

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

CARINA DE SOUZA MOTA

ALTERAÇÕES MITOCONDRIAIS EM CÉLULAS NEURAIS EM RESPOSTA À  
ADAPTAÇÃO AO ESTRESSE

PORTO ALEGRE – RS

2017

ALTERAÇÕES MITOCONDRIAIS EM CÉLULAS NEURAIS EM RESPOSTA À  
ADAPTAÇÃO AO ESTRESSE

Orientadora: Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Fátima Therezinha Costa Guma

Co-Orientadora: Dr<sup>a</sup> Letícia Ferreira Pettenuzzo

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Bioquímica da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, como requisito parcial à obtenção do Grau de Doutor em Ciências Biológicas: Bioquímica.

Porto Alegre – RS

2017

### CIP - Catalogação na Publicação

Mota, Carina de Souza

Alterações mitocondriais em células neurais em resposta à adaptação ao estresse / Carina de Souza Mota. -- 2017.

59 f.

Orientadora: Fatima Theresinha C. Rodrigues Guma.

Coorientadora: Letícia Ferreira Pettenuzzo.

Tese (Doutorado) -- Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Bioquímica, Porto Alegre, BR-RS, 2017.

1. Mitocôndria. 2. Cadeia transportadora de elétrons. 3. Sinaptossomas. 4. Receptores de glicocorticóides. I. C. Rodrigues Guma, Fatima Theresinha, orient. II. Ferreira Pettenuzzo, Letícia, coorient. III. Título.

# SUMÁRIO

SUMÁRIO.....	1
RESUMO .....	2
ABSTRACT .....	3
ABREVIATURAS.....	4
PARTE I: INTRODUÇÃO E OBJETIVOS.....	5
INTRODUÇÃO .....	6
Mitocôndria.....	6
Estresse e Receptores de Glicocorticóides.....	10
Dimorfismo e Estresse.....	12
Dexametasona.....	13
Neuroblastoma.....	14
OBJETIVOS .....	15
JUSTIFICATIVA E OBJETIVO GERAL .....	15
OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	16
PARTE II: MATERIAL, MÉTODOS E RESULTADOS.....	17
CAPÍTULO I .....	18
Artigo científico .....	18
CAPÍTULO II .....	29
OBJETIVOS .....	30
MATERIAL E MÉTODOS .....	30
RESULTADOS .....	32
CAPÍTULO III .....	34
OBJETIVOS .....	35
MATERIAL E MÉTODOS .....	35
RESULTADOS .....	38
PARTE III: DISCUSSÃO E CONCLUSÕES .....	42
DISCUSSÃO .....	43
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	52

## RESUMO

O estresse é uma resposta não específica do organismo a ameaças à sua homeostase e o estresse crônico parece contribuir para o desenvolvimento de diversas patologias. Em situações estressantes são liberados glicocorticóides (GCs) pelo córtex adrenal, os quais se ligam aos receptores de glicocorticóides (RGs) para exercer suas ações. As mitocôndrias são organelas com diversas funções, dentre elas, a geração de energia na célula. Nos neurônios elas são essenciais para a função sináptica e sobrevivência neuronal, e podem ser encontradas tanto no corpo quanto na região sináptica. Uma vez que os GCs estão envolvidos na expressão de proteínas mitocondriais, alterações nos níveis de GCs ou RGs podem afetar as mitocôndrias e, conseqüentemente, a célula como um todo. Nessa tese, o foco de estudo foram as alterações que os GCs podem provocar na mitocôndria do sistema nervoso. No **Capítulo I** desta tese foi investigado os efeitos do estresse crônico por contenção sobre a cadeia respiratória mitocondrial e o conteúdo de RGs, de estriado, hipocampo e córtex de ratos machos e fêmeas, bem como a massa mitocondrial (MM) e o potencial de membrana mitocondrial (PMM) em dissociado de células e sinaptossomas destas mesmas estruturas cerebrais. Foi verificado que a resposta ao estresse envolveu alterações mitocondriais de forma sexo-específica, porém, não foi possível esclarecer se houve alteração na quantidade de mitocôndrias nestas respostas ao estresse. No **Capítulo II** estudamos se a ativação direta dos RGs com doses não tóxicas de dexametasona (DEX) provocaria alteração na quantidade de mitocôndrias em curto prazo. Para isso, células SH-SY5Y diferenciadas com ácido retinóico, que são corriqueiramente utilizadas como modelo neuronal, foram tratadas por 24 ou 48 horas com diferentes doses não tóxicas de DEX e foram avaliados MM e PMM. A DEX *per se* não afetou, em nenhuma dose ou tempo de tratamento, nem a MM, nem o PMM das células SH-SY5Y diferenciadas, portanto, nos tempos e doses testadas, não altera a quantidade de mitocôndrias. No **Capítulo III** testamos os efeitos de altas doses de corticosterona (CORT) por um período mais longo, *in vivo* permitindo assim adaptações do animal. As estruturas analisadas foram hipocampo e estriado de camundongos machos, e as análises foram realizadas em células totais e sinaptossomas. Também testamos o efeito da diminuição dos GCs no cérebro utilizando um modelo hipocorticoide com DEX. O tratamento com DEX aumentou a MM e PMM de células totais, MM de neurônios e PMM de sinaptossomas de hipocampo; em estriado, reduziu a MM. O tratamento com CORT aumentou MM e PMM de sinaptossomas de estriado. Portanto, neste capítulo verificamos que a depleção dos GCs com DEX gerou aumento na quantidade de mitocôndrias no hipocampo demonstrada pelos aumentos na MM e PMM. Esse aumento na quantidade de mitocôndrias no corpo celular se refletiu também em um aumento na quantidade de mitocôndrias nos sinaptossomas. Com esse estudo concluímos que os principais efeitos do estresse sobre as mitocôndrias neuronais parecem ocorrer por diminuição da sensibilidade aos GCs e não pela presença de altas doses do hormônio. Essas alterações parecem ser adaptativas, favorecendo o manejo do estresse pelo animal, porém são necessários mais estudos para avaliar se, a mais longo prazo, essas adaptações continuam ocorrendo e como essas células adaptadas irão responder a insultos.

## ABSTRACT

Stress is a non-specific response to factors that threatens homeostasis and chronic stress seems to contribute to the development of several pathologies. In stressful situations, adrenal cortex releases glucocorticoids (GCs) which bind to glucocorticoid receptors (RGs) to exert their actions. Mitochondria are organelles with several functions, among them, the energy generation in the cell. In neurons they are essential for synaptic function and neuronal survival, and can be found in both the body and the synaptic region. Since GCs are involved in mitochondrial protein expression, changes in GCs or RGs may affect mitochondria and, consequently, the cell as a whole. In this thesis our focus was the changes that GCs can cause in the mitochondria present in the nervous system. In Chapter I we investigated the effects of chronic restraint stress on the mitochondrial respiratory chain and the RG content in striatum, hippocampus and cortex of male and female rats, as well as mitochondrial mass (MM) and mitochondrial membrane potential (PMM) in dissociated cells and synaptosomes in these same brain structures. It was verified that the stress response involved mitochondrial alterations in a sex-specific way; however, it was not possible to clarify if there was alteration in mitochondria quantity in these stress responses. In Chapter II we studied whether the direct RG activation with non-toxic doses of dexamethasone (DEX) would cause in short term changes in the mitochondrial amount. For this, retinoic acid-differentiated SH-SY5Y cells, which are commonly used as neuronal model, were treated for 24 or 48 hours with different non-toxic doses of DEX and were evaluated MM and PMM. DEX *per se* did not affect, at any dose or time of treatment, either MM or PMM of differentiated SH-SY5Y cells, therefore at the times and doses tested it does not alter the mitochondrial amount. In Chapter III we tested the effects of high doses of corticosterone (CORT) for a longer period, *in vivo* thus allowing animal adaptations to GC. We analyzed male mice's hippocampus and striatum, and analyzes were performed on total cells and synaptosomes. We also tested the effect of GC decrease in the brain using a hypocortisoid model with DEX. Treatment with DEX increased the MM and PMM of total cells, MM of neurons and in PMM of hippocampal synaptosomes; in striatum, MM was reduced. Treatment with CORT increased synaptosomal MM and PMM in striatum. Therefore, in this chapter we verified that GCs depletion with DEX generated an increase in the mitochondrial amount in hippocampus demonstrated by increases in MM and PMM. This increase in the amount of mitochondria in the cell body was also reflected in an increase in the synaptosomal amount of mitochondria. With this study we conclude that the main effects of stress on neuronal mitochondria seem to occur due to decreased sensitivity to GCs and not to high doses of the hormone. These changes appear to be adaptive, favoring animal stress management, but further studies are needed to assess whether these adaptations continue to occur in the longer term and how these adapted cells will respond to insults.

## **ABREVIATURAS**

DP - Doença de Parkinson

DA - Doença de Alzheimer

DH - Doença de Huntington

HPA - Sistema hipotálamo-pituitária-adrenal

NPH - Núcleo paraventricular hipotalâmico

HLC - Hormônio liberador de corticotropina

AVP - Arginina vasopressina

RG - Receptor de Glicocorticóide

GC – Glicocorticóide

DEX – Dexametasona

CORT – Corticosterona

MM – Massa Mitocondrial

PMM – Potencial de Membrana Mitocondrial

MTR - Mitotracker Red

MTG - Mitotracker Green

ECC – Estresse crônico por Contenção

## **PARTE I: INTRODUÇÃO E OBJETIVOS**

Introdução, Justificativa, Objetivos gerais e específicos.



# INTRODUÇÃO

## Mitocôndria

Mitocôndrias são organelas essenciais, de herança materna, móveis e dinâmicas, encontradas em todas as células eucarióticas e desempenham um papel fundamental na morte celular, dinâmica do cálcio e na geração de energia e radicais livres (Flippo e Strack, 2017-a; Todorova e Blokland, 2017). As mitocôndrias consistem em duas membranas - as membranas mitocondriais interna e externa -, espaço intermembranas e matriz mitocondrial. As membranas mitocondriais apresentam diferentes propriedades. Sob condições fisiológicas, a membrana interna é impermeável, dificultando a passagem de íons e depende de proteínas de transporte específicas para regular a passagem de metabólitos, enquanto a membrana externa é permeável devido à presença de proteínas integrais conhecidas como porinas (Hu et al, 2017; Todorova e Blokland, 2017). Uma das principais funções da mitocôndria é a geração de energia na forma de ATP, pelo fluxo de elétrons através dos complexos mitocondriais da cadeia transportadora de elétrons (I, II, III e IV) e dois carreadores de elétrons, ubiquinona/CoQ e citocromo c, os quais transferem elétrons de doadores com baixo potencial redox a aceptores com maior potencial redox (Todorova e Blokland, 2017). Este fluxo de elétrons forma um gradiente eletroquímico de prótons, gerado através da redução dos elétrons através da cadeia transportadora de elétrons, e exerce a força próton-motriz utilizada para produzir ATP (Perry et al, 2011).

A cadeia transportadora de elétrons presente na membrana mitocondrial interna é constituída por quatro complexos por onde os elétrons fluem, gerando força próton motriz para a produção final de ATP. O complexo I (NADH-ubiquinona oxidoreductase) da cadeia respiratória catalisa o primeiro estágio da fosforilação oxidativa, a oxidação do NADH pela

ubiquinona, acoplado esta reação com o transporte ativo de prótons através da membrana mitocondrial (Zorov et al, 2014). O complexo II (Succinato: ubiquinona oxidoreductase) comumente conhecido como succinato-desidrogenase, catalisa a oxidação do succinato a fumarato no ciclo do ácido cítrico e doa os elétrons à quinona na membrana, reduzindo-a a ubiquinol (Zorov et al, 2014). O complexo III (citocromo  $bc_1$ ) recebe os equivalentes redutores dos complexos I e II, ou seja, catalisa a transferência de elétrons do ubiquinol ao citocromo *c*, que é acoplado a translocação de prótons (Midzak e Papadopoulos, 2016). Neste processo é gerada uma semi-quinona instável na parte externa da membrana mitocondrial interna, porém, sob condições normais, a probabilidade de formação desta semi-quinona é baixa, devido à sua rápida oxidação (Zorov et al, 2014). O complexo IV (citocromo *c* oxidase) doa elétrons do citocromo *c* para o oxigênio molecular produzindo água (Midzak e Papadopoulos, 2016).

As mitocôndrias são fundamentais para a função neuronal devido à capacidade glicolítica limitada dos neurônios, que os deixa altamente dependentes da fosforilação oxidativa para suprir suas necessidades energéticas (Moreira et al, 2010; Flippo e Strack, 2017-b). Além da geração de energia, estas organelas também estão envolvidas com a síntese e degradação de neurotransmissores, regulação e controle das concentrações de cálcio, a sinalização redox e o controle de vias de apoptose, através do controle da dinâmica de cálcio e geração de radicais livres (Todorova e Blokland, 2017).

A mitocôndria se apresenta em diferentes localizações ou subcompartimentos celulares. Nos neurônios as mitocôndrias podem ser sinápticas e não sinápticas, ambas essenciais para a manutenção da função, crescimento e sobrevivência neuronais (Flippo e Strack, 2017-a). As mitocôndrias sinápticas são mais vulneráveis a dano oxidativo (Völgyi et al, 2015) e ao insulto por cálcio durante o envelhecimento do que as mitocôndrias não-sinápticas. No estudo conduzido por Stauch e colaboradores (2014), em comparação com as

mitocôndrias não-sinápticas, as mitocôndrias sinápticas apresentaram maior número de deleções de DNA mitocondrial associadas ao envelhecimento e redução da função bioenergética.

Dependendo das demandas celulares é fundamental que durante a vida dessa célula novas mitocôndrias sejam geradas (biogênese mitocondrial), para, por exemplo, repor mitocôndrias danificadas. A maior parte da biogênese mitocondrial ocorre no soma do neurônio, e as mitocôndrias geradas podem ser transportadas bi-direcionalmente através das árvores e axônios neuronais ao longo das trilhas dos microtúbulos (Flippo e Strack, 2017-b). A dinâmica mitocondrial é um termo coletivo que abrange os processos de fusão, fissão e transporte mitocondrial. Através destes processos de fusão e fissão elas se movem do soma até os terminais neuronais, onde exercem um importante papel na geração de energia para o transporte de vesículas de neurotransmissores até a membrana sináptica (Flippo e Strack, 2017-a). A constante fusão/fissão mitocondrial regula a densidade e morfologia dessa organela e está intimamente relacionada com a sua função (Du et al, 2009) e, neste contexto, a dinâmica mitocondrial desempenha um papel importante no desenvolvimento do sistema nervoso e na plasticidade sináptica (Flippo e Strack, 2017-a).

A mitocôndria está envolvida na fisiopatologia de inúmeras desordens neurológicas e doenças neurodegenerativas, dentre estas pode-se citar isquemia cerebral, Esclerose Amiotrófica Lateral, doenças de Parkinson (DP), de Huntington (DH) e de Alzheimer (DA) dentre outras (Masson et al, 2014; Picard et al, 2016; Flippo e Strack, 2017-a, Flippo e Strack, 2017-b, Hu et al, 2017; Khalil e Liévens, 2017; Martinez-Vicente, 2017; Rodolfo et al, 2017). A interrupção da fusão/fissão mitocondrial leva a instabilidades no DNA mitocondrial, provoca proliferação mitocondrial compensatória, induzindo, assim, a doenças neurodegenerativas, cardiovasculares, dentre outras (Vasileiou et al, 2017).

A DA é a doença neurodegenerativa mais comum, e é associada com dano sináptico, um forte indicador inicial dos sintomas clínicos da doença, levando à perda progressiva de memória e déficit cognitivo. O mecanismo pelo qual ocorre a perda sináptica ainda é desconhecido, mas há evidências que as mitocôndrias dos neurônios vulneráveis estejam em menor número e apresentem cristas danificadas e perda parcial ou completa de sua estrutura interna, contribuindo para a redução das sinapses (Mamelak 2017). Além disso, podem ser fatores contribuintes o estresse oxidativo consequente da disfunção mitocondrial e o prejuízo nos sistemas autofágico, lisossomal e endossomal (Martinez-Vicente, 2017). Um estudo conduzido por Calkins e colaboradores (2011) mostrou que neurônios cultivados na presença de placas  $\beta$ -amilóides apresentaram redução em seus constituintes sinápticos e alterações na dinâmica mitocondrial, com redução do transporte mitocondrial para os axônios e aumento na fissão mitocondrial.

Na DP é observada a perda de neurônios dopaminérgicos na *substantia nigra*, que pode ser associada com a presença de estresse oxidativo e disfunção mitocondrial (Martinez-Vicente, 2017). Os neurônios dopaminérgicos sobreviventes apresentam inclusões citoplasmáticas e neuríticas compostas principalmente por  $\alpha$ -sinucleína e outras proteínas (Moon e Paek, 2015; Hu e Wang, 2016). Evidências sugerem que depósitos de  $\alpha$ -sinucleína nas mitocôndrias da *substantia nigra* de pacientes portadores da DP podem estar relacionados com a redução da atividade do complexo I, levando à depleção de ATP, aumento na produção de espécies reativas de oxigênio e consequente aumento de estresse oxidativo observado no cérebro desses pacientes (Hu e Wang, 2016). Além disso, esta redução na atividade do complexo I observada em pacientes com DP é reproduzida em modelos animais desta doença por rotenona ou paraquat, dois pesticidas com estrutura similar à do inibidor do complexo I, MPTP (1-metil-4-fenil-1,2,3,6-tetrahidropiridina) (Hu e Wang, 2016).

## **Estresse e Receptores de Glicocorticóides**

O termo “estresse” é empregado em situações onde a homeostase está sendo ameaçada ou há a percepção de ameaça, envolvendo fatores internos ou externos, ambientais ou psicológicos como estímulo (Nicolaidis et al, 2017). O cérebro é o principal intérprete do que é considerando um “estressor” e qual será a resposta comportamental e psicológica produzida. A resposta clássica de “luta ou fuga” ao estresse visa à auto-preservação, iniciando a mobilização de reservas de energia para assegurar que o organismo tenha os recursos necessários para enfrentar um insulto físico muito real (uma resposta "reativa"), ou se preparar para um insulto previsto (uma resposta "antecipatória"), porém a estimulação exagerada deste sistema pode gerar problemas para o organismo (Zavala et al, 2010; Herman et al, 2016; Gray et al, 2017). A resposta ao estresse é mediada pelo sistema hipotálamo-pituitária-adrenal (HPA), e envolve desde a participação do núcleo paraventricular hipotalâmico (NPH) que, ao ser ativado, libera o hormônio liberador de corticotropina (HLC) e arginina vasopressina (AVP). O NPH é o componente central do sistema HPA e possui neurônios aferentes de diversas regiões do cérebro, incluindo hipocampo, córtex pré-frontal e amígdala. Quando liberados pelo NPH, o HLC e a AVP estimulam a secreção do hormônio adrenocorticotrópico, o qual vai estimular a síntese e liberação de corticóides do córtex adrenal na corrente sanguínea (Azuma et al, 2017).

Os glicocorticóides (GCs) agem via dois tipos de receptores, os receptores de Mineralocorticóides e de Glicocorticóides (RGs). Estes receptores apresentam distribuição cerebral e afinidade diferentes pelo ligante. Os receptores de mineralocorticóides estão localizados principalmente no hipocampo e possuem alta afinidade pelos GCs, ligando a estes mesmo em baixas concentrações. Os RGs, por sua vez, estão amplamente distribuídos no cérebro e possuem menor afinidade pelos GCs (Gray et al, 2017). Portanto, os estudos

relacionados ao estresse investigam principalmente as ações dos RGs, visto que, devido à sua baixa afinidade pelos GCs, estes necessitam de altas concentrações de GCs circulantes para que ocorra a ligação. Quando está inativo, o RG se encontra no citosol na forma de um heterocomplexo formado por proteínas de choque térmico e imunofilinas. Quando o GC se liga ao seu receptor, esse heterocomplexo sofre um remodelamento, ativa-se e será translocado para o núcleo, onde irá transativar ou transreprimir múltiplos genes (Nicolaidis et al, 2017).

O papel exato exercido pelos GCs sobre as células ainda não está totalmente esclarecido e, uma vez que eles agem sobre um número muito grande de genes, estima-se que cerca de 10 a 20% do genoma humano seja controlado de alguma forma por GCs (Oakley e Cidlowski, 2013). Dentre os genes controlados pelos GCs podemos citar os genes nucleares que transcrevem proteínas mitocondriais (Monaghan e Whitmarsh, 2015), e agindo nesses genes os RGs promovem a biogênese (Simpkins et al, 2010; Finsterer e Frank, 2015) e modulam o *turnover* mitocondrial (Jeanneteau e Arango-Lievano, 2016).

A resposta dos GCs sobre a dinâmica mitocondrial bem como sobre a função celular no sistema nervoso é considerada bifásica, onde baixas doses apresentam efeitos neuroprotetores, estimulam a capacidade de tamponamento do cálcio, o potencial de membrana e as funções redox, favorecendo a plasticidade neuronal, enquanto altas doses apresentam efeitos contrários, além de potencializar a ação de agentes tóxicos em neurônios corticais (Jeanneteau e Arango-Lievano, 2016 Gray et al, 2017). Esta relação de “curva em U” invertido entre os níveis de GCs e o efeito celular significa que baixas concentrações de GCs exibem ações tróficas enquanto altas doses são prejudiciais à sobrevivência neuronal (Du et al, 2009; Jeanneteau e Arango-Lievano, 2016). A exposição aos GCs prolongada e repetitiva também pode alterar a dinâmica dos efeitos dos GCs, por exemplo, pode levar ao acúmulo de mitocôndrias danificadas nos neurônios (Jeanneteau e Arango-Lievano, 2016). Portanto, a

adaptação individual do animal ao estresse (com alteração na secreção e sensibilidade aos corticóides) é que vai determinar em que ponto da curva aquele determinado animal está e os consequentes efeitos do estresse no sistema nervoso desse animal.

## **Dimorfismo e Estresse**

Fêmeas e machos respondem ao estresse de maneira diferente, e estas diferenças na resposta do eixo HPA podem gerar dimorfismo na resposta fisiológica e patológica do estresse. Zavala e colaboradores (2010) observaram que, em fêmeas, após estresse agudo e crônico, ocorre maior aumento da ativação dos neurônios que expressam RGs no NPH. Bourke e colaboradores (2012) demonstraram que após a exposição a estressores agudos ou crônicos, ratas apresentaram maior ativação dos RGs. Tomados em conjunto esses estudos indicam que a fêmeas possuem maior sensibilidade ao estresse do que machos. As fêmeas também parecem ser mais sensíveis à retroalimentação negativa dos GCs, uma vez que após a presença de um estressor agudo ocorre menor ativação de neurônios no NPH de fêmeas do que de machos. Essas diferenças dimórficas na eficiência de resposta podem tornar as fêmeas mais adaptáveis ao estresse (Zavala et al, 2010).

Além disso, ratas possuem níveis basais de corticosterona (CORT) mais elevados que ratos, e os hormônios ovarianos circulantes parecem contribuir nesta diferença (Bangasser e Wicks, 2017). Os níveis de GCs acompanham os níveis de estrógeno e progesterona, ou seja, no estro - secreção aumentada de progesterona - e proestro – secreção aumentada de estradiol, os níveis basais de CORT estão elevados (Herman et al, 2016).

Ratos machos, em resposta à exposição a um estressor agudo, demonstram uma elevação mais pronunciada no nível de CORT plasmática em comparação com fêmeas (Pisu et al, 2016) e um aumento na densidade de espinhos dendríticos (Yuen et al, 2016). Além disso, Khurana e Devaud (2007) observaram que após exposição a estresse repetido moderado ocorreram elevações persistentes dos níveis de espinofilina em hipocampo de machos,

aumento de sinaptofisina cortical de fêmeas e que as ratas ovariectomizadas tiveram respostas similares às dos machos.

## **Dexametasona**

A dexametasona (DEX) é um GC sintético potente, com diversas aplicações clínicas devido às suas funções imunossupressoras e anti-inflamatórias, porém, seu uso clínico pode levar ao desenvolvimento de efeitos colaterais, tais como psicose, distúrbios do humor e problemas do sono (Meijer e de Kloet, 2017).

A DEX é um agonista de receptores de GCs e exerce suas atividades bioquímicas principalmente devido à sua alta afinidade pelos RGs. A DEX se liga ao RG, o qual dimeriza e transloca para o núcleo onde irá exercer papel semelhante ao já descrito para glicocorticoides endógenos, ao induzir ou reprimir a transcrição de genes alvo através da ligação em regiões promotoras. Por mimetizar os efeitos do esteroide natural cortisol, a DEX é utilizada em alguns estudos para simular *in vitro* os efeitos do estresse (Mutsaers e Tofghi, 2012; Suwanjang et al, 2014), porém, quando utilizada em doses suprafisiológicas pode ocorrer a supressão da secreção hipotalâmica de HLC e do hormônio adrenocorticotrópico pela glândula pituitária, resultando em uma atrofia secundária do córtex adrenal e atraso na recuperação da função do eixo HPA (Gordijn et al, 2012).

Enquanto os GCs produzidos *in vivo* conseguem atravessar facilmente a barreira hemato-encefálica, a DEX tem sua entrada dificultada pela glicoproteína P, uma proteína transportadora de efluxo (Schinkel et al, 1995; Meijer et al, 1998; Karssen et al, 2002). Como a DEX é agonista dos RGs, ao se ligar a estes, periféricamente ocorre uma inibição da produção endógena de GCs. Portanto, a presença da DEX, mesmo que em baixas doses, resulta em um estado de hipocorticóides no cérebro, visto que ela não atravessa a barreira hemato-encefálica (Karssen et al, 2005).



## Neuroblastoma

As células de neuroblastoma são amplamente utilizadas como modelo neuronal por proporcionar um suprimento ilimitado de células de origem humana. A linhagem celular SH-SY5Y é uma sub-linhagem clonada das células SK-N-SH originárias de neuroblastoma humano e tem sido usada como modelo neuronal desde a década de 80, visto que possuem semelhanças bioquímicas e funcionais com neurônios (Xie et al, 2010; Kovalevich e Langford, 2016). Porém, a linhagem SH-SY5Y difere de neurônios maduros na morfologia, na alta taxa mitótica e na expressão de marcadores neuronais (Agholme et al, 2010).

Estudos têm mostrado que as células do neuroblastoma SH-SY5Y podem ser induzidas *in vitro* à diferenciação neuronal (Agholme et al, 2010; Lopes et al, 2010; Lopes et al, 2012) sendo o tratamento com ácido retinóico o método melhor caracterizado e mais comumente utilizado (Kovalevich e Langford, 2016). O uso da linhagem celular SH-SY5Y ocorre em diversas áreas das neurociências, tais como estudos de neurotoxicidade, DP, DA dentre outros (Agholme et al, 2010; Kovalevich e Langford, 2013; Krishna et al, 2014; Xicoy et al, 2017). As células diferenciadas passam a expressar proteínas neuroespecíficas, incluindo a proteína nuclear NeuN (expressa em neurônios maduros pós-mitóticos), a tubulina  $\beta$ -III neurônio-específica e a proteína sináptica Sv2, o que torna as células do neuroblastoma SH-SY5Y diferenciadas um modelo bastante fiel de neurônios adultos maduros (Agholme et al, 2010). Portanto, pelo exposto acima, e por ser uma linhagem de fácil obtenção e diferenciação, as células SH-SY5Y foram utilizadas como modelo neuronal.

# OBJETIVOS

## JUSTIFICATIVA E OBJETIVO GERAL

Previamente em nosso grupo foi demonstrado que o estresse crônico aumentava a atividade de complexos da cadeia respiratória em cérebro de ratos de maneira sexo-específica. Portanto, complementarmente aos resultados prévios, o objetivo deste estudo é avaliar o efeito do estresse em parâmetros mitocondriais de células neurais e dos sinaptossomas de ratos machos e fêmeas submetidos a estresse crônico por contenção (ECC) por 40 dias. Adicionalmente, investigar o efeito da administração dos GCs sobre a Massa Mitocondrial (MM) e o Potencial de Membrana Mitocondrial (PMM) em dois modelos: um *in vitro*, tratamento com DEX em diferentes doses e tempos de tratamento em culturas de células de sistema nervoso (células da linhagem celular SH-SY5Y (neuroblastoma) diferenciadas com ácido retinóico, e outro *in vivo* (camundongos tratados com CORT ou DEX).

## **OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

### ***CAPÍTULO I***

- Avaliar o conteúdo de RG, a MM e o PMM de sinaptossomas de córtex, hipocampo e estriado de ratos machos e fêmeas submetidos a ECC por 40 dias.

### ***CAPÍTULO II***

- Avaliar o efeito dos GCs sobre a massa e o potencial mitocondrial de células da linhagem celular SH-SY5Y (neuroblastoma) diferenciadas com ácido retinóico para verificar se o tratamento altera a quantidade de mitocôndrias

### ***CAPÍTULO III***

- Simular um estado de hipocorticóide no cérebro e verificar o efeito sobre MM ou PMM de suspensão de células totais, de neurônios (células positivas para sinaptotagamina) e de sinaptossomas.

## **PARTE II: MATERIAL, MÉTODOS E RESULTADOS**

Os materiais, métodos e resultados desta tese estão apresentados na forma de um artigo científico publicado na revista *Neurochemical Research* (Capítulo I) e materiais, métodos e resultados complementares (Capítulo II e Capítulo III)

**CAPÍTULO I**  
**Artigo científico**

**Chronic stress causes sex-specific and structure-specific alterations in mitochondrial  
respiratory chain activity in rat brain**

Neurochemical Research

DOI: 10.1007/ s11064-017-2375-9

# Chronic Stress Causes Sex-Specific and Structure-Specific Alterations in Mitochondrial Respiratory Chain Activity in Rat Brain

Carina de Souza Mota<sup>1</sup> · Simone Nardin Weis<sup>2</sup> · Roberto Farina Almeida<sup>1</sup> · Carla Dalmaz<sup>1</sup> · Fátima Therezinha Costa Guma<sup>1</sup> · Letícia Ferreira Pettenuzzo<sup>1</sup>

Received: 31 December 2016 / Revised: 28 July 2017 / Accepted: 3 August 2017  
© Springer Science+Business Media, LLC 2017

**Abstract** Chronic restraint stress (CRS) induces a variety of changes in brain function, some of which are mediated by glucocorticoids. The response to stress occurs in a sex-specific way, and may include mitochondrial and synaptic alterations. The synapse is highly dependent on mitochondrial energy supply, and when mitochondria become dysfunctional, they orchestrate cell death. This study aimed to investigate the CRS effects on mitochondrial respiratory chain activity, as well as mitochondrial potential and mass in cell body and synapses using hippocampus, cortex and striatum of male and female rats. Rats were divided into non-stressed (control) and stressed group (CRS during 40 days). Results showed that CRS increased complex I–III activity in hippocampus. We also observed an interaction between CRS and sex in the striatal complex II activity, since CRS induced a reduction in complex II activity in males, while in females this activity was increased. Also an interaction was observed between stress and sex in cortical complex IV activity, since CRS induced increased activity in females, while it was reduced in males. Glucocorticoid receptor (GR) content in cortex and hippocampus was sexually dimorphic, with female rats presenting higher levels compared to males. No changes were observed in GR content, mitochondrial potential or mass of animals submitted to CRS. It was concluded that CRS induced changes in respiratory chain complex activities, and some of these changes are

sex-dependent: these activities are increased in the striatal mitochondria by CRS protocol mainly in females, while in males it is decreased.

**Keywords** Electron transport chain activity · Mitochondrial mass · Mitochondrial potential · Synaptosome · Glucocorticoid receptor

## Abbreviations

GR	Glucocorticoid receptor
MR	Mineralocorticoid receptor
GC	Glucocorticoid
ROS	Reactive oxygen species
AD	Alzheimer's disease
CRS	Chronic restraint stress

## Introduction

Stress is a nonspecific response to any modification that threatens the homeostasis [1]. This response includes the activation of the hypothalamic–pituitary–adrenal axis with subsequent secretion of corticotropin-releasing hormone, which in turn stimulates the release of adrenocorticotropic hormone (ACTH) from the anterior pituitary gland. ACTH then induces glucocorticoid (GC) release from the adrenal cortex [2].

Studies suggest that stress, both acute and chronic, induces changes in brain function and is associated with the onset of neuropsychiatric disorders. Chronic stress specifically contributes to the development of several diseases, including mood, cognitive and neurodegenerative disorders, and produces hippocampal and cortical damage [1, 3]. Restraint stress is the most commonly employed procedure used as model for psychiatric stress, since it is simple,

✉ Carina de Souza Mota  
carina.mota@gmail.com

<sup>1</sup> Department of Biochemistry, Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Ramiro Barcellos, 2600, anexo, Porto Alegre, Rio Grande Do Sul 90035-003, Brazil

<sup>2</sup> Department of Cellular Biology, Universidade de Brasília, Brasília, Distrito Federal, Brazil

painless and induces both oxidative and psychological stress [4]. Researchers have reported that restraint stress affects brain function and morphology, causing adverse consequences on several brain regions, including cortex, striatum and hippocampus [3, 5, 6].

GCs released from the adrenal cortex in stressful circumstances play a key role in conditions affecting the central nervous system and modulate a variety of molecular changes, such as neurotransmitter levels, receptor density, dendritic morphology and changes in signal transduction [2]. The GC's actions are mediated by mineralocorticoid receptors (MR) and glucocorticoid receptors (GR). These brain receptors distributions are different, since GRs are ubiquitously expressed while MR distribution is relatively limited to just a few structures [2, 7]. Prefrontal cortex, hippocampus and striatum are brain regions where both receptors are expressed and of critical importance for the brain's response to stress [7, 8]. Reduced GR expression was found in prefrontal cortex of male rats exposed to CRS [9]. Also, GR levels are downregulated and its immunoreactivity is reduced in hippocampus following restraint stress in male rats. Remarkably, the opposed effect, increased GR, was observed in hippocampus and cortex of female rats after chronic stress [10, 11].

GC may be involved with the expression of mitochondrial proteins and thus in the mitochondrial oxidative metabolism [11, 12]. Sustained glucocorticoid signaling impairs mitochondrial functions, whereas acute effects may provide enhanced mitochondrial functions [13]. Mitochondria are essential for synaptic function and neuron survival. In animal models it was observed that the brain regions featuring metabolic deregulation and dysfunctional mitochondria are those also exhibiting changes in neuronal connectivity and neurotransmission [13, 14]. Considering that stress affects mitochondria, the synapse in turn is also affected by increased GCs levels, in a fashion that depends on the context, dose and duration of the GC exposure. GCs are required for mitochondria proper functioning, as well as dendritic spine turnover [13]. This means that glucocorticoids present a biphasic modulation both on mitochondrial biogenesis and function and on synaptic plasticity, with low doses enhancing neurotransmission, synaptic growth, mitochondrial functions and high doses producing inhibition of these functions [13].

Despite the fact that many studies on stress effects have been done, most of them were conducted in males and the response and adaptation to stress in females appear to be different. Females have higher baseline plasma levels of corticosterone and this reflects the sexually dimorphic release of corticosterone in response to stress [15, 16]. Estradiol also has a neuroprotective effect against brain insults due to prevention of mitochondrial dysfunction, by maintaining the mitochondrial calcium homeostasis [17].

Since stress and mitochondria plays important roles in the neuropsychiatric disorder's development, that the stress response and mitochondrial functioning can be different between sexes and that stress affects mitochondria, the aim of this study was to investigate CRS effects on hippocampal, cortical and striatal mitochondria in male and female rats. These structures were chosen because they present significant density of glucocorticoid receptors and are related to the stress response. Additionally, this study was performed in cellular (perinuclear) mitochondria; however, since synapses are affected by stress, we also evaluated the synaptic mitochondrial mass and potential.

## Materials and Methods

### Animals

Twenty-four adult male Wistar rats (60 days at the beginning of the treatment, weighing 150–230 g) and 24 adult female Wistar rats (60 days at the beginning of the treatment, weighing 140–200 g) were used. Experimental animals were housed in groups of four in Plexiglas home cages (65 × 25 × 15 cm) with the floor covered with sawdust and maintained on a standard dark-light cycle (lights on between 7:00 and 19:00 h), at a room temperature of  $22 \pm 2$  °C. The rats had free access to food (standard lab rat chow) and water, except during the periods when CRS was applied. All studies were in accordance with the Institutional Ethical Committee (approved by CEUA-UFRGS, number 2008102) and followed the recommendations of the International Council for Laboratory Animal Science (ICLAS) and of the Federation of Brazilian Societies for Experimental Biology. All efforts were made to minimize animal suffering as well as to reduce the number of used animals.

### Restraint Stress Protocol

The animals were divided in two groups: non-stressed group (control group) and stressed group (repeated restraint stress during 40 days). The stressed group was taken to a different room, where restraint was applied by placing the animal in a 25 × 7 cm plastic tube and fixing it with adhesive tape on the outside so that the animal had limited movements. There was a 1.5 cm hole at one far end for breathing. The restraint procedure was performed between 9:00 and 14:00 h. The animals were stressed for 1 h/day, 5 days a week for 40 days (no stress on weekends). Previous study of our group reported lower weight gain of the CRS submitted rats [18]. Control (non-stressed) animals were kept undisturbed in their home cages throughout the experimental period.

### Determination of Mitochondrial Respiratory Chain Enzyme Activity

The animals were decapitated 24 h after the last restraint session. The brains were quickly removed and the hippocampus, striatum and cortex were dissected out on ice. The structures were weighed and homogenized with a Teflon-glass homogenizer in 20 vol (w.v) SET buffer (250 mM sucrose, 2 mM EDTA, 10 mM Trizma base), pH 7.4. The homogenates were centrifuged at 800 g for 10 min at 4 °C and the supernatants were used to determine mitochondrial respiratory chain enzyme activities (complexes I–III, II and IV). Protein measurements were carried out as described by Lowry et al. [19] using bovine serum albumin as standard. On the day of the experimental assays the homogenates were frozen and thawed three times to break the membranes and fully expose the enzymes to substrates. The activities of the electron transport chain complexes II, I–III and IV were determined in homogenates according to standard methods previously described in the literature [20–23]. The activity of respiratory chain enzyme complex succinate: DCIP oxidoreductase (complex II) was determined using the method of Fischer et al. [20] by following the decrease in absorbance due to the reduction of 2,6-DCIP at 600 nm ( $\epsilon = 19.1/\text{mM cm}$ ). The reaction medium containing 40 mM potassium phosphate buffer, pH 7.4, 16.0 mM sodium succinate and 8  $\mu\text{M}$  DCIP was preincubated with 40–80  $\mu\text{g}$  (striatum, hippocampus and cortex) at 30 °C for 20 min. Then, 4 mM sodium azide and 7  $\mu\text{M}$  rotenone were added, and the reaction was initiated by addition of 40  $\mu\text{M}$  DCIP and was monitored for 5 min. Complex I–III activity was measured by following the increase in absorbance due to reduction of cytochrome *c* at 550 nm ( $\epsilon = 20/\text{mM cm}$ ), according to Schapira et al. [21] with modifications. The reaction medium containing 40 mM potassium phosphate buffer, pH 7.4 and 16 mM sodium succinate was preincubated with 40–80  $\mu\text{g}$  (striatum, hippocampus and cortex) at 30 °C for 30 min. Then, 4 mM sodium azide and 7  $\mu\text{M}$  rotenone were added, and the reaction was initiated by addition of 0.6  $\mu\text{g}/\text{ml}$  cytochrome *c* and monitored for 5 min. The activity of cytochrome *c* oxidase (complex IV) was assayed according to the method described by Rustin et al. [22], by following the decrease in absorbance due to the oxidation of previously reduced cytochrome *c* at 550 nm ( $\epsilon = 19.1/\text{mM cm}$ ). The reaction mixture was prepared with 10 mM potassium phosphate buffer, pH 7.0, 0.6 mM n-dodecyl- $\beta$ -D-maltoside, 2–4  $\mu\text{g}$  homogenate protein and the reaction was initiated with addition of 0.7  $\mu\text{g}$  reduced cytochrome *c*. The activity of complex IV was measured at 25 °C for 10 min. All reagents used to determine mitochondrial respiratory chain enzyme activity were purchased from Sigma. The activities of the mitochondrial respiratory chain complexes were expressed as nmol/min.mg protein.

### Flow Cytometry Protocol

#### *Cell Dissociated*

The samples were prepared for flow cytometry according to Weis et al. [24]. Cell suspensions were obtained by dissociation of samples with PBS containing 250  $\mu\text{g}/\text{ml}$  collagenase Type IV (C5138) (Sigma-Aldrich). The cell suspensions were passed through a cell filter strainer with 40  $\mu\text{m}$  nylon meshes (Becton-Dickison) and the resulting filtrate was immediately used to flow cytometric analysis.

#### *Synaptosomes*

Synaptosomal preparations were obtained according to Almeida et al. [25], with modifications. Briefly, after the brain was removed, it was perfused with cold saline and the structures separated on ice. Tissue samples were homogenized (manual small capacity Teflon/glass homogenizer in 10 $\times$  volume/weight) in 10 mM Tris buffer (pH 7.4) containing 0.32 M sucrose, 1 mM EDTA and 0.25 mM DTT. The homogenates were centrifuged in microfuge tubes (1.5 mL per tube) at 3,000 g for 10 min at 4 °C using a fixed-angle rotor. The resulting supernatant was centrifuged at 12,000 g for 12 min at 4 °C using the same rotor. The pellet was removed and suspended in percol 45% in Krebs buffer (NaCl 140 mM, KCl 5 mM, HEPES 25mM, EDTA 1mM, glucose 10 mM, pH 7.4). The cloud formed on top of the supernatant was removed and washed in Krebs Buffer and centrifuged at 12,000 g for 15 min to remove excess sucrose. The supernatant was discarded and the pellet obtained was suspended in PBS (pH 7.4). The preparation was immediately used for specific synaptic mitochondria evaluation.

The protocol for the whole-cell mitochondrial analysis was also used for synaptic mitochondrial flow cytometry. Data from 40,000 events were acquired using a log scale for all parameters, including FSC and SSC.

#### *Mitotracker Flow Cytometry Protocol*

Cells of the filtrate and synaptosomes were stained with Mitotracker Green FM (Invitrogen) or Mitotracker Red according to method described by Weis et al. [24]. The fluorescence intensity mean of FL1-H and FL3-H was evaluated to estimate mitochondrial mass and potential, respectively. The emission of fluorescence was measured by a band pass green (FL1; 530 nm/30) and red (FL3; 670 nm long pass) in a FACSCalibur using CellQuest Pro software (Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ, USA) and data from 40,000 events were acquired using log scale for all parameters, including FSC and SSC. All flow cytometric analyses were performed using Flow Jo software 7.6.3 (Treestar, Ashland, OR).



## GR Flow Cytometry Protocol

Cells of the filtrate were incubated with GR primary antibody (Sigma) for one hour at room temperature in blocking serum containing triton 0.1%. The secondary Alexa fluor 488 (Abcam) was then added to the suspension for one hour at room temperature. The suspension was washed in PBS three times and 10.000 events were collected in the FAC-Scalibur cytometer. The data acquisitions were performed using CELLQuest Pro data acquisition (BD Biosciences) and the analysis was performed using the FlowJo software 7.6.3 (Treestar, Ashland, OR).

## Statistical Analysis

Data are expressed as mean  $\pm$  S.D. and were analyzed by two-way ANOVA (using CRS and sex as factors). Values of  $p < 0.05$  would be considered significant, however since we apply the correction for false discovery rate, a new  $p$ ,  $p < 0.0104$  were considered statistically significant. The correction was calculated as in the work published by Benjamini et al. [26]. All tests were performed using the GraphPad Prism Software 5.01.

## Results

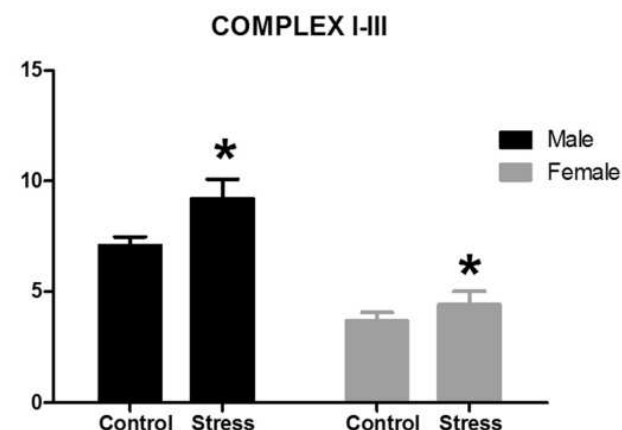
## The Effects of CRS Mitochondrial Complexes Activities of Male and Female Rats

CRS increased significantly the complex I–III activity in hippocampus when compared to non-stressed controls [Fig. 1a Cortex ( $p = 0.0320$ ); Fig. 1b Striatum ( $p = 0.0327$ ); Fig. 1c Hippocampus ( $p = 0.0071$ )]. There were no significant differences detected in cortical complex II activity in both male and female rats [Fig. 2a ( $p > 0.0104$ )]. With regard to striatal complex II activity, we observed an interaction between CRS and sex in which stress induced a reduction in the complex activity in males and increased the activity in females [Fig. 2b ( $p = 0.0069$ )]. Besides this, there is an interaction between CRS and sex on the cortical complex IV activity [Fig. 3a ( $p = 0.0003$ )], the same effect observed in striatal complex II activity.

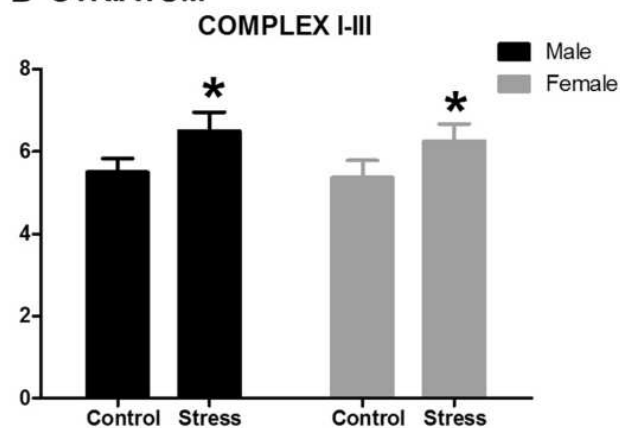
## The Effects of CRS on Mitochondrial Mass and Potential of Dissociated Cell Suspensions and Synaptosomes in the Striatum, Hippocampus and Cortex of Male and Female Rats

To determine whether the results observed in the respiratory chain was associated with alterations in mitochondrial potential or mass, we performed a MitoTracker Red and Green fluorescence labeling assay in cortex, hippocampus

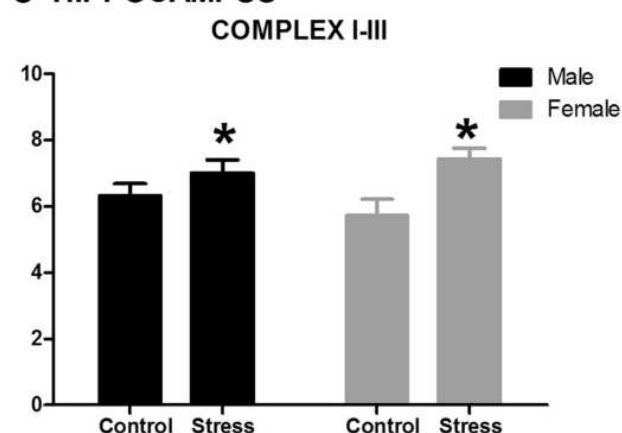
## A CORTEX



## B STRIATUM

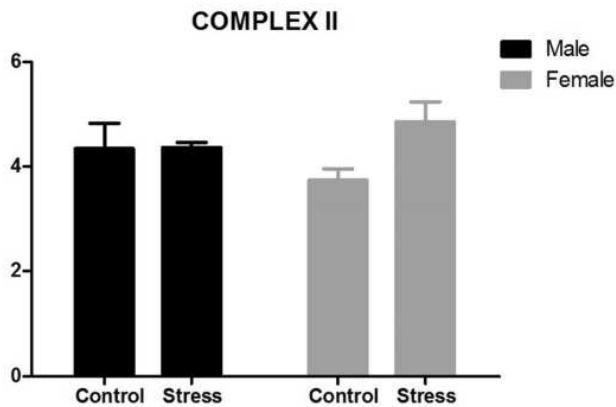


## C HIPPOCAMPUS

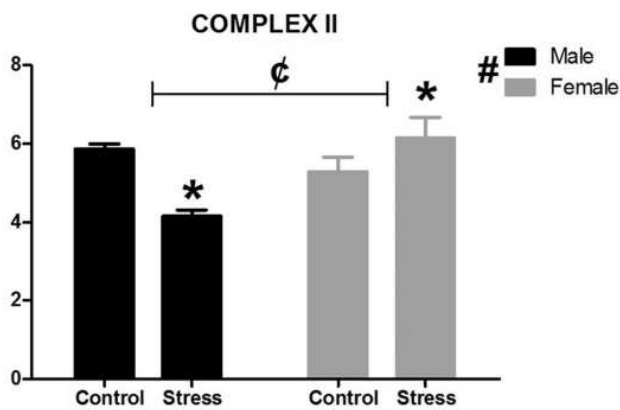


**Fig. 1** Mitochondrial respiratory complex I–III activity of male and female rats. The complex I–III activity were determined in cortex (a), striatum (b) and hippocampus (c) of stressed and non-stressed rats. Data were analyzed by two-way ANOVA ( $p < 0.0104$ ) and expressed as nmol/min/mg protein (mean  $\pm$  S.D.) of 4–6 animals on each group. \*illustrates stress effects; # illustrates sex main effect

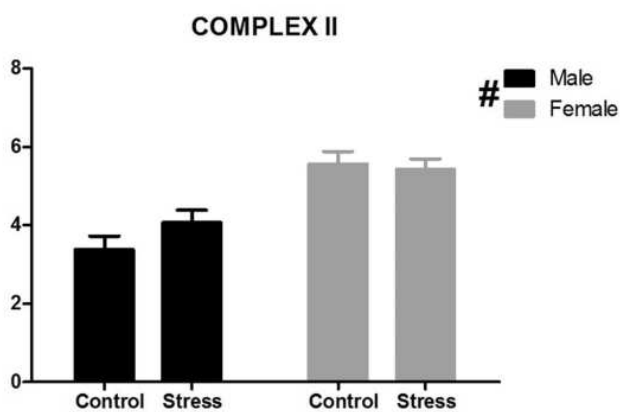
**A CORTEX**



**B STRIATUM**

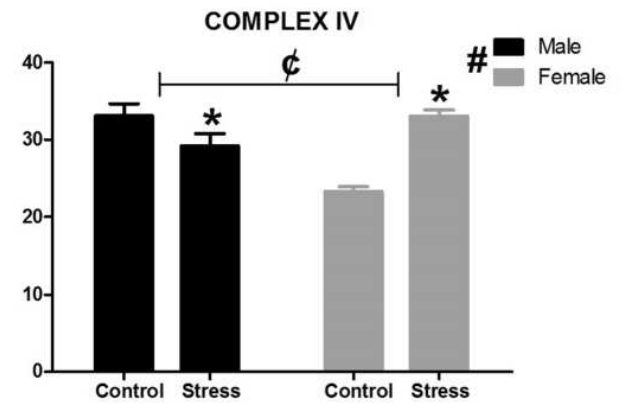


**C HIPPOCAMPUS**

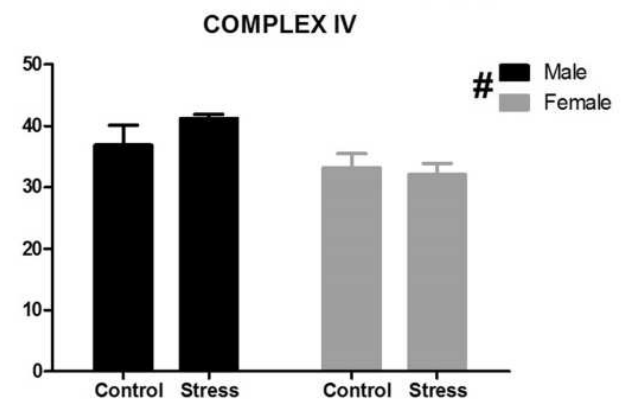


**Fig. 2** Mitochondrial respiratory complex II activity of male and female rats. The complex II activity were determined in cortex (a), striatum (b) and hippocampus (c) of stressed and non-stressed rats. Data were analyzed by two-way ANOVA ( $p < 0.0104$ ) and expressed as nmol/min/mg protein (mean  $\pm$  S.D.) of 4–6 animals on each group. \*illustrates stress effects; # illustrates sex main effect;  $\zeta$  illustrates stress  $\times$  sex interaction.

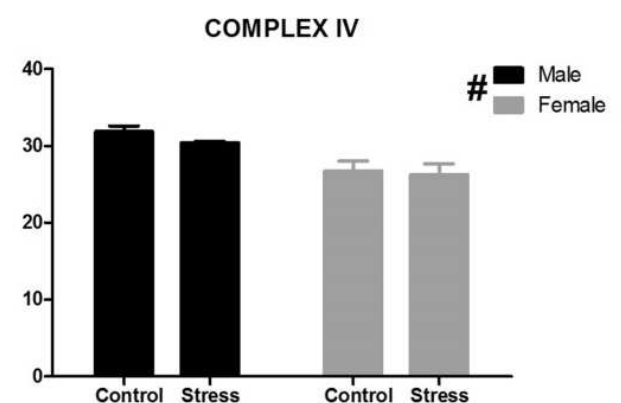
**A CORTEX**



**B STRIATUM**



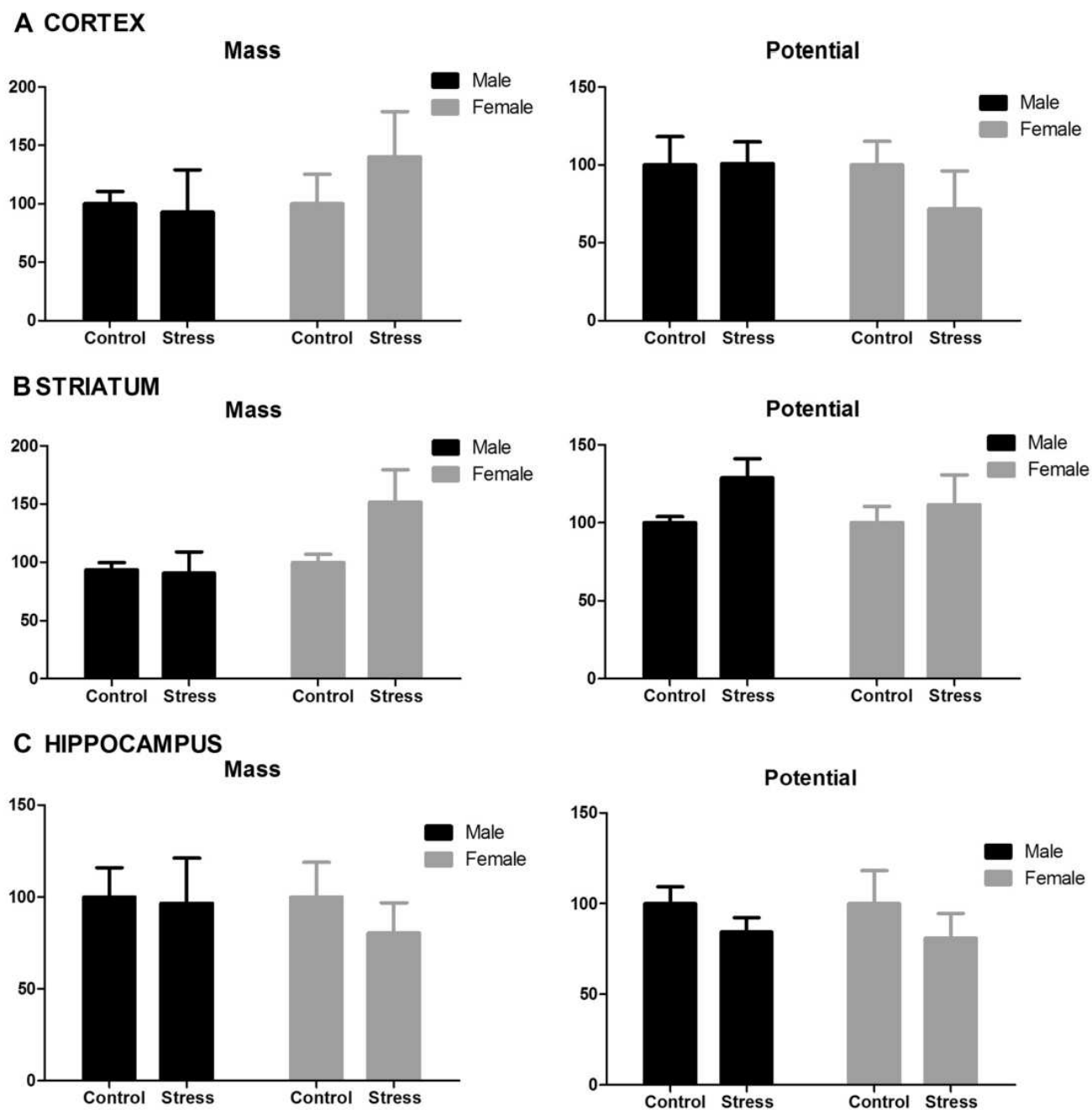
**C HIPPOCAMPUS**



**Fig. 3** Mitochondrial respiratory complex IV activity of male and female rats. The complex IV activity were determined in cortex (a), striatum (b) and hippocampus (c) of stressed and non-stressed rats. Data were analyzed by two-way ANOVA ( $p < 0.0104$ ) and expressed as nmol/min/mg protein (mean  $\pm$  S.D.) of 4–6 animals on each group. \*illustrates stress effects; # illustrates sex main effect;  $\zeta$  illustrates stress  $\times$  sex interaction

and striatum. Figures 4 and 5 show mass and potential of cortex, striatum and hippocampus of dissociated cells and synaptosomes, respectively. In Fig. 5d is presented flow cytometry plot showing the gating strategy

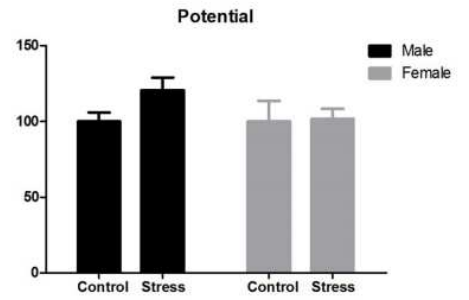
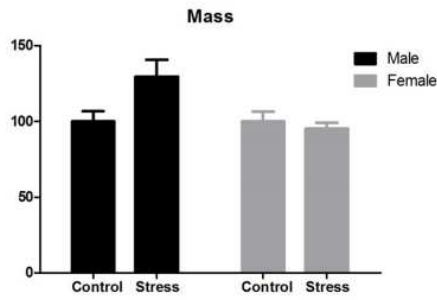
for mitochondrial mass and potential subsets (gate) used in both dissociated cells and synaptosomes. CRS did not cause any alteration in mitochondrial mass and potential



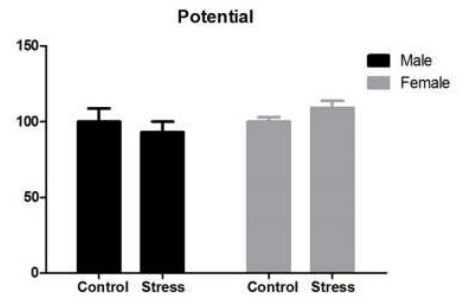
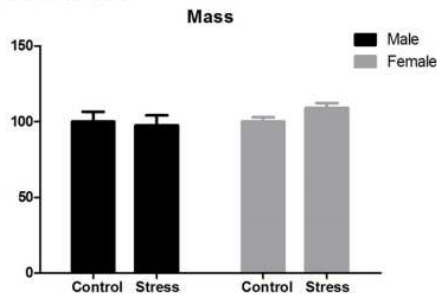
**Fig. 4** Mitochondrial mass and potential of male and female rat's dissociated cell suspensions. The structures analyzed were cortex (a), striatum (b) and hippocampus (c) of stressed and non-stressed rats.

Data were analyzed by two-way ANOVA ( $p < 0.0104$ ) and expressed as control percentage mean  $\pm$  S.D. of 4–6 animals on each group

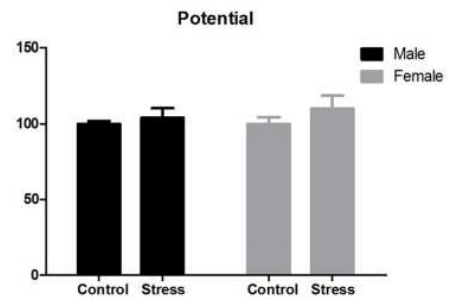
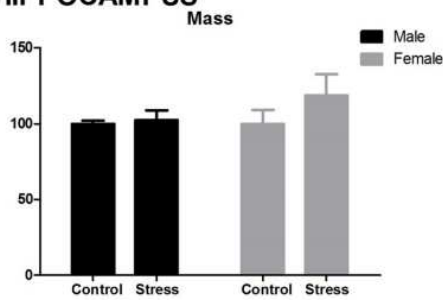
### A CORTEX



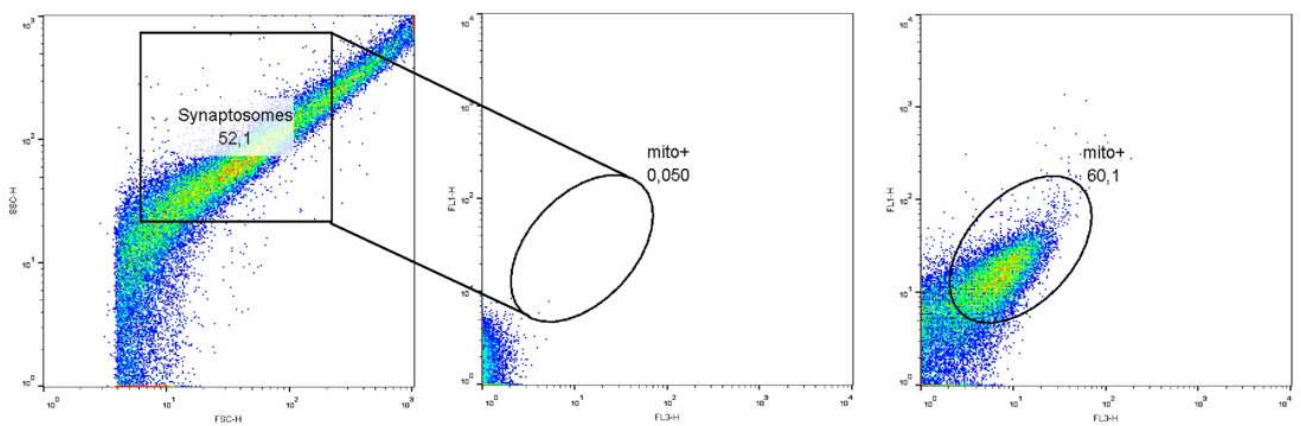
### B STRIATUM



### C HIPPOCAMPUS



### D



**Fig. 5** Mitochondrial mass and potential of male and female rat's synaptosomes. The structures analyzed were cortex (a), striatum (b) and hippocampus (c) of stressed and non-stressed rats. Flow cytometry plot showing the gating strategy for mitochondrial mass and

potential subsets (gate) (d). Data were analyzed by two-way ANOVA ( $p < 0.0104$ ) and expressed as control percentage mean  $\pm$  S.D. of 4–6 animals on each group

in all tested structures in males or females, both in dissociated cells (Fig. 4) and synaptosomes (Fig. 5).

### The Effects of CRS on the Glucocorticoid Receptors of Striatum, Hippocampus and Cortex of Male and Female Rats

In this study, the FL1 (GR) average fluorescence in the dissociated cells was quantified. An increased fluorescence reflects the higher proportion of GR in the structure analyzed. The statistical analysis showed that the cortical [Fig. 6a ( $p < 0.0001$ )] and hippocampal [Fig. 6c ( $p = 0.0004$ )] GR content was sexually dimorphic, presenting decreased GR content in males compared to female rats, but this is a sex effect and CRS did not affect this parameter. No statistically significant effects were observed in striatum of both CRS and sex [Fig. 6b ( $p > 0.0104$ )].

### Discussion

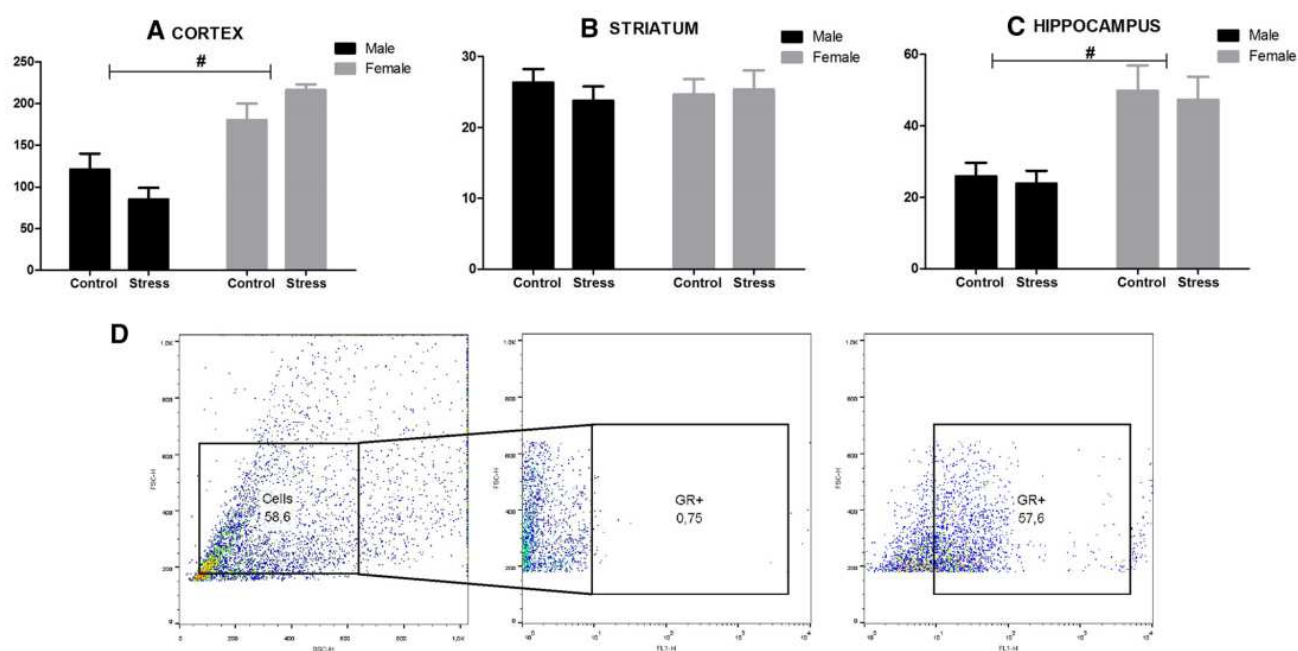
The main findings of this study are that CRS affects mitochondrial respiratory chain activity in all analyzed structures in a sex-specific manner without alteration in mitochondrial mass or potential and GR content.

It has been shown that chronic stress leads to neurochemical and morphologic changes in prefrontal cortex, including dendritic remodeling, suggesting that cortex neurons

might be influenced by GCs released during stress [26, 27]. Beyond the cortex, other brain structures are also influenced by chronic stress such as the hippocampus and striatum [5, 28, 29]. Cortex and hippocampus also seem to be affected by stressors exposure in a sexually dimorphic way, especially in cortex, that appears to play a significant role in modulation of the neurological response to chronic stress [30].

The present study found that CRS can induce an alteration in complex II activity in a sex specific manner, since it reduced complex II activity in males and increased in females. The complex II activity has a key role in the energy metabolism of mitochondrial electron transport chain where it catalyzes electron transport from succinate to CoQ, and its impairment in some pathological conditions may be related with Reactive Oxygen Species (ROS) production [31, 32]. A previous study from our group found that restraint stress enhances antioxidant enzyme activities in frontal cortex and striatum, such as Superoxide Dismutase (SOD) and Glutathione Peroxidase [5]. These results and the mitochondrial complex II activity alteration in striatum induced by CRS compromise mitochondrial function and this effect may be involved, for example, with ROS overproduction and its consequent effects upon mitochondrial respiratory chain complexes. Another study in literature demonstrated that chronic stress induces changes in function, physiology and morphology of cortex and hippocampus [26].

Chronic stress is involved with ROS generation and mitochondrial damage [3, 33, 34] and generally affects males



**Fig. 6** GR immunofluorescence in cortex (a), striatum (b) and hippocampus (c) of stressed and non-stressed, male and female rats. Flow cytometry plot showing the gating strategy for GR subsets (gate) (d).

Data were analyzed by two-way ANOVA ( $p < 0.0104$ ) and expressed as mean  $\pm$  S.D. of 4–6 animals on each group. # illustrates sex main effect

and females in different ways [30, 35]. Moreover, gonadal hormones influence brain mitochondrial ROS production in both females and males [36]. The data from the current study also show that CRS induced an increase in the complex I–III activity in both male and female's hippocampus. Besides the lack of CRS effect on antioxidant enzymes, Noschang et al. [37] observed an increase in the SOD:Catalase ratio, and this imbalance, combined with the present increased respiratory complex I–III activity, may be related to the hippocampal response of stressed animals. In addition, hippocampus showed higher GR content in females but this is a sex effect and CRS did not affect this parameter. Moreover, CRS induced striatal increase of complex IV activity only in males. This increase supports previous study performed in rat glioma cells which demonstrated that in the presence of GC there is an increased cytochrome oxidase-1 expression [38]. However, this increase in complex IV activity is not related to mitochondrial biogenesis since we did not find an increase in mitochondrial mass and potential in striatal cells from CRS. In this study, the CRS did not affect neither mitochondrial biogenesis nor mitochondrial distribution to synaptic region, and any change that may have occurred halfway through CRS may be over and the end of it and the mitochondrial status might have gone back to normal.

A report found that two-week restraint stress decreases strongly GR protein level in prefrontal cortex and hippocampus of male rats [39]. Another study showed that 21 days of restraint stress affected hippocampal GR in a sexually dimorphic manner, with decreased GR levels in CA1 and dentate gyrus of male but not female rats [10]. In the present study the GR content was not affected by CRS, but was lower in cortex and hippocampus of male rats. It is known that the stress response depends on the period of habituation to stress and the brain structure involved in regulation of these stress responses [38]. Another study found that female prefrontal cortex presented GR accumulation in mitochondria after exposition to chronic stress [11]. Although it is not yet known which mechanisms are mediating these sex-specific stress responses, studies have shown that circulating levels of estradiol are one important contributor to sex differences in the stress response [40–42].

## Conclusion

In conclusion, the present study demonstrated that chronic stress can cause sex-specific and structure-specific alterations in the respiratory chain complex activities. Also, the increase in the hippocampal complex I–III may be involved in the increased ROS generation described in previous studies. The GR content was also sex-specific, with females presenting higher content than male rats, without CRS effect in both sexes in this parameter. More studies are needed

to elucidate how stress affects male and female rats differently and if these differences can lead to different outcomes concerning to neurodegenerative and psychiatric disorders.

**Acknowledgements** This work was partly supported by grants from Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) and Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES).

## References

1. Popoli M, Yan Z, McEwen BS, Sanacora G (2011) The stressed synapse: the impact of stress and glucocorticoids on glutamate transmission. *Nat Rev Neurosci* 13(1):22–37. doi:10.1038/nrn3138
2. Shirazi SN, Friedman AR, Kaufer D, Sakhal SA (2015) Glucocorticoids and the brain: neural mechanisms regulating the stress response. *Adv Exp Med Biol* 872:235–252. doi:10.1007/978-1-4939-2895-8\_10
3. Wang Y, Kan H, Yin Y, Wu W, Hu W, Wang M, Li W, Li W (2014) Protective effects of ginsenoside Rg1 on chronic restraint stress induced learning and memory impairments in male mice. *Pharmacol Biochem Behav* 120:73–81. doi:10.1016/j.pbb.2014.02.012
4. Buynitsky T, Mostofsky DI (2009) Restraint stress in biobehavioral research: Recent developments. *Neurosci Biobehav Rev* 33:1089–1098. doi:10.1016/j.neubiorev.2009.05.004
5. Ahmad A, Rasheed N, Chand K, Maurya R, Banu N, Palit G (2012) Restraint stress-induced central monoaminergic & oxidative changes in rats & their prevention by novel *Ocimum sanctum* compounds. *Indian J Med Res* 135(4):548–554
6. Gadek-Michalska A, Tadeusz J, Rachwalska P, Bugajski J (2015) Chronic stress adaptation of the nitric oxide synthases and IL-1 $\beta$  levels in brain structures and hypothalamic-pituitary-adrenal axis activity induced by homotypic stress. *J Physiol Pharmacol* 66(3):427–440
7. Vyas S, Rodrigues AJ, Silva JM, Tronche F, Almeida OF, Sousa N, Sotiropoulos I (2016) Chronic stress and glucocorticoids: from neuronal plasticity to neurodegeneration. *Neural Plast* 2016:6391686. doi:10.1155/2016/6391686
8. Arp JM, Horst JP, Kanatsou S, Fernández G, Joëls M, Krugers HJ, Oitzl MS (2014) Mineralocorticoid receptors guide spatial and stimulus-response learning in mice. *PLoS ONE* 9(1):e86236. doi:10.1371/journal.pone.0086236
9. Chiba S, Numakawa T, Ninomiya M, Richards MC, Wakabayashi C, Kunugi H (2012) Chronic restraint stress causes anxiety- and depression-like behaviors, downregulates glucocorticoid receptor expression, and attenuates glutamate release induced by brain-derived neurotrophic factor in the prefrontal cortex. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* 39(1):112–119. doi:10.1016/j.pnpbp.2012.05.018
10. Kitraki E, Kremmyda O, Youlatos D, Alexis M, Kittas C (2004) Spatial performance and corticosteroid receptor status in the 21-day restraint stress paradigm. *Ann NY Acad Sci* 1018:323–327. doi:10.1196/annals.1296.039
11. Adzic M, Lukic I, Mitic M, Djordjevic J, Elaković I, Djordjevic A, Krstic-Demonacos M, Matic G, Radojic M (2013) Brain region- and sex-specific modulation of mitochondrial glucocorticoid receptor phosphorylation in fluoxetine treated stressed rats: effects on energy metabolism. *Psychoneuroendocrinology* 38(12):2914–2924. doi:10.1016/j.psyneuen.2013.07.019
12. Hunter RG, Seligsohn M, Rubin TG, Griffiths BB, Ozdemir Y, Pfaff DW, Datson NA, McEwen BS (2016) Stress and corticosteroids regulate rat hippocampal mitochondrial DNA gene

- expression via the glucocorticoid receptor. *Proc Natl Acad Sci USA* 113(32):9099–9104. doi:[10.1073/pnas.1602185113](https://doi.org/10.1073/pnas.1602185113)
13. Jeanneteau F, Arango-Lievano M (2016) Linking mitochondria to synapses: new insights for stress-related neuropsychiatric disorders. *Neural Plast* 2016:3985063. doi:[10.1155/2016/3985063](https://doi.org/10.1155/2016/3985063)
  14. Völgyi K, Gulyássi P, Háden K, Kis V, Badics K, Kékesi KA, Simor A, Györfly B, Tóth EA, Lubec G, Juhász G, Dobolyi A (2015) Synaptic mitochondria: a brain mitochondria cluster with a specific proteome. *J Proteomic* 120:142–157. doi:[10.1016/j.jprot.2015.03.005](https://doi.org/10.1016/j.jprot.2015.03.005)
  15. Malisch JL, Saltzman W, Gomes FR, Rezende EL, Jeske DR, Garland T Jr (2007) Baseline and stress-induced plasma corticosterone concentrations of mice selectively bred for high voluntary wheel running. *Physiol Biochem Zool* 80(1):146–156. doi:[10.1086/508828](https://doi.org/10.1086/508828)
  16. Lu J, Wu XY, Zhu QB, Li J, Shi LG, Wu JL, Zhang QJ, Huang ML, Bao AM (2015) Sex differences in the stress response in SD rats. *Behav Brain Res* 284:231–237. doi:[10.1016/j.bbr.2015.02.009](https://doi.org/10.1016/j.bbr.2015.02.009)
  17. Nilsen J, Brinton RD (2002) Impact of progestins on estradiol potentiation of the glutamate calcium response. *Neuroreport* 13(6):825–830
  18. Pettenuzzo LF, Noschang C, von Pozzer Toigo E, Fachin A, Vendite D, Dalmaz C (2008) Effects of chronic administration of caffeine and stress on feeding behavior of rats. *Physiol Behav* 95:295–301. doi:[10.1016/j.physbeh.2008.06.003](https://doi.org/10.1016/j.physbeh.2008.06.003)
  19. Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ (1951) Protein measurement with the Folin-Phenol reagents. *J Biol Chem* 193:265–275
  20. Fischer JC, Ruitenbeek W, Berden JA, Trijbels JM, Veerkamp JH, Stadhouders AM, Sengers RC, Janssen AJ (1985) Differential investigation of the capacity of succinate oxidation in human skeletal muscle. *Clin Chim Acta* 153:23–26
  21. Schapira AH, Cooper JM, Dexter D, Clark JB, Jenner P, Marsden CD (1990) Mitochondrial complex I deficiency in Parkinson's disease. *J Neurochem* 54(3):823–827
  22. Rustin P, Chretien D, Bourgeron T, Gérard B, Rötig A, Saudubray JM, Munnich A (1994) Biochemical and molecular investigations in respiratory chain deficiencies. *Clin Chim Acta* 228(1):35–51
  23. Pettenuzzo LF, Ferreira G da C, Schmidt AL, Dutra-Filho CS, Wyse AT, Wajner M (2006) Differential inhibitory effects of methylmalonic acid on respiratory chain complex activities in rat tissues. *Int J Dev Neurosci* 24(1):45–52. doi:[10.1016/j.ijdevneu.2005.10.005](https://doi.org/10.1016/j.ijdevneu.2005.10.005)
  24. Weis SN, Pettenuzzo LF, Krolow R, Valentim LM, Mota CS, Dalmaz C, Wyse AT, Netto CA (2012) Neonatal hypoxia ischemia induces sex-related changes in rat brain mitochondria. *Mitochondrion* 12(2):271–279. doi:[10.1016/j.mito.2011.10.002](https://doi.org/10.1016/j.mito.2011.10.002)
  25. Almeida RF, Comassetto DD, Ramos DB, Hansel G, Zimmer ER, Loureiro SO, Ganzella M, Souza DO (2016) Guanosine anxiolytic-like effect involves adenosinergic and glutamatergic neurotransmitter systems. *Mol Neurobiol*. doi:[10.1007/s12035-015-9660-x](https://doi.org/10.1007/s12035-015-9660-x)
  26. Benjamini Y, Drai D, Elmer G, Kafkafi N, Golani I (2001) Controlling the false discovery rate in behavior genetics research. *Behav Brain Res* 125(1–2):279–284
  27. Nikiforuk A, Popik P (2013) Neurochemical modulation of stress-induced cognitive inflexibility in a rat model of an attentional set-shifting task. *Pharmacol Rep* 65(6):1479–1488
  28. Quinton MS, Yamamoto BK (2007) Neurotoxic effects of chronic restraint stress in the striatum of methamphetamine-exposed rats. *Psychopharmacology* 193(3):341–350. doi:[10.1007/s00213-007-0796-x](https://doi.org/10.1007/s00213-007-0796-x)
  29. Moreira PS, Almeida PR, Leite-Almeida H, Sousa N, Costa P (2016) Impact of chronic stress protocols in learning and memory in rodents: systematic review and meta-analysis. *PLoS ONE* 11(9):e0163245. doi:[10.1371/journal.pone.0163245](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0163245)
  30. Mychasiuk R, Muhammad A, Kolb B (2016) Chronic stress induces persistent changes in global DNA methylation and gene expression in the medial prefrontal cortex, orbitofrontal cortex, and hippocampus. *Neuroscience* 322:489–499. doi:[10.1016/j.neuroscience.2016.02.053](https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2016.02.053)
  31. Hollis F, van der Kooij MA, Zanoletti O, Lozano L, Cantó C, Sandi C (2015) Mitochondrial function in the brain links anxiety with social subordination. *Proc Natl Acad Sci USA* 112(50):15486–15491. doi:[10.1073/pnas.1512653112](https://doi.org/10.1073/pnas.1512653112)
  32. Ishii T, Yasuda K, Miyazawa M, Mitsushita J, Johnson TE, Hartman PS, Ishii N (2016) Infertility and recurrent miscarriage with complex II deficiency-dependent mitochondrial oxidative stress in animal models. *Mech Ageing Dev* 155:22–35. doi:[10.1016/j.mad.2016.02.013](https://doi.org/10.1016/j.mad.2016.02.013)
  33. Hong IS, Lee HY, Kim HP (2014) Anti-oxidative effects of Rooibos tea (*Aspalathus linearis*) on immobilization-induced oxidative stress in rat brain. *PLoS ONE* 9(1):e87061. doi:[10.1371/journal.pone.0087061](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0087061)
  34. Aliev G, Palacios HH, Gasimov E, Obrenovich ME, Morales L, Leszek J, Bragin V, Solís Herrera A, Gokhman D (2010) Oxidative stress induced mitochondrial failure and vascular hypoperfusion as a key initiator for the development of alzheimer disease. *Pharmaceuticals* 3(1):158–187. doi:[10.3390/ph3010158](https://doi.org/10.3390/ph3010158)
  35. Guenzel FM, Wolf OT, Schwabe L (2014) Sex differences in stress effects on response and spatial memory formation. *Neurobiol Learn Mem* 109:46–55. doi:[10.1016/j.nlm.2013.11.020](https://doi.org/10.1016/j.nlm.2013.11.020)
  36. Razmara A, Duckles SP, Krause DN, Procaccio V (2007) Estrogen suppresses brain mitochondrial oxidative stress in female and male rats. *Brain Res* 1176:71–81. doi:[10.1016/j.brainres.2007.08.036](https://doi.org/10.1016/j.brainres.2007.08.036)
  37. Noschang CG, Krolow R, Pettenuzzo LF, Avila MC, Fachin A, Arcego D, von Pozzer Toigo E, Crema LM, Diehl LA, Vendite D, Dalmaz C (2009) Interactions between chronic stress and chronic consumption of CAFFEINE on the enzymatic antioxidant system. *Neurochem Res* 34(9):1568–1574. doi:[10.1007/s11064-009-9945-4](https://doi.org/10.1007/s11064-009-9945-4)
  38. Koufali MM, Moutsatsou P, Sekeris CE, Breen KC (2003) The dynamic localization of the glucocorticoid receptor in rat C6 glioma cell mitochondria. *Mol Cell Endocrinol* 209(1–2):51–60
  39. Gądek-Michalska A, Spyryka J, Rachwalska P, Tadeusz J, Bugajski J (2013) Influence of chronic stress on brain corticosteroid receptors and HPA axis activity. *Pharmacol Rep* 65(5):1163–1175
  40. Simpkins JW, Dykens JA (2008) Mitochondrial mechanisms of estrogen neuroprotection. *Brain Res Rev* 57(2):421–430. doi:[10.1016/j.brainresrev.2007.04.007](https://doi.org/10.1016/j.brainresrev.2007.04.007)
  41. Hojo Y, Higo S, Ishii H, Ooishi Y, Mukai H, Murakami G, Kominami T, Kimoto T, Honma S, Poirier D, Kawato S (2009) Comparison between hippocampus-synthesized and circulation-derived sex steroids in the hippocampus. *Endocrinology* 150(11):5106–5112. doi:[10.1210/en.2009-0305](https://doi.org/10.1210/en.2009-0305)
  42. Grimm A, Mensah-Nyagan AG, Eckert A (2016) Alzheimer, mitochondria and gender. *Neurosci Biobehav Rev* 67:89–101. doi:[10.1016/j.neubiorev.2016.04.012](https://doi.org/10.1016/j.neubiorev.2016.04.012)

## **CAPÍTULO II**

### **Objetivos, materiais, métodos e resultados.**

Efeito dos glicocorticóides sobre a massa e o potencial mitocondrial em células

SH-SY5Y diferenciadas em ácido retinóico



## **OBJETIVOS**

Este capítulo tem como objetivo verificar o efeito dos GCs sobre a MM e o PMM em células SH-SY5Y diferenciadas em ácido retinóico. Para isto, foi avaliado o efeito dos GCs sobre a massa e o potencial mitocondrial de células da linhagem celular SHSY5Y (neuroblastoma) diferenciadas com ácido retinóico para verificar se este tratamento altera a quantidade de mitocôndrias.

## **MATERIAL E MÉTODOS**

### *Cultura celular*

As células de neuroblastoma da linhagem SH-SY5Y (ATCC) foram incubadas a 37°C em atmosfera úmida com 95% de ar e 5% de CO<sub>2</sub> em mistura 1:1 de meio F12 de Ham e meio DMEM (*Dulbecco's modified Eagle's medium*) contendo 10% de soro fetal bovino (SFB), L-glutamina (2mM), penicilina (20 unidades/ml) e estreptomicina (20ug/ml). As células foram semeadas a uma densidade inicial de 10<sup>5</sup> células/cm<sup>2</sup> em placas de cultura de 96 poços. O meio celular foi renovado a cada 4 a 7 dias. As células cresceram até atingir 75% de confluência.

### *Diferenciação celular*

Para a diferenciação celular, um dia após o plaqueamento, o meio foi removido, retirando as células não aderidas, e foi adicionado meio de diferenciação; as culturas foram tratadas por 7 dias com 10 µM de ácido trans- retinóico em meio DMEM/F12 com 1% de soro fetal bovino. O soro foi trocado nos dias 4 e 7 da diferenciação.

### *Tratamento das SH-SY5Y com DEX*

As células diferenciadas foram tratadas com diferentes concentrações de DEX (Decadron® injetável) (1 nM, 10 nM, 50 nM, e 100 nM) por 24 e 48 horas. As células foram

semeadas e diferenciadas em placas de 96 poços e cada tratamento foi feito em 4 poços de células (quaduplicata). Ao concluir o tempo (24 ou 48 horas), as células foram dissociadas e o conteúdo de dois poços foram unidos em um tubo (finalizando em uma duplicata) para obtenção do número mínimo de eventos necessários os experimentos de citometria de fluxo. As células controles tiveram seus meios de cultura renovados juntamente com a troca do meio das células que receberam tratamento com DEX.

### ***Massa Mitocondrial e Potencial de Membrana Mitocondrial***

Para avaliação de MM e PMM das células de neuroblastoma SH-SY5Y através de citometria de fluxo, foram utilizados os corantes Mitotracker Red (MTR) e Mitotracker Green (MTG), respectivamente. Decorridos os tempos de tratamento descritos no item anterior, as células foram dissociadas e a marcação com MTR e MTG foi realizada conforme o Capítulo I, segundo o método descrito por Weis et al, 2012, com modificações.

O MTR é um corante fluorescente catiônico lipofílico que se concentra no interior da mitocôndria devido ao PMM negativo. A perda do potencial de membrana resulta em liberação do MTR da mitocôndria e subsequente redução da fluorescência. O MTG é um fluoróforo verde fluorescente que possui grupos cloro-metil que se ligam covalentemente aos grupos sulfidril mitocondriais. O MTG é utilizado para medir a MM independente do PMM (Weis et al, 2012).

### ***Análise estatística***

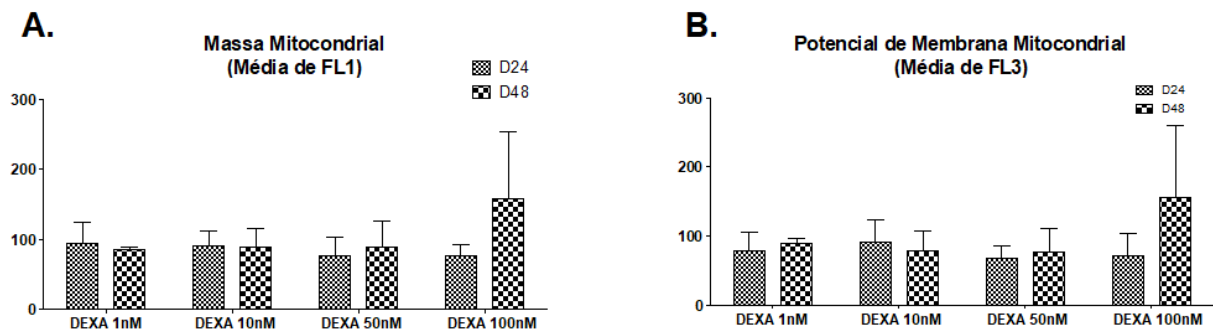
Os dados dos experimentos foram expressos como média  $\pm$  D.P. e foram analisados por ANOVA de uma via seguida de *post hoc* de Tuckey. Todos os testes foram analisados usando o programa GraphPad Prism versão 5.01 e os valores de  $P < 0,05$  foram considerados significativos.

## RESULTADOS

No Capítulo I desta tese foi observado que o ECC levou a alterações na atividade de complexos da cadeia transportadora de elétrons de maneira sexo específica sem alterações na MM ou PMM avaliados através do uso dos marcadores MTR e MTG. Devido ao fato de tratar-se de um tratamento crônico não foi possível determinar se o estresse provocou uma alteração de biogênese mitocondrial inicial, que depois, com a habituação do animal desapareceu e somente as alterações pontuais na atividade permaneceram e nem qual foi o papel dos GCs nessas alterações. Na tentativa de esclarecer os efeitos encontrados no Capítulo I, no Capítulo II foi avaliado o efeito de diferentes doses do GC sintético DEX sobre o PMM e MM das células de neuroblastoma humano SH-SY5Y. O objetivo dessa avaliação foi verificar se a ativação direta dos RGs eram capazes de causar alteração na quantidade e/ou atividade mitocondrial.

As células SH-SY5Y foram diferenciadas por 7 dias com ácido retinóico e posteriormente tratadas com diferentes doses de DEX durante 24 ou 48 horas. Neste estudo, a exposição à DEX não afetou significativamente nem a MM, nem o PMM das células em nenhuma das doses testadas (Figura 1).

Além disso, foi realizado o tratamento das células SH-SY5Y diferenciadas com a dose de 1  $\mu$ M de DEX, porém, devido à elevada morte celular, as células sobreviventes geraram um número de eventos muito inferior ao obtido nos demais tratamentos e os dados não foram apresentados.



**Figura 1:** Efeitos dos tratamentos com dexametasona sobre a massa (A) e potencial de membrana (B) mitocondriais de células SH-SY5Y diferenciadas por 24 e 48 horas. Os dados foram analisados por ANOVA de uma via seguida de *post hoc* de Tuckey e as médias das fluorescências foram expressas como percentual do controle  $\pm$  D.P. de 3 experimentos cada tempo de diferenciação.

## **CAPÍTULO III**

### **Objetivos, materiais, métodos e resultados.**

Efeito do tratamento com os glicocorticóides dexametasona ou corticosterona sobre a massa e o potencial mitocondrial de suspensão de células totais, neurônios e sinaptossomas de estriado e hipocampo de camundongos.

## **OBJETIVOS**

Este Capítulo teve como objetivo verificar o efeito do tratamento com os GCs dexametasona ou corticosterona sobre a MM e o PMM de suspensão de células totais, neurônios e sinaptossomas de estriado e hipocampo de camundongos. Para isto, foi simulado um estado e hipocorticóide no cérebro e verificado o efeito sobre MM ou PMM de suspensão de células totais, de neurônios (células positivas para sinaptotagamina) e de sinaptossomas.

## **MATERIAL E MÉTODOS**

### *Animais*

Foram utilizados 20 camundongos machos C57BL6 com 60 dias, pesando aproximadamente 30 gramas no início do tratamento, provenientes do biotério do Departamento de Bioquímica da Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

Os animais foram separados em grupos de 5 em caixas Plexiglas contendo maravalha e foram mantidos em um ciclo claro-escuro de 12 horas (luzes acesas entre 7:00 e 19:00), à temperatura de  $22 \pm 2^\circ\text{C}$ . Os animais tiveram livre acesso à comida (ração padrão) e à água.

O presente projeto foi submetido e aprovado no comitê de ética dessa universidade (CEUA-UFRGS, projeto número 2008102). Além disso, todos os procedimentos que constam nesse trabalho foram realizados de forma padrão e sempre visando minimizar o desconforto dos animais envolvidos.

### *Tratamento*

Os camundongos foram tratados por via subcutânea diariamente por 14 dias com CORT 40mg/kg/dia (Zhao et al, 2008) ou com DEX 0,5mg/kg/dia (Takahashi et al, 1996). A DEX foi adquirida pronta para uso (Decadron® injetável) e a CORT (SIGMA) foi preparada

de acordo com Zhao e colaboradores (2008), em salina com 0,1% de Dimetil Sulfóxido e 0,1% de Tween 80.

Os animais foram divididos aleatoriamente em 4 grupos: Salina (recebiam salina), DEX (recebiam DEX), Controle (recebiam veículo de preparo da CORT) e CORT (recebiam CORT).

### ***Nado forçado***

Vinte e quatro horas após o final do tratamento, os animais foram colocados individualmente em cilindros de vidro (plexiglass, 40cm de altura, 18 cm de diâmetro) cheios com água a 25°C. Foi feita uma sessão de 15 minutos de habituação seguido de 5 minutos de teste. O tempo de imobilidade foi determinado quando nenhuma atividade adicional foi observada, além dos movimentos necessários para que os animais se mantivessem com a cabeça para fora da água. Nado foi considerado quando os animais demonstraram movimentos de nado ativo, por exemplo, se movendo em círculos dentro do cilindro.

### ***Suspensão de células totais, neurônios e Sinaptossomas***

O preparo da suspensão de células e o isolamento e análise dos sinaptossomas de estriado e hipocampo de camundongos tratados com DEX ou CORT foram realizados conforme descrito nos métodos do Capítulo I desta tese. O dissociado de células de estriado e hipocampo foi dividido em células totais e células marcadas com sinaptotagamina (neurônios). Para a marcação com sinaptotagamina, as células dissociadas foram incubadas com sinaptotagamina 1 (Abcam) em concentração 1:200 e Anticorpo secundário Alexa Fluor 635 (1:500) juntamente com os fluoróforos MTR e MTG, sob as mesmas condições de preparo.

### ***Massa Mitocondrial e Potencial de Membrana Mitocondriais***

Após o preparo dos sinaptossomas dos camundongos descrito anteriormente, a suspensão de células totais, os neurônios e os sinaptossomas foram utilizados para a avaliação do PMM e MM através de citometria de fluxo, utilizando os corantes MTR e MTG pelo método de Weis et al (2012), conforme descrito no Capítulo I.

### ***Análise estatística***

Os dados dos experimentos foram expressos como média  $\pm$  D.P. e foram analisados por ANOVA de uma via, seguida de *post hoc* de Tuckey, ou teste de Mann Whitney (dados não paramétricos), seguido de *post hoc* de Dunn, quando apropriado. Todos os testes foram analisados usando o programa GraphPad Prism versão 5.01 e os valores de  $P < 0,05$  foram considerados significativos.

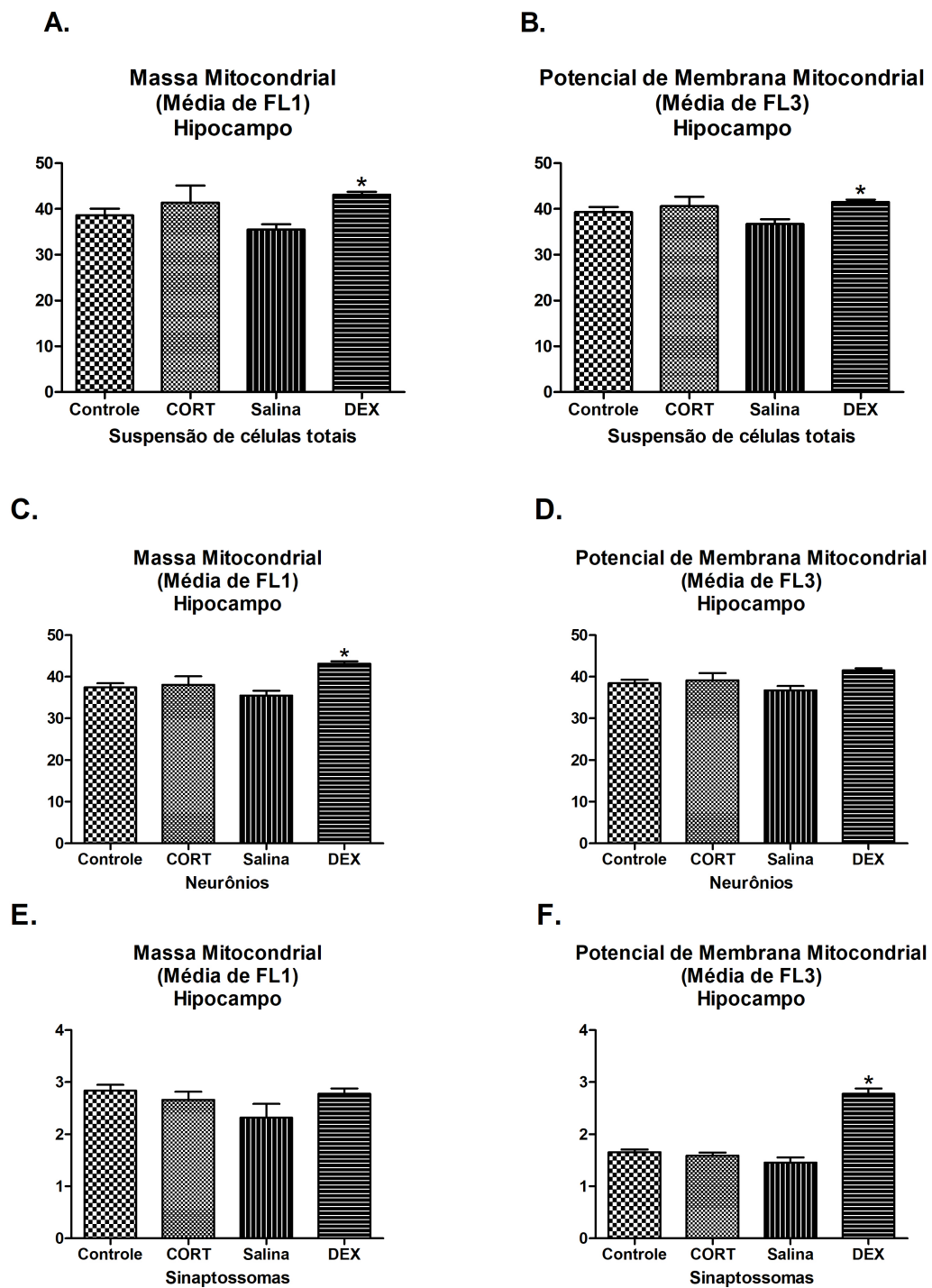


## RESULTADOS

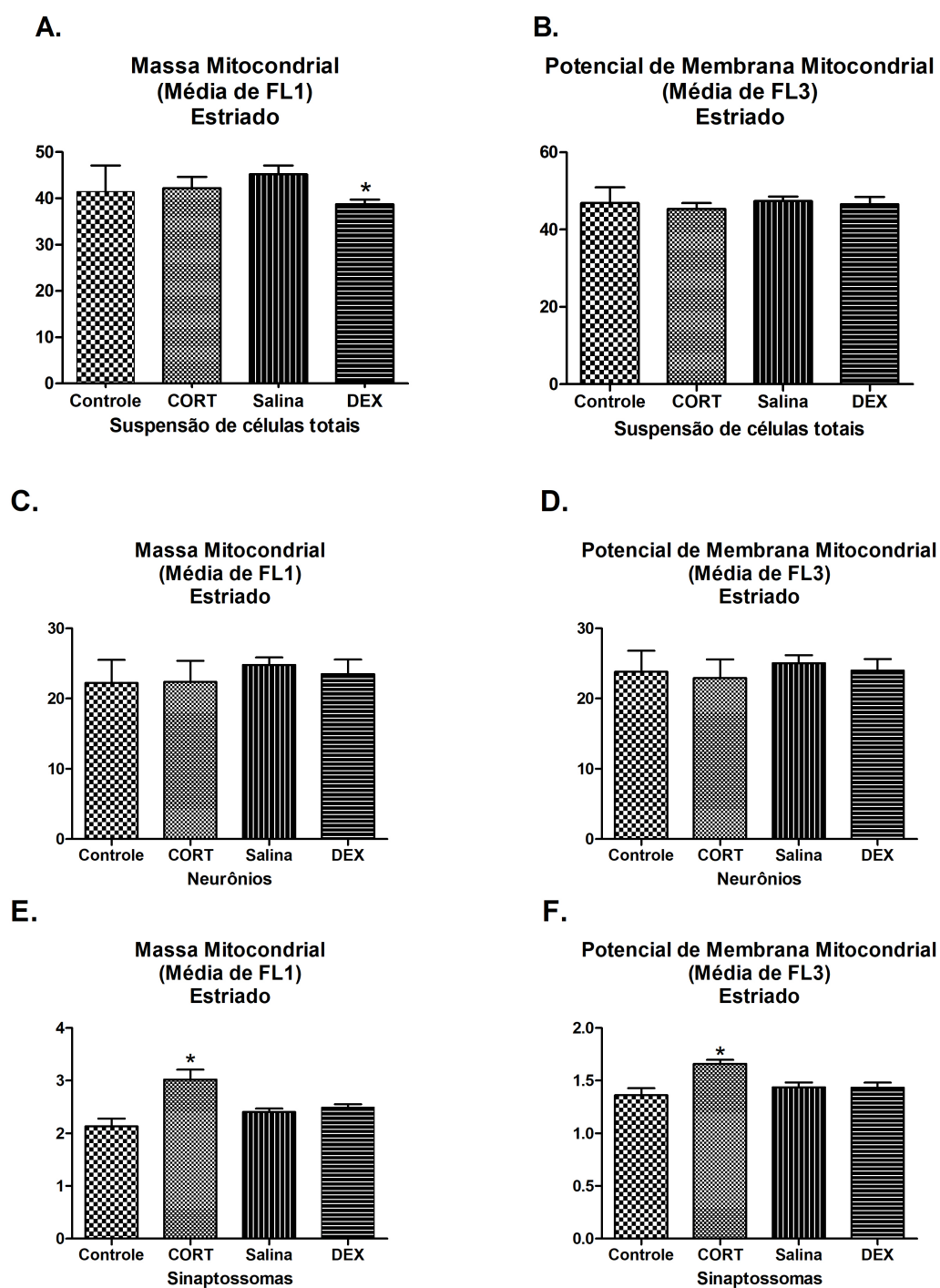
Uma vez que no Capítulo II observamos que a presença do GC *per se* não afetou os parâmetros mitocondriais testados, e que a adaptação ao estresse pode envolver uma diminuição da sensibilidade aos GCs, no capítulo III testamos se a falta do GC pode afetar a quantidade de mitocôndrias em neurônios. Além disso, uma vez que os efeitos do estresse descritos no Capítulo I foram mais proeminentes nos machos, neste Capítulo camundongos machos foram tratados com CORT (40mg/kg) e DEX (1mg/kg) por 14 dias, para simular um estado hiper e hipocorticoide no cérebro e verificar o efeito sobre a MM e o PMM em células totais e sinaptossomas.

Os camundongos tratados com DEX apresentaram, em hipocampo, um aumento na MM (Figura 1.A.;  $P = 0,0012$ ) e PMM (Figura 1.B.;  $P = 0,0072$ ) em suspensão de células totais, na MM dos neurônios ( $P = 0,0090$ ) e no PMM de sinaptossomas (Figura 1.F;  $P < 0,0001$ ). A CORT não afetou significativamente a MM e o PMM em células totais, neurônios ou sinaptossomas de hipocampo.

Em estriado, a DEX levou a uma redução da MM em suspensão de células totais (Figura 2.A.;  $P = 0,0159$ ). Por outro lado, o tratamento com CORT aumentou a MM (Figura 2.E.;  $P = 0,0014$ ) e o PMM (Figura 2.F.;  $P = 0,0043$ ) de sinaptossomas de estriado.



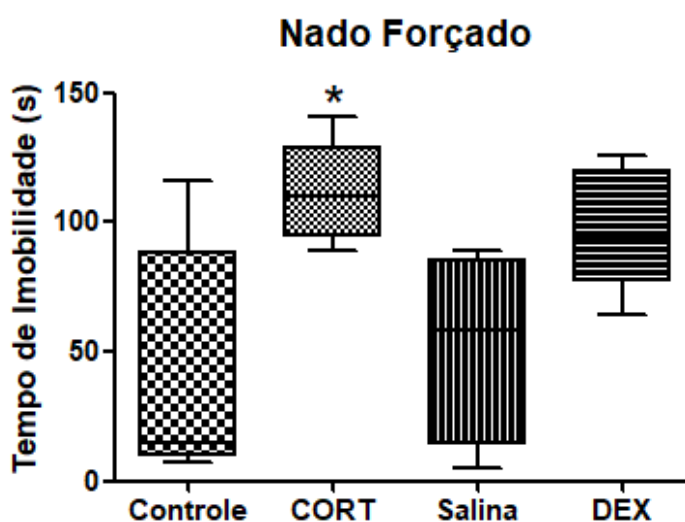
**Figura 1:** Efeitos dos tratamentos com corticosterona e dexametasona sobre a massa e potencial de membrana mitocondriais de células totais (A. e B.), neurônios (C. e D.) e sinaptossomas (E. e F.) de hipocampo de camundongos. Os dados foram analisados por ANOVA de uma via seguido do teste de Tukey, e foram expressos como média das fluorescências  $\pm$  D.P. (\* $P < 0,05$ ).



**Figura 2:** Efeitos dos tratamentos com corticosterona e dexametasona sobre a massa e potencial de membrana mitocondriais de células totais (A. e B.), neurônios (C. e D.) e sinaptossomas (E. e F.) de estriado de camundongos. Os dados foram analisados por ANOVA de uma via seguido do teste de Tukey, e foram expressos como média das fluorescências  $\pm$  D.P. (\* $P < 0,05$ ).

Neste capítulo também foi realizado o teste do nado forçado, teste comportamental utilizado para detectar comportamento tipo depressivo nos animais (Porsolt et al, 1977), decorrente do tratamento utilizado neste capítulo.

Os animais que receberam a CORT tiveram um tempo de imobilização maior em relação aos camundongos controle (Figura 3,  $P = 0,0085$ ), confirmando que nos animais submetidos a estes tratamentos desenvolveram comportamento tipo depressivo. Os animais tratados com DEX não tiveram resultados estatisticamente diferentes dos controles nesse teste.



**Figura 3:** Teste do Nado Forçado em camundongos tratados com corticosterona ou dexametasona. Os dados foram analisados por Teste de Mann Whitney seguido de teste de Dunn (não paramétrico) e foram expressos como tempo de imobilidade em segundos (s)  $\pm$  D.P. (\* $P < 0,05$ ).

## **PARTE III: DISCUSSÃO E CONCLUSÕES**

## DISCUSSÃO

Esta tese teve como foco principal avaliar os efeitos dos GCs sobre alterações relacionadas com quantidade e distribuição mitocondrial em modelos de ativação do RG, tanto no estresse por contenção (**Capítulo I**) quanto na administração de DEX em células (**Capítulo II**) e CORT ou DEX (hiper ou hipocorticóide cerebral) em camundongos (**Capítulo III**).

No **Capítulo I** deste trabalho consta um artigo científico, publicado na revista *Neurochemical Research* (Mota et al, 2017), onde foi avaliado o efeito do estresse sobre o imunocontéudo de RGs de córtex, estriado e hipocampo de ratos machos e fêmeas submetidos a 40 dias de ECC. Neste mesmo modelo e estruturas, também foi avaliado o efeito do estresse sobre a MM e PMM em suspensões de células e sinaptossomas. Estes dados foram publicados, conjuntamente com dados anteriores de nosso grupo, onde foi demonstrado que o ECC aumentava a atividade de complexos da cadeia respiratória em cérebro de ratos de maneira sexo-específica.

A principal descoberta neste trabalho foi que o ECC afetou a atividade da cadeia respiratória mitocondrial em córtex, hipocampo e estriado de ratos de maneira sexo-específica, *sem* alteração na MM, PMM ou conteúdo de RGs. Brevemente, em estriado verificou-se uma redução na atividade do complexo II em machos e aumento em fêmeas, aumento na atividade do complexo I-III em machos e fêmeas e efeito do sexo na atividade do complexo IV; em hipocampo, foi verificado um aumento na atividade do complexo I-III em machos e fêmeas, e efeito do sexo na atividade do complexo II, do complexo IV e no imunocontéudo de RGs; em córtex ocorreu um aumento na atividade do complexo I-III em ambos os sexos, uma redução na atividade do complexo IV em machos, um aumento na atividade deste complexo em fêmeas e efeito do sexo no imunocontéudo de RGs. As mitocôndrias são fundamentais para a síntese de ATP, equilíbrio redox e produção de espécies

reativas de oxigênio (Flippo e Strack, 2017-a). No estudo de Hunter e colaboradores (2016), foi observado que estresse agudo levou a um aumento na expressão do complexo I mitocondrial em hipocampo, o primeiro passo em que o fluxo de elétrons é iniciado. Além disso, o ECC também levou a um aumento na expressão deste complexo. Isto está de acordo com o aumento na atividade deste complexo em córtex de ratas, demonstrada no **Capítulo I**. O complexo II desempenha funções fundamentais na mitocôndria, é um complexo de atividade crucial, cujo desequilíbrio está envolvido com diversas patologias (Tretter et al, 2016) e sua inibição é capaz de aumentar a produção de espécies reativas de oxigênio (Indo et al, 2007; Liot et al, 2009). Neste mesmo modelo de estresse, o estudo de Noschang e colaboradores (2009) mostrou que o ECC aumentou a atividade das enzimas antioxidantes Superóxido Dismutase e Glutathione Peroxidase em estriado, e também aumentou a razão entre estas enzimas em hipocampo. Este resultado em conjunto com os aumentos da atividade dos complexos mitocondriais descritos no **Capítulo I**, pode estar relacionado com a geração de espécies reativas de oxigênio após estresse crônico (Razmara et al, 2007; Indo et al, 2007; Liot et al, 2009; Ishii et al, 2016) e, conseqüentemente, estar alterando a atividade mitocondrial e de seus complexos.

Adicionalmente foram analisados o PMM e a MM de dissociado de células totais e sinaptossomas de hipocampo, estriado e córtex dos ratos submetidos ao ECC. A análise da MM foi feita para verificar se os aumentos observados nas atividades dos complexos da cadeia respiratória eram devidos ao aumento na MM, isto é, na quantidade de mitocôndria. Um aumento na MM pode ser interpretado como aumento na quantidade de mitocôndrias ou *swelling* mitocondrial. Por outro lado, o estresse, como muitos compostos indutores de apoptose, pode prejudicar o PMM levando à abertura do poro de permeabilidade mitocondrial levando assim ao *swelling* mitocondrial. Neste contexto, o aumento observado na atividade dos complexos não parece estar envolvido com quantidade de mitocôndrias, visto que não

observamos diferenças significativas na MM e PMM em nenhuma das estruturas avaliadas neste estudo.

Quanto aos RGs, o ECC não afetou significativamente seu conteúdo, porém, foi observado um efeito do sexo, onde as fêmeas apresentaram imunocorrelato maior que o dos machos em córtex e hipocampo. De acordo com os achados em modelos de estresse por contenção por diferentes tempos, os níveis de RGs geralmente são reduzidos em machos (Gadek-Michalska et al, 2013) e podem não ser afetados pelo estresse em fêmeas (Kitraki et al, 2004).

Sabe-se que existem diferenças na resposta ao estresse pelo eixo HPA de machos e fêmeas, como por exemplo, as concentrações plasmáticas de CORT. Ratas possuem níveis de CORT basais mais altos em comparação com machos, e estes níveis variam de acordo com o ciclo estral (Herman et al, 2016). Portanto, apesar de não estar claro qual o mecanismo que envolve o estradiol na resposta do eixo HPA, sabe-se que seus níveis circulantes são importantes contribuintes na resposta dimórfica ao estresse (Simpkins e Dykens, 2008). O presente estudo demonstrou que o estresse altera a atividade dos complexos mitocondriais de maneira sexo-específica. Neste estudo não foram avaliadas as fases do ciclo estral em que as fêmeas se encontravam, visto que o ECC foi aplicado por 40 dias, abrangendo todas as fases em que elas passaram por todo o período, não focando em avaliar o estresse em uma fase específica.

Uma possibilidade neste modelo é que o ECC tenha levado a uma dessensibilização dos RGs aos elevados níveis de GCs, ou uma habituação do animal ao procedimento, onde os níveis de GCs liberados teriam normalizado ao longo do tempo. Uma vez que a eutanásia dos animais, onde foi avaliada a atividade dos complexos da cadeia transportadora de elétrons, foi realizada 24 horas após a última sessão de estresse, acreditamos que as alterações mitocondriais observadas não tenham sido causadas pela presença dos GCs *per se*.



No **Capítulo I**, o modelo utilizado não permitiu esclarecer se esse aumento na atividade de cadeia respiratória estava relacionado com uma biogênese mitocondrial inicial provocada pelos GCs que não foi observada no final do tratamento devido a variabilidades entre as respostas dos animais, somada à possível adaptação ao tratamento crônico ou se o estresse afetava especificamente a atividade complexos da cadeia transportadora de elétrons.

No **Capítulo II** estudamos se a ativação direta dos RGs com doses não tóxicas de DEX (Budni et al, 2011; Iqbal et al, 2015) era capaz de alterar a quantidade de mitocôndrias a curto prazo. Para isso, avaliou-se o efeito do tratamento por 24 ou 48 horas com diferentes doses de DEX sobre a MM e o PMM em células de neuroblastoma SH-SY5Y diferenciadas com ácido retinóico. Uma vez que os neurônios provenientes da diferenciação desta linhagem celular em ácido retinóico apresentam marcadores neuronais específicos, tais como, tirosina hidroxilase, enolase-2 e b-III-tubulina (Cheung et al, 2009; Jung et al, 2012), estas células foram utilizadas como modelo neuronal. É importante lembrar que esse estudo foi realizado utilizando os tempos de 24 e 48 horas, que nenhum outro hormônio relacionado com o estresse foi usado e que, nas condições de cultura, pouquíssimas adaptações que podem ocorrer *in vivo* poderiam ser reproduzidas. Portanto, nessa etapa, o objetivo foi avaliar o efeito direto e por um curto período da ativação dos RGs sobre a quantidade de mitocôndrias. Neste estudo, a presença do GC *per se* não afetou, em nenhuma dose não tóxica utilizada, nem a MM, nem o PMM das células SH-SY5Y diferenciadas em nenhum dos tempos de tratamento. Portanto, concluímos que doses não tóxicas de DEX não alteram a quantidade de mitocôndrias bem como sua atividade. Em nossos estudos também utilizamos a dose de 1 $\mu$ M de DEX, porém essa dose demonstrou elevada toxicidade (dados não apresentados).

Por fim, como a ativação direta do RGs por um curto período nas células não esclareceu as dúvidas geradas no **Capítulo I**, no **Capítulo III** testamos os efeitos de altas doses de CORT por um período mais longo, *in vivo*, permitindo assim algumas adaptações do

animal. Também testamos o efeito da diminuição dos GCs no cérebro utilizando um modelo hipocorticoide com DEX. O racional para testar o efeito da diminuição do GC é que em nosso modelo do estresse a adaptação do animal em longo prazo pode estar ocorrendo por diminuição da sensibilidade ao GC e conseqüentemente da resposta ao hormônio. Nesse sentido decidimos estudar se os efeitos observados poderiam ser devidos à diminuição e não aumento dos GCs.

Foi demonstrado na literatura que o tratamento prolongado com DEX em altas doses (0,5mg/kg/dia, 21 dias) geram um estado de hipocorticoide seletivo no cérebro (Drakulić et al, 2015). Este estado hipocorticoide no cérebro ocorre devido ao fato de a DEX, ao contrário dos GCs produzidos *in vivo*, não conseguir atravessar facilmente a barreira hemato-encefálica (Schinkel et al, 1995; Meijer et al, 1998; Karssen et al, 2002). Por ser agonista dos RGs, a DEX se liga a estes receptores periféricamente, inibindo a produção endógena de GCs, e, conseqüentemente, reduzindo a concentração destes no cérebro (Karssen et al, 2005).

Os animais também foram tratados com CORT na dose de 40mg/kg durante o mesmo período. Para este estudo, foram utilizadas suspensões de células totais e sinaptossomas. Devido ao fato de nosso preparado de células totais apresentar uma diversidade de tipos celulares e o nosso foco ser os neurônios, utilizamos um marcador específico de neurônios, a sinaptotagmina 1 (Cahoy et al, 2008). A sinaptotagmina 1 é uma proteína vital, que atua como sensor de cálcio para a fusão de vesículas sinápticas, bem como pela liberação sincronizada de neurotransmissores para subconjuntos de neurônios (Zhou et al, 2017). Apesar de esta proteína representar melhor a sinapse do que o corpo neuronal, no modelo de dissociação utilizado neste estudo (descrito no **Capítulo I**) ocorre retração dos processos, e, portanto, as células em suspensão apresentam proteínas sinápticas, então os eventos detectados por citometria como positivos para esta proteína (marcados) foram considerados neurônios.

O tratamento com DEX, em hipocampo, provocou um aumento na MM de neurônios, do PMM de sinaptossomas e de ambos, MM e PMM, na suspensão de células totais. As suspensões de células totais de estriado tiveram redução na MM após o tratamento com DEX. Estes dados demonstram que as células e os sinaptossomas de neurônios de hipocampo estão apresentando maior quantidade de mitocôndria, e que essas mitocôndrias são funcionais. A causa desse aumento pode ser uma diminuição da degradação de mitocôndrias ou aumento de biogênese. Este efeito pode ser devido ao estado de hipocorticóide, e a redução dos GCs no cérebro decorrente do tratamento com DEX pode estar envolvida com a biogênese mitocondrial como um mecanismo adaptativo

Por outro lado, o tratamento com CORT afetou somente estriado, onde aumentou a quantidade de mitocôndrias em sinaptossomas demonstrada pelo aumento na MM e PMM. Estas alterações na função mitocondrial foram acompanhadas de alterações comportamentais, visto que foi verificado um comportamento do tipo depressivo nos camundongos tratados com CORT através do nado forçado. Essa dose de CORT administrada provavelmente foi mais alta do que a quantidade de CORT liberada no nosso modelo de estresse, uma vez que em nosso modelo não leva os animais a apresentarem comportamento do tipo depressivo (Gregus et al, 2005). O tratamento com DEX não levou a alterações comportamentais significativas, talvez devido à dose de 0,5mg/kg/dia. Skupio e colaboradores (2015) demonstraram que o tratamento prolongado de camundongos com DEX (4mg/kg) aumentou o tempo de imobilidade no teste do nado forçado e, adicionalmente, levou a alterações cerebrais, tais como redução na expressão do mRNA dos RGs e aumento na expressão de genes de proteínas relacionadas com a resposta ao estresse (Fkbp5 e Sgk1) em córtex, hipocampo e estriado. Porém as doses utilizadas no estudo de Skupio foram maiores do que as utilizadas no presente trabalho.

Portanto, é possível que os resultados encontrados no **Capítulo I** tenham ocorrido devido a uma adaptação do animal ao ECC e isso tenha levado a uma dessensibilização dos RGs devido à exposição prolongada a elevados níveis de GCs. A alteração na quantidade de mitocôndrias observada estaria mais relacionada com a diminuição da sensibilidade aos GCs do que a presença de altas doses destes. Portanto, é possível que mesmo com a presença deste GC em altas concentrações no cérebro, ainda assim os RGs estejam hiporresponsivos, apresentando um efeito semelhante ao de hipocorticóide resultante do tratamento com a DEX, e levando à biogênese mitocondrial. Por outro lado, é possível também que exista um envolvimento de outras ações dos GCs que estejam levando a estas alterações. Os GCs são amplamente utilizados para tratamentos de condições inflamatórias e auto-imunes devido às suas ações anti-inflamatórias e imunossupressoras (Meijer et al, 2017). Porém, seu uso crônico é nocivo, uma vez que podem potencializar ou reduzir processos neuroinflamatórios, dependendo da dose, tempo e duração da exposição (Skupio et al, 2015). Os mecanismos através dos quais os GCs exercem estas ações ainda são desconhecidos, no entanto, sabe-se que se os GCs exercem efeitos anti-proinflamatórios é dependente do contexto, com resposta variável dependente da concentração, tempo de exposição, tipo composto e natureza do estímulo (Vasconcelos et al, 2016). Todavia, seria necessária uma investigação específica neste contexto para elucidar se esta correlação de fato existe.

## CONCLUSÕES

Na presente tese foi feito o estudo das alterações relacionadas com quantidade e distribuição mitocondrial em modelos de ativação do receptor de glicocorticóide, do efeito dos GCs e da ausência destes sobre as mitocôndrias cerebrais em diferentes modelos de estudos experimentais, seja *in vivo* (**Capítulo I** - produção e liberação de GCs de ratos estressados cronicamente e **Capítulo III** - camundongos tratados com DEX ou CORT) ou *in vitro* (**Capítulo II** - tratamento com DEX de células de neuroblastoma diferenciadas).

Neste estudo testamos a DEX em células diferenciadas e indiferenciadas (dados das células indiferenciadas não apresentados) por 24 e 48 horas de tratamento e não observamos alterações nas quantidades de mitocôndrias. Provavelmente o efeito observado nos animais estressados precisa de mais tempo para ocorrer ou ocorre por outro mecanismo que não seja ativação do RG.

A relação entre GCs e mitocôndria, como esperado, é complexa. Seus efeitos dependem da dose, duração e da própria sensibilidade intrínseca do animal. Em geral a adaptação ao estresse crônico parece envolver biogênese mitocondrial, e essa biogênese está mais relacionada com a diminuição da sensibilidade aos GCs do que a presença de altas doses destes. Nessa adaptação, até a distribuição celular das mitocôndrias pode ser afetada, com um maior envio de mitocôndrias para a região sináptica para lidar com uma possível sobrecarga de cálcio ou aumento de demanda energética. Toda essa adaptação ao estresse pode ser benéfica, favorecendo o indivíduo em períodos de maior estresse ou até mesmo algum insulto. Porém, ainda não é possível saber como essa adaptação se comportará conforme o organismo envelhece, se ela continuará sendo benéfica, ou se as doses de GCs e carga de estresse passíveis de adaptação mudam ao longo da vida. Pode ser que o estresse crônico de intensidade leve a moderada possa continuar sendo benéfico e signifique uma certa neuroproteção, mas também é possível que com o envelhecimento a carga de glicocorticóides

passível de adaptação diminua e os efeitos do estresse moderado comecem a se assemelhar aos encontrados em outros trabalhos de estresse crônico variado que tornam os neurônios mais sensíveis a insultos e ocorra inclusive morte neuronal. Mais estudos são necessários para entender o desenvolvimento de muito longo prazo a adaptações ao estresse e como essas células adaptadas reagem a um insulto.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Agholme L, Lindström T, Kågedal K, Marcusson J, Hallbeck M (2010). An *in vitro* model for neuroscience: differentiation of SH-SY5Y cells into cells with morphological and biochemical characteristics of mature neurons. *J Alzheimers Dis.* 20(4):1069-82. doi: 10.3233/JAD-2010-091363.
- Azuma K, Zhou Q, Niwa M, Kubo KY (2017). Association between Mastication, the Hippocampus, and the HPA Axis: A Comprehensive Review. *Int J Mol Sci.* 18(8). pii: E1687. doi: 10.3390/ijms18081687.
- Bangasser DA, Wicks B (2017). Sex-specific mechanisms for responding to stress. *J Neurosci Res.* 95(1-2):75-82. doi: 10.1002/jnr.23812.
- Bourke CH, Harrell CS, Neigh GN (2012). Stress-Induced Sex Differences: Adaptations Mediated by the Glucocorticoid Receptor. *Horm Behav.* 62(3): 210–218. doi: 10.1016/j.yhbeh.2012.02.024
- Budni J, Romero A, Molz S, Martín-de-Saavedra MD, Egea J, Del Barrio L, Tasca CI, Rodrigues AL, López MG (2011). Neurotoxicity induced by dexamethasone in the human neuroblastoma SH-SY5Y cell line can be prevented by folic acid. *Neuroscience.* 190:346-53. doi: 10.1016/j.neuroscience.2011.05.053. Epub 2011 May 31.
- Cahoy JD, Emery B, Kaushal A, Foo LC, Zamanian JL, Christopherson KS, Xing Y, Lubischer JL, Krieg PA, Krupenko SA, Thompson WJ, Barres BA (2008). A transcriptome database for astrocytes, neurons, and oligodendrocytes: a new resource for understanding brain development and function. *J Neurosci.* 28(1):264-78. doi: 10.1523/JNEUROSCI.4178-07.2008.
- Calkins MJ, Manczak M, Mao P, Shirendeb U, Reddy PH (2011). Impaired mitochondrial biogenesis, defective axonal transport of mitochondria, abnormal mitochondrial dynamics and synaptic degeneration in a mouse model of Alzheimer's disease. *Hum Mol Genet.* 20(23):4515-29. doi: 10.1093/hmg/ddr381.
- Cheung YT, Lau WK, Yu MS, Lai CS, Yeung SC, So KF, Chang RC (2009). Effects of all-trans-retinoic acid on human SH-SY5Y neuroblastoma as *in vitro* model in

neurotoxicity research. *Neurotoxicology* 30(1):127-35. doi: 10.1016/j.neuro.2008.11.001.

- Drakulic D, Stanojlovic M, Nedeljkovic N, Grkovic I, Velickovic N, Guševac I, Mitrovic N, Buzadžic I, Horvat A (2015). Upregulation of nucleoside triphosphate diphosphohydrolase-1 and ecto-5'-nucleotidase in rat hippocampus after repeated low-dose dexamethasone administration. *J Mol Neurosci.* 55(4):959-67. doi: 10.1007/s12031-014-0452-y.
- Du J, Wang Y, Hunter R, Wei Y, Blumenthal R, Falke C, Khairova R, Zhou R, Yuan P, Machado-Vieira R, McEwen BS, Manji HK (2009). Dynamic regulation of mitochondrial function by glucocorticoids. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 106(9):3543-8. doi: 10.1073/pnas.0812671106.
- Finsterer J, Frank M. Glucocorticoids for mitochondrial disorders. *Singapore Med J.* 2015 Feb; 56(2): 122–123. doi: 10.11622/smedj.2015026
- Flippo KH, Strack S (a) (2017). An emerging role for mitochondrial dynamics in schizophrenia. *Schizophr Res.* 187:26-32. doi: 10.1016/j.schres.2017.05.003. Epub 2017 May 16.
- Flippo KH, Strack (b) (2017). Mitochondrial dynamics in neuronal injury, development and plasticity. *J Cell Sci.* 130(4):671-681. doi: 10.1242/jcs.171017. Epub 2017 Feb 2.
- Gądek-Michalska A, Spyrka J, Rachwalska P, Tadeusz J, Bugajski J (2013). Influence of chronic stress on brain corticosteroid receptors and HPA axis activity. *Pharmacol Rep.* 65(5):1163-75.
- Gordijn MS, Rensen N, Gemke RBJ, Dalen ECV, Rotteveel J, Kaspers GJL (2015). Hypothalamic-pituitary-adrenal (HPA) axis suppression after treatment with glucocorticoid therapy for childhood acute lymphoblastic leukaemia. *Cochrane Childhood Cancer Group.* doi: 10.1002/14651858.CD008727.pub3
- Gray JD, Kogan JF, Marrocco J, McEwen BS (2017). Genomic and epigenomic mechanisms of glucocorticoids in the brain. *Nat Rev Endocrinol.* doi: 10.1038/nrendo.2017.97.
- Gregus A, Wintink AJ, Davis AC, Kalynchuk LE (2005). Effect of repeated corticosterone injections and restraint stress on anxiety and depression-like behavior in male rats. *Behav Brain Res.* 156(1):105-14.



- Herman JP, McKlveen JM, Ghosal S, Kopp B, Wulsin A, Makinson R, Scheimann J, Myers B (2016). Regulation of the hypothalamic-pituitary-adrenocortical stress response. *Compr Physiol.* 6(2): 603–621. doi: 10.1002/cphy.c150015
- Hu Q, Wang G (2016). Mitochondrial dysfunction in Parkinson's disease. *Transl Neurodegener.* 5: 14. doi: 10.1186/s40035-016-0060-6
- Hu H, Tan CC, Tan L, Yu JT (2016). A Mitocentric View of Alzheimer's Disease. *Mol Neurobiol.* [Epub ahead of print]
- Hunter RG, Seligsohn M, Rubin TG, Griffiths BB, Ozdemir Y, Pfaff DW, Datson NA, McEwen BS (2016). Stress and corticosteroids regulate rat hippocampal mitochondrial DNA gene expression via the glucocorticoid receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 113(32):9099-104. doi: 10.1073/pnas.1602185113. Epub 2016 Jul 25.
- Indo HP, Davidson M, Yen HC, Suenaga S, Tomita K, Nishii T, Higuchi M, Koga Y, Ozawa T, Majima HJ (2007). Evidence of ROS generation by mitochondria in cells with impaired electron transport chain and mitochondrial DNA damage. *Mitochondrion.* 7(1-2):106-18.
- Iqbal S, Howard S, LoGrasso PV (2015). Serum- and Glucocorticoid-Inducible Kinase 1 Confers Protection in Cell-Based and in *In Vivo* Neurotoxin Models via the c-Jun N-Terminal Kinase Signaling Pathway. *Mol Cell Biol.* 35(11):1992-2006. doi: 10.1128/MCB.01510-14.
- Ishii T, Takanashi Y, Sugita K, Miyazawa M, Yanagihara R, Yasuda K, Onouchi H, Kawabe N, Nakata M, Yamamoto Y, Hartman PS, Ishii N (2017). Endogenous reactive oxygen species cause astrocyte defects and neuronal dysfunctions in the hippocampus: a new model for aging brain. *Aging Cell.* (1):39-51. doi: 10.1111/accel.12523.
- Jeanneteau F, Arango-Lievano M (2016). Linking Mitochondria to Synapses: New Insights for Stress-Related Neuropsychiatric Disorders. *Neural Plast.* 2016: 3985063. doi: 10.1155/2016/3985063
- Jung GS, Lee KM, Park JK, Choi SK, Jeon WB (2013). Morphogenetic and neuronal characterization of human neuroblastoma multicellular spheroids cultured under undifferentiated and all-trans-retinoic acid-differentiated conditions. *BMB Rep.* 46(5): 276–281. doi: 10.5483/BMBRep.2013.46.5.196

- Karssen AM, Meijer OC, van der Sandt IC, De Boer AG, De Lange EC, De Kloet ER (2002). The role of the efflux transporter P-glycoprotein in brain penetration of prednisolone. *J Endocrinol.* 175(1):251-60.
- Karssen AM, Meijer OC, Berry A, Sanjuan Piñol R, de Kloet ER (2005). Low doses of dexamethasone can produce a hypocorticosteroid state in the brain. *Endocrinology.* 146(12):5587-95. Epub 2005 Sep 8.
- Khalil B, Liévens JC (2017). Mitochondrial quality control in amyotrophic lateral sclerosis: towards a common pathway? *Neural Regen Res.* 12(7): 1052–1061.doi: 10.4103/1673-5374.211179
- Khurana RC, Devaud LL (2007). Sex differences in neurotransmission parameters in response to repeated mild restraint stress exposures in intact male, female and ovariectomised female rats. *J Neuroendocrinol.* 19(7):511-20.
- Kitraki E, Kremmyda O, Youlatos D, Alexis M, Kittas C (2004). Spatial Performance and Corticosteroid Receptor Status in the 21-Day Restraint Stress Paradigm. *Annals of the New York Academy of Sciences.* 1018: 323–327. doi:10.1196/annals.1296.039
- Kovalevich J, Langford D (2013). Considerations for the Use of SH-SY5Y Neuroblastoma Cells in Neurobiology. *Methods Mol Biol.* 1078: 9–21. doi: 10.1007/978-1-62703-640-5\_2
- Krishna A, Biryukov M, Trefois C, Antony PMA, Hussong R, Lin J, Heinäniemi M, Glusman G, Köglsberger S, Boyd O, Berg BHJVD, Linke D, Huang D, Wang K, Hood L, Tholey A, Schneider R, Galas DJ, Balling R, May P (2014). Systems genomics evaluation of the SH-SY5Y neuroblastoma cell line as a model for Parkinson's disease. *BMC Genomics.* 15(1): 1154. doi: 10.1186/1471-2164-15-1154
- Liot G, Bossy B, Lubitz S, Kushnareva Y, Sejbuk N, Bossy-Wetzel E (2009). Complex II inhibition by 3-NP causes mitochondrial fragmentation and neuronal cell death via an NMDA- and ROS-dependent pathway. *Cell Death Differ.* 16(6):899-909. doi: 10.1038/cdd.2009.22.
- Lopes FM, Schröder R, da Frota ML Jr, Zanotto-Filho A, Müller CB, Pires AS, Meurer RT, Colpo GD, Gelain DP, Kapczinski F, Moreira JC, Fernandes Mda C, Klamt F (2010). Comparison between proliferative and neuron-like SH-SY5Y cells as an *in vitro*

- model for Parkinson disease studies. *Brain Res.* 14;1337:85-94. doi: 10.1016/j.brainres.2010.03.102.
- Lopes FM, Londero GF, de Medeiros LM, da Motta LL, Behr GA, de Oliveira VA, Ibrahim M, Moreira JC, Porciúncula LO, da Rocha JB, Klamt F (2012). Evaluation of the neurotoxic/neuroprotective role of organoselenides using differentiated human neuroblastoma SH-SY5Y cell line challenged with 6-hydroxydopamine. *Neurotox Res.* 22(2):138-49. doi: 10.1007/s12640-012-9311-1.
- Mamelak M (2017). Energy and the Alzheimer brain. *Neurosci Biobehav Rev.* 75:297-313. doi: 10.1016/j.neubiorev.2017.02.001.
- Martinez-Vicente M (2017). Neuronal Mitophagy in Neurodegenerative Diseases. *Front Mol Neurosci.* 10: 64. Published online 2017 Mar 8. doi: 10.3389/fnmol.2017.00064
- Masson GL, Przedborski S, Abbott LF (2014). A computational model of motor neuron degeneration. *Neuron.* 83(4): 975–988. doi: 10.1016/j.neuron.2014.07.001
- Meijer OC, de Kloet ER (2017). A Refill for the Brain Mineralocorticoid Receptor: The Benefit of Cortisol Add-On to Dexamethasone Therapy. *Endocrinology.* 158(3):448-454. doi: 10.1210/en.2016-1495.
- Meijer OC, de Lange EC, Breimer DD, de Boer AG, Workel JO, de Kloet ER (1998). Penetration of dexamethasone into brain glucocorticoid targets is enhanced in *mdr1A* P-glycoprotein knockout mice. *Endocrinology.* 139(4):1789-93.
- Midzak A, Papadopoulos V (2016). Adrenal Mitochondria and Steroidogenesis: From Individual Proteins to Functional Protein Assemblies. *Front Endocrinol (Lausanne).*7: 106. doi: 10.3389/fendo.2016.00106
- Monaghan RM, Whitmarsh AJ (2015). Mitochondrial Proteins Moonlighting in the Nucleus. *Trends Biochem Sci.* 40(12):728-35. doi: 10.1016/j.tibs.2015.10.003. Epub 2015 Oct 28.
- Moon HE, Paek SH (2015). Mitochondrial Dysfunction in Parkinson's Disease. *Exp Neurobiol.* 24(2): 103–116. doi: 10.5607/en.2015.24.2.103
- Moreira PI, Zhu X, Wang X, Lee HG, Nunomura A, Petersen RB, Perry G, Smith MA (2010). Mitochondria: a therapeutic target in neurodegeneration. *Biochim Biophys Acta.* 1802(1):212-20. doi: 10.1016/j.bbadis.2009.10.007.

- Mota CS, Weis SN, Almeida RF, Dalmaz C, Guma FTC, Pettenuzzo LF (2017). Chronic Stress Causes Sex-Specific and Structure-Specific Alterations in Mitochondrial Respiratory Chain Activity in Rat Brain. *Neurochem Res.* doi: 10.1007/s11064-017-2375-9. [Epub ahead of print]
- Mutsaers HA, Tofighi R (2012). Chronic Stress Causes Sex-Specific and Structure-Specific Alterations in Mitochondrial Respiratory Chain Activity in Rat Brain. *Neurotox Res.* 22(2):127-37. doi: 10.1007/s12640-012-9308-9.
- Nicolaidis NC, Charmandari E, Kino T, Chrousos GP (2017). Stress-Related and Circadian Secretion and Target Tissue Actions of Glucocorticoids: Impact on Health. *Front Endocrinol (Lausanne).* 8:70. doi: 10.3389/fendo.2017.00070.
- Noschang CG, Krolow R, Pettenuzzo LF, Avila MC, Fachin A, Arcego D, von Pozzer Toigo E, Crema LM, Diehl LA, Vendite D, Dalmaz C (2009). Interactions between chronic stress and chronic consumption of caffeine on the enzymatic antioxidant system. *Neurochem Res.* 34(9):1568-74. doi: 10.1007/s11064-009-9945-4.
- Oakley RH, Cidlowski JA (2013). The biology of the glucocorticoid receptor: new signaling mechanisms in health and disease. *J Allergy Clin Immunol.* 132(5):1033-44. doi: 10.1016/j.jaci.2013.09.007. Epub 2013 Sep 29.
- Perry SW, Norman JP, Barbieri J, Brown EB, Gelbard HA (2011). Mitochondrial membrane potential probes and the proton gradient: a practical usage guide. *Biotechniques.* 50(2): 98–115. doi: 10.2144/000113610
- Picard M, Wallace DC, Burelle Y (2016). The rise of mitochondria in medicine. *Mitochondrion.* 30:105-16. doi: 10.1016/j.mito.2016.07.003.
- Pisu MG, Garau A, Boero G, Biggio F, Pibiri V, Dore R, Locci V, Paci E, Porcu P, Serra M (2016). Sex differences in the outcome of juvenile social isolation on HPA axis function in rats. *Neuroscience.* 320:172-82. doi: 10.1016/j.neuroscience.2016.02.009.
- Porsolt RD, Bertin A, Jalfre M (1977). Behavioral despair in mice: a primary screening test for antidepressants. *Archives internationales de pharmacodynamie et de therapie.* 229(2):327–336.
- Razmara A, Duckles SP, Krause DN, Procaccio V (2007). Estrogen suppresses brain mitochondrial oxidative stress in female and male rats. *Brain Res.* 1176:71-81.

- Rodolfo C, Campello S, Cecconi F (2017). Mitophagy in neurodegenerative diseases. *Neurochem Int.* pii: S0197-0186(17)30087-6. doi: 10.1016/j.neuint.2017.08.004. [Epub ahead of print]
- Schinkel AH, Wagenaar E, van Deemter L, Mol CA, Borst P (1995). Absence of the mdr1a P-Glycoprotein in mice affects tissue distribution and pharmacokinetics of dexamethasone, digoxin, and cyclosporin A. *J Clin Invest.* 96(4):1698-705.
- Simpkins JW, Dykens JA (2008). Mitochondrial mechanisms of estrogen neuroprotection. *Brain Res Rev.* 57(2):421-30. Epub 2007 Apr 27.
- Skupio U, Tertilt M, Sikora M, Golda S, Wawrzczak-Bargiela A, Przewlocki R (2015). Behavioral and molecular alterations in mice resulting from chronic treatment with dexamethasone: relevance to depression. *Neuroscience.* 286:141-50. doi: 10.1016/j.neuroscience.2014.11.035. Epub 2014 Nov 27.
- Stauch KL, Purnell PR, Fox HS (2014). Quantitative Proteomics of Synaptic and Nonsynaptic Mitochondria: Insights for Synaptic Mitochondrial Vulnerability. *J Proteome Res.* 13(5): 2620–2636. doi: 10.1021/pr500295n
- Suwanjang W, Holmström KM, Chetsawang B, Abramov AY (2013). Glucocorticoids reduce intracellular calcium concentration and protects neurons against glutamate toxicity. *Cell Calcium.* 53(4): 256–263. doi: 10.1016/j.ceca.2012.12.006
- Takahashi M, Morinobu S, Totsuka S, Endoh M (1996). Chronic dexamethasone administration decreases noradrenaline-stimulated, but not serotonin-stimulated, phosphoinositide metabolism in the rat brain. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol.* 353(6):616-20.
- Todorova V, Blokland A (2017). Mitochondria and Synaptic Plasticity in the Mature and Aging Nervous System. *Curr Neuropharmacol.* 15(1):166-173.
- Tretter L, Patocs A, Chinopoulos C (2016). Succinate, an intermediate in metabolism, signal transduction, ROS, hypoxia, and tumorigenesis. *Biochim Biophys Acta.* 1857(8):1086-1101. doi: 10.1016/j.bbabbio.2016.03.012. Epub 2016 Mar 10.
- Vasconcelos AR, Cabral-Costa JV, Mazucanti CH, Scavone C, Kawamoto EM (2016). The Role of Steroid Hormones in the Modulation of Neuroinflammation by Dietary Interventions. *Front Endocrinol (Lausanne).* 7:9. doi: 10.3389/fendo.2016.00009.

- Vasileiou PVS, Mourouzis I, Pantos C (2017). Principal Aspects Regarding the Maintenance of Mammalian Mitochondrial Genome Integrity. *Int J Mol Sci.* 18(8): 1821. doi: 10.3390/ijms18081821
- Völgyi K, Gulyácssy P, Háden K, Kis V, Badics K, Kékesi KA, Simor A, Györffy B, Tóth EA, Lubec G, Juhász G, Dobolyi A (2015). Synaptic mitochondria: a brain mitochondria cluster with a specific proteome. *J Proteomics.* 120:142-57. doi: 10.1016/j.jprot.2015.03.005.
- Weis SN, Pettenuzzo LF, Krolow R, Valentim LM, Mota CS, Dalmaz C, Wyse AT, Netto CA (2012). Neonatal hypoxia-ischemia induces sex-related changes in rat brain mitochondria. *Mitochondrion.* 12(2):271-9. doi: 10.1016/j.mito.2011.10.002.
- Xicoy H, Wieringa B, Martens GJM (2017). The SH-SY5Y cell line in Parkinson's disease research: a systematic review. *Mol Neurodegener.* 12: 10. doi: 10.1186/s13024-017-0149-0
- Xie HR, Hu LS, Li GY (2010). SH-SY5Y human neuroblastoma cell line: *in vitro* cell model of dopaminergic neurons in Parkinson's disease. *Chin Med J (Engl).* 123(8):1086-92.
- Yuen EY, Wei J, Yan Z (2015). Estrogen in Prefrontal Cortex Blocks Stress-induced Cognitive Impairments in Female Rats. *J Steroid Biochem Mol Biol.* 2016 Jun; 160: 221–226. doi: 10.1016/j.jsbmb.2015.08.028
- Zavala JK, Fernandez AA, Gosselink KL. Female responses to acute and repeated restraint stress differ from those in males. *Physiol Behav.* 2011 Aug 3;104(2):215-21. doi: 10.1016/j.physbeh.2011.03.022. Epub 2011 Mar 29.
- Zhao Y, Ma R, Shen J, Su H, Xing D, Du L (2008). A mouse model of depression induced by repeated corticosterone injections. *Eur J Pharmacol.* 581(1-2):113-20. doi: 10.1016/j.ejphar.2007.12.005.
- Zhou Q, Zhou P, Wang AL, Wu D, Zhao M, Südhof TC, Brunger AT (2017). The primed SNARE-complexin-synaptotagmin complex for neuronal exocytosis. *Nature.* 548(7668):420-425. doi: 10.1038/nature23484.
- Zorov DB, Juhaszova M, Sollott SJ (2014). Mitochondrial Reactive Oxygen Species (ROS) and ROS-Induced ROS Release. *Physiol Rev.* 94(3):909–950. doi: 10.1152/physrev.00026.2013