrome in women. *Exp Physiol.* 91, 655-660.

Lovick, T.A., 2008. GABA in the female brain -- oestrous cycle-related changes in GABAergic function in the periaqueductal grey matter. *Pharmacol Biochem Behav.* 90, 43-50.

Lucki, I., 1997. The forced swimming test as a model for core and component behavioral effects of antidepressant drugs. *Behav Pharmacol.* 8, 523-532.

Majewska, M.D., Harrison, N.L., Schwartz, R.D., Barker, J.L., Paul, S.M., 1986. Steroid hormone metabolites are barbiturate-like modulators of the GABA receptor. *Science.* 232,1004-1007.

Martijena, I.D., Rodríguez, Mandanares, P.A., Lacerra, C., Molina, V.A., 2002. Gabaergic modulation of the stress response in frontal cortex and amygdala *Synapse.* 45,86-94.

Martínez-Mota, L., Contreras, C.M., Saavedra, M., 1999. Progesterone reduces immobility in rats forced to swim. *Arch Med Res.* 30, 286-289.

Marvan, M.L., Santana, S., Chavez, L., Bertran, M., 1997. Inescapable shocks accentuate fluctuations of forced swimming immobility in different phases of the rat estrous cycle. Arch Med Res. 28, 369-372.

[Matsumoto, K.](#), [Puia, G.](#), [Dong, E.](#), [Pinna, G.](#), 2007. GABA(A) receptor neurotransmission dysfunction in a mouse model of social isolation-induced stress: possible insights into a non-serotonergic mechanism of action of SSRIs in mood and anxiety disorders. Stress. 10, 3-12

Mcglinchey, J.B., Zimmerman, M., Young, D., Chelminski, I., 2006. Diagnosing major depressive disorder VIII: are some symptoms better than others? J Nerv Ment Dis. 194,785-790.

Merali, Z., Du, L., Hrdina, P., Palkovits, M., Faludi, G., Poulter, M.O., Anisman, H., 2004. Dysregulation in the suicide brain: mRNA expression of corticotropin-releasing hormone receptors and GABA(A) receptor subunits in frontal cortical brain region. J Neurosci. 24,1478-1485.

Minier, F., Sigel, E., 2004. Positioning of the alpha-subunit isoforms confers a functional signature to gamma-aminobutyric acid type A receptors. Proc Natl Acad Sci USA 101,7769–7774.

Ministério da Saúde – Dados epidemiológicos. Disponível em: <http://portal.saude.gov.br/saude> . Acesso em: 08 de set. 2009.

Mody, I., 2008. Extrasynaptic GABAA receptors in the crosshairs of hormones and ethanol. Neurochem Int. 52, 60-64.

Molina-Hernández, M., Téllez-Alcántara, N.P., 2001. Antidepressant-like actions of pregnancy, and progesterone in Wistar rats forced to swim. *Psychoneuroendocrinology*. 26, 479-491.

Molodtsova, G.F., 2001. Effects of sex factors and hemispheric localization on the involvement of serotonin from the frontal cortex, striatum, and nucleus accumbens into the processing of novel and repeatedly presented information in rats. *Zh Vyssh Nerv Deiat Im I P Pavlova*. 51,56-60.

Nin, M.S., Salles, F.B., Azeredo, L.A., Frazon, A.P., Gomez, R., Barros, H.M., 2008. Antidepressant effect and changes of GABAA receptor gamma2 subunit mRNA after hippocampal administration of allopregnanolone in rats. *J Psychopharmacol*. 22,477-485.

Olsen, R.W., Hanchar, H.J., Meera, P., Wallner, M. 2007. GABAA receptor subtypes: the "one glass of wine" receptors. *Alcohol*. 41,201-209.

Orchinik, M., Weiland, N.G., Mcewen, B.S., 1995. Chronic exposure to stress levels of corticosterone alters GABAA receptor subunit mRNA levels in rat hippocampus. *Brain Res Mol Brain Res*. 34, 29-37.

Parashos, I.A., Tupler, L.A., Blitchington, T., Krishnan, K.R.R., 1998. Magnetic-resonance morphometry in patients with major depression. *Psychiatry Res.: Neuroimaging* 84, 7–15.

Paré, W.P., Redei, E., 1993. Sex differences and stress response of WKY rats. *Physiol Behav*. 54, 1179-1185.

Parmigiani, S., Palanza, P., Rogers, J., Ferrari, P.F., 1999. Selection, evolution of behavior and animal models in behavioral neuroscience. *Neurosci Biobehav Ver.* 23, 957-969.

Parry, B.L., 2008. Perimenopausal depression. *Am J Psychiatry.* 165:23-27.

Peluso, E.T., Blay, S.L., 2008. Public perception of depression in the city of São Paulo. *Rev Saude Publica.* 42, 41-48.

[Pinna, G.](#), [Costa, E.](#), [Guidotti, A.](#), 2006. Fluoxetine and norfluoxetine stereospecifically and selectively increase brain neurosteroid content at doses that are inactive on 5-HT reuptake. [Psychopharmacology \(Berl\).](#) 186, 362-372.

Pirker, S., Schwarzer, C., Wieselthaler, A., Sieghart, W., Sperk, G., 2000. GABA(A) receptors: immunocytochemical distribution of 13 subunits in the adult rat brain. *Neuroscience.* 101,815-850.

Pisani, A., Centonze, D., Bernardi, G., Calabresi, P., 2005. Striatal synaptic plasticity: implications for motor learning and Parkinson's disease. *Mov Disord.* 20, 395-402.

Plassart-Schiess, E., Baulieu, E.E., 2001. Neurosteroids: recent findings. *Brain Res Rev.* 37,133-140.

Pluchino, N., Luisi, M., Lenzi, E., Centofanti, M., Begliuomini, S., Freschi, L, Ninni, F., Genazzani, A.R., 2006. Progesterone and progestins: effects on brain, allopregnanolone and beta-endorphin. *J Steroid Biochem Mol Biol.* 102, 205-213.

Porsolt, R.D., Le Pichon, M., Jalfre, M. 1977. Depression: a new animal model sensitive to antidepressant treatments. *Nature*. 266, 730-732.

Poulter, M.O., DU, D., Zhurov, V., Merali, Z., Anisman, H., 2010. Plasticity of the GABAA receptor subunit cassette in response to stressors in reactive versus resilient mice. *Neuroscience*. 165,1039-1051.

Radley, J.J., Gosselink, K.L., Sawchenko, P.E., 2009. A discrete GABAergic relay mediates medial prefrontal cortical inhibition of the neuroendocrine stress response. *J Neurosci*. 29, 7330-7340.

Rapkin, A.J., Sorger, S.N., Winer, S.A., 2008. Drospirenone/ethinyl estradiol. *Drugs Today (Barc)*. 44, 133-145.

Rapkin, A.J., Winer, S.A., 2009. Premenstrual syndrome and premenstrual dysphoric disorder: quality of life and burden of illness. *Expert Rev Pharmacoecon Outcomes Res*. 9, 157-170.

Reddy, D.S., Kaur, G., Kulkarni, S.K., 1998. Sigma (sigma1) receptor mediated anti-depressant-like effects of neurosteroids in the Porsolt forced swim test. *Neuroreport*. 9, 3069-3073.

Robel, P., Young, J., Corpéchet, C., Mayo, W., Perché, F., Haug, M., Simon, H., Baulieu, E.E., 1995. Biosynthesis and assay of neurosteroids in rats and mice: functional correlates. *J Steroid Biochem Mol Biol*. 53,355-360.

Rotenberg, V.S., 2008. Functional brain asymmetry as a determinative factor in the treatment of depression: theoretical implications. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*. 32,1772-1777.

Rouillon, F., 2008. Epidemiology of mood disorders. *Rev Prat*. 58,361-365.

Saavedra, M., Contreras, C.M., Azamar-Arizmendi, G., Hernández-Lozano, M., 2006. Differential progesterone effects on defensive burying and forced swimming tests depending upon a gradual decrease or an abrupt suppression schedules. *Pharmacol Biochem Behav*. 83,130-135.

Saeed, S., Bano, S., 2007. Inhibition of tryptophan pyrrolase activity in restraint female rats following medroxyprogesterone administration. *J Coll Physicians Surg Pak*. 17, 63-68.

Sanna, E., Mostallino, M.C., Murru, L., Carta, M., Talani, G., Zucca, S., Mura, M.L., Maciocco, E., Biggio, G., 2009. Changes in expression and function of extrasynaptic GABAA receptors in the rat hippocampus during pregnancy and after delivery. *J Neurosci* 29, 1755-1765.

Schmidt, P.J., Haq, N., Rubinow, D.R., 2004. A longitudinal evaluation of the relationship between reproductive status and mood in perimenopausal women. *Am J Psychiatry*. 161, 2238-2244.

Schultz, W., Tremblay, L., Hollerman, J.R., 2003. Changes in behavior-related neuronal activity in the striatum during learning. *Trends Neurosci*. 26, 321-328.

Schumacher, M., Akwa, Y., Guennoun, R., Robert, F., Labombarda, F., Desarnaud, F., Robel, P., De Nicola, A.F., Baulieu, E.E., 2000. Steroid synthesis and metabolism in the nervous system: trophic and protective effects. *J Neurocytol.* 29, 307-326.

Seligman, M.E., 1972. Learned helplessness. *Annu. Rev. Med.* 23, 407-412.

Serretti, A., Macciardi, F., Cusin, C., Lattuada, E., Lilli, R., Di Bella, D., Catalano, M., Smeraldi, E., 1998. GABAA alpha-1 subunit gene not associated with depressive symptomatology in mood disorders. *Psychiatr Genet.* 8, 251-254.

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

Sieghart, W., Sperk, G., 2002. Subunit composition, distribution and function of GABA(A) receptor subtypes. *Curr. Top. Med. Chem.* 2, 795–816

Sigel, E., Baur R., Boulineau, N., Minier, F., 2006. Impact of subunit positioning on GABAA receptor function. *Biochem. Soc. Trans.* 34, 868–871

Spronk, D., Arns, M., Bootsma, A., van, Ruth, R., Fitzgerald, P.B., 2008. Long-term effects of left frontal rTMS on EEG and ERPs in patients with depression. *Clin EEG Neurosci.* 39, 118-124.

Stahl, S.M., 2000. *Psicofarmacologia – Depressão e Transtornos Bipolares.* Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 180 p.

Starkman, M.N., Giordani, B., Gebarski, S.S., Schteingart, D.E., 2007. Improvement in mood and ideation associated with increase in right caudate volume. *J Affect Disord.* 101,139-147.

Steele, J.D., Kumar, P., Ebmeier, K.P., 2007. Blunted response to feedback information in depressive illness. *Brain.* 130,2367-2374.

Steiner M, Dunn E, Born L. Hormones and mood: from menarche to menopause and beyond. *J Affect Disord* 2003;74:67-83.

Stevenson, C.W., Halliday, D.M., Marsden, C.A., Mason, R., 2008. Early life programming of hemispheric lateralization and synchronization in the adult medial prefrontal cortex. *Neuroscience* 155, 852-863.

Stoffel, E.C., Craft, R.M., 2004. Ovarian hormone withdrawal-induced "depression" in female rats. *Physiol Behav.* 83, 505-513.

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

Strekalova, T., Spanagel, R., Bartsch, D., Henn, F.A., Gass, P., 2004. Stress-induced anhedonia in mice is associated with deficits in forced swimming and exploration. *Neuropsychopharmacology.* 29, 2007-2017.

Sundstrom Poromaa, I., Smith, S., Gulinello, M., 2003. GABA receptors, progesterone and premenstrual dysphoric disorder. *Arch Womens Ment Health.* 6, 23-41.

Takahashi, T., Yücel, M., Lorenzetti, V., Tanino, R., Whittle, S., Suzuki, M., Walterfang, M., Pantelis, C., Allen, N.B., 2009. Volumetric MRI study of the insular cortex in individuals with current and past major depression. *J Affect Disord.* Jun 18 [epub ahead of print],

Thiel, C.M., Schwarting, R.K., 2001. Dopaminergic lateralisation in the forebrain: relations to behavioural asymmetries and anxiety in male Wistar rats. *Neuropsychobiology.* 43, 192-129.

Tranel, D., Bechara, A., Denburg, N.L., 2002. Asymmetric functional roles of right and left ventromedial prefrontal cortices in social conduct, decision-making and emotional processing. *Cortex* 38, 589-612.

Tranel, D., Damasio, H., Denburg, N.L., Bechara, A., 2005. Does gender play a role in functional asymmetry of ventromedial prefrontal cortex? *Brain* 128, 2872–2881.

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

Tunnicliff, G., Malatynska, E., 2003. Central GABAergic systems and depressive illness. *Neurochem Res.* 28,965-976.

van Rossum, E.F., Binder, E.B., Majer, M., Koper, J.W., Ising, M., Modell, S., Salyakina, D., Lamberts, S.W., Holsboer, F., 2006. Polymorphisms of the glucocorticoid receptor gene and major depression. *Biol Psychiatry.* 15;59, 681-688.

Walf, A.A., Sumida, K., Frye, C.A., 2006. Inhibiting 5alpha-reductase in the amygdala attenuates antianxiety and antidepressive behavior of naturally receptive and hormone-primed ovariectomized rats. *Psychopharmacology (Berl)*.186, 302-311.

Wallner, M., Hanchar, H.J., Olsen, R.W., 2003. Ethanol enhances alpha 4 beta 3 delta and alpha 6 beta 3 delta gamma-aminobutyric acid type A receptors at low concentrations known to affect humans. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 100, 15218-15223.

Weiland, N.G., Orchinik, M., 1995. Specific subunit mRNAs of the GABAA receptor are regulated by progesterone in subfields of the hippocampus. *Brain Res Mol Brain Res*. 32,271-278

Weissman, M.M., Bland, R.C., Canino, G.J., Faravelli, C., Greenwald, S., Hwu, H.G., Joyce, P.R., Karam, E.G., Lee, C.K., Lellouch, J., Lepine, J.P., Newman, S.C., Rubio-Stipec, M., Wells, J.E., Wickramaratne, P.J., Wittchen, H., Yeh, E.K., 1996. Cross-national epidemiology of major depression and bipolar disorder. *JAMA*. 276, 293-239.

Whittle, S., Chanen, A.M., Fornito, A., McGorry, P.D., Pantelis, C., Yücel, M., 2009. Anterior cingulate volume in adolescents with first-presentation borderline personality disorder. *Psychiatry Res*. 172, 155-160.

Willner, P., 1984. The validity of animal models of depression. *Psychopharmacology*, 3, 1-16.

Wohlfarth, K.M., Bianchi, M.T., Macdonald, R.L., 2002. Enhanced neurosteroid potentiation of ternary GABA(A) receptors containing the delta subunit. *J Neurosci.* 22, 1541-1549.

Yang, Y., Li, W., Zhu, B., Liu, Y., Yang, B., Wang, H., Wang, Z., 2007. Sex differences in antidepressant-like effect of chronic repetitive transcranial magnetic stimulation in rats. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* 31, 735-740.

Yonkers, K.A., O'Brien, P.M., Eriksson, E., 2008. Premenstrual syndrome. *Lancet.* 371, 1200-1210.

Yu, Y.W., Tsai, S.J., Chen, T.J., Lin, C.H., Hong, C.J., 2002. Association study of the serotonin transporter promoter polymorphism and symptomatology and antidepressant response in major depressive disorders. *Mol Psychiatry.* 7, 1115-1119.

Zanardi, R., Rossini, D., Magri, L., Malaguti, A., Colombo, C., Smeraldi, E., 2007. Response to SSRIs and role of the hormonal therapy in post-menopausal depression. *Eur Neuropsychopharmacol.* 17, 400-405.

Zheng, G., Zhang, X., Chen, Y., Zhang, Y., Luo, W., Chen, J., 2007. Evidence for a role of GABAA receptor in the acute restraint stress-induced enhancement of spatial memory. *Brain Res.* 1181,61-73.