

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS**

**Instituto de Ciências Biológicas: Departamento de Fisiologia e Biofísica**

**LEONARDO DE OLIVEIRA GUARNIERI**

**EFEITOS NEUROFISIOLÓGICOS DO ISOLAMENTO SOCIAL: DO  
PROCESSAMENTO OLFATIVO AO COMPORTAMENTO EMOCIONAL E  
COGNITIVO**

**BELO HORIZONTE**

**2017**

**LEONARDO DE OLIVEIRA GUARNIERI**

**EFEITOS NEUROFISIOLÓGICOS DO ISOLAMENTO SOCIAL: DO  
PROCESSAMENTO OLFATIVO AO COMPORTAMENTO EMOCIONAL E  
COGNITIVO**

Tese de Doutorado apresentada ao programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Fisiologia e Farmacologia do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais, como parte dos requisitos para obtenção do Título de Doutor em Ciências Biológicas.

Área de concentração: Neurofisiologia

Orientadora: Profa. Dr. Grace Schenatto Pereira Moraes

Agências financiadoras: CAPES, CNPq e FAPEMIG

**BELO HORIZONTE**

**2017**

*“No man is an island, entire of itself.  
Each is a piece of the continent, a part of the main.  
If a clod be washed away by the sea, Europe is the less.  
As well as if a promontory were.  
As well as if a manor of thine own or of thine friend’s were.  
Each man’s death diminishes me, for I am involved in mankind.  
Therefore, send not to know for whom the bell tolls, it tolls for thee.”*

John Donne - Poems on Several Occasions

**Aos meus pais, Sonia e Mauri, que com seus incansáveis esforços e incentivo me proporcionaram formação pessoal e profissional.**

## *Agradecimentos*

À minha Orientadora, Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Grace Schenatto Pereira Moraes, pela dedicação, paciência, disponibilidade e perseverança em me preparar e orientar para a execução dos trabalhos que culminaram nessa tese. Sua paixão pela ciência e esforços em proporcionar, para nós alunos, condições intelectuais e físicas de trabalho fazem a diferença.

Aos professores Dr<sup>a</sup> Bettina Malnic, Dr Rodrigo Cunha Alvim de Menezes, Dr Cleiton Aguiar, e Dr Bruno Resende de Sousa por terem aceitado fazer parte da banca e avaliar este trabalho.

Ao meu pai Mauri, por todo amor e dedicação que sempre teve comigo, homem pelo qual tenho maior orgulho de chamar de pai, meu eterno agradecimento pelos momentos em que estive ao meu lado, me apoiando e me fazendo acreditar que nada é impossível, pessoa que sigo como exemplo, pai dedicado, amigo, batalhador, que abriu mão de muitas coisas para me proporcionar a realização deste trabalho.

À minha mãe Sonia, por ser tão dedicada e amiga, por ser a pessoa que mais me apoia e acredita na minha capacidade, meu agradecimento pelas horas em que ficou ao meu lado não me deixando desistir e me mostrando que sou capaz de chegar onde desejo, sem dúvida foi quem me deu o maior incentivo para conseguir concluir esse trabalho. Ao meu irmão, João Paulo, compreensão e carinho nos momentos difíceis.

Ao professor Dr. Venkatesh Murthy, a orientação e os ensinamentos durante o período do doutorado sanduíche na Harvard University e a acolhida em seu laboratório.

Aos professores Dr André Ricardo Massensin, Dr Bruno Rezende de Souza, Dra. Juliana Carvalho Tavares e Dr. Márcio Flávio Dutra Moraes, membros do NNC que me proporcionaram visões diferentes sobre a pesquisa e cujas as opiniões e sugestões acrescentaram muito no resultado final desse trabalho.

Ao professor Dr. Raphael Escorsim Szawka e à pós-doutoranda Nayara Soares Sena Aquino pelo auxílio com os experimentos relacionados ao HPLC.

Ao professor Dr. Márcio Flávio Dutra Moraes pela ajuda com os experimentos de imagem por ressonância magnética.

Aos amigos de laboratório, em especial Ana Raquel e Luciana Cosenza que tantas vezes me auxiliaram em experimentos que duravam “pra sempre”, ouvindo minhas reclamações e mostrando que tudo vai ficar bem.

Aos amigos do NNC: Daniel, Flávio, Laura, Hyorrana, Luciana Melo, Ana Lima, Ana Luiza, Sasha, Ana Flávia, Matheus, Caio, Lorena Fernandes. Pelos anseios, medos, alegrias, tristezas, ideias e tempo compartilhados.

Aos demais professores e funcionários do Departamento de Fisiologia e Pós-graduação, cuja ajuda foi indispensável.

Aos animais de experimentação (camundongos) que tiveram suas vidas sacrificadas para a realização deste trabalho.

Ao CNPq, CAPES e FAPEMIG pelo auxílio financeiro.

A todos que, no momento esqueci, mas que por algum motivo não se esqueceram de mim.

Muito obrigado.

## *Sumário*

<b>1.Introdução .....</b>	<b>20</b>
 <i>Capítulo 1</i>	
<b>2.Justificativa .....</b>	<b>30</b>
<b>3.Objetivos .....</b>	<b>31</b>
3.1 Geral .....	31
3.2 Específicos .....	31
<b>4.Materiais e Métodos .....</b>	<b>32</b>
4.1 Animais experimentais .....	32
4.2 Condições de alojamento .....	32
4.3 Quantificação de catecolaminas por cromatografia líquida de alta precisão.....	33
4.4 Ressonância magnética estrutural .....	34
4.5 Medida de ganho de peso, ingesta de água e comida .....	35
4.6 Ensaio comportamentais .....	35
4.6.1 Atividade locomotora .....	35
4.6.2 Labirinto em cruz elevado .....	36
4.6.3 Neofagia .....	37
4.6.4 Teste de ocultar esferas .....	37
4.6.5 Teste de suspensão de cauda .....	38
4.6.6 Teste do nado forçado .....	39
4.6.7 Consumo de sacarose .....	40
4.7 Tratamento farmacológico .....	41
4.8 Delineamento experimental .....	41
<b>5.Resultados .....</b>	<b>47</b>

## Capítulo 2

<b>6.Justificativa .....</b>	<b>72</b>
<b>7.Objetivos .....</b>	<b>73</b>
7.1 Geral .....	73
7.2 Específicos .....	73
<b>8.Materiais e Métodos .....</b>	<b>74</b>
8.1 Animais utilizados .....	74
8.2 Tratamento farmacológico .....	74
8.3 Tarefa de memória social .....	74
8.4 Administração de 5-bromo-2'-deoxiuridina (BrdU) .....	75
8.5 Imunofluorescência .....	75
8.5.1 Obtenção das imagens .....	77
8.5.2 Quantificação das células marcadas .....	78
8.5.3 Análise .....	78
8.6 Modulação de neurônios serotoninérgicos .....	79
8.6.1 Tarefa de reconhecimento social .....	80
8.7 Quantificação dos níveis de BDNF no hipocampo e bulbo olfatório .....	81
8.7.1 Cirurgia estereotáxica para a implantação de cânula guia no hipocampo..	82
8.7.2 Participação do BDNF na memória social de longa duração .....	83
8.8 Delineamento experimental .....	84
<b>9.Resultados .....</b>	<b>88</b>

## Capítulo 3

<b>10.Justificativa .....</b>	<b>103</b>
<b>11.Objetivos .....</b>	<b>105</b>
11.1 Geral .....	105



11.2 Específicos .....	105
<b>12.Materiais e Métodos .....</b>	<b>106</b>
12.1 Animais .....	106
12.2 Teste do chocolate .....	106
12.3 Teste de habituação / desabituação .....	106
12.4 Tarefa de localização espacial de odores .....	107
12.5. Participação do sistema serotoninérgico na distinção e detecção de odores não- sociais .....	107
12.5.1 Tarefa de detecção de odores não-sociais .....	108
12.5.2 Tarefa de distinção de odores não-sociais .....	109
12.5 Delineamento experimental .....	109
<b>13.Resultados .....</b>	<b>112</b>
<b>14.Discussão .....</b>	<b>118</b>
<b>15.Conclusão .....</b>	<b>128</b>
<b>16.Referências Bibliográficas .....</b>	<b>129</b>
<b>Anexo .....</b>	<b>150</b>

## *Lista de figuras*

Figura 1.	Esquema do circuito olfativo em camundongos.....	22
Figura 2.	Representação da seção sagital de um cérebro adulto de roedor destacando as duas principais regiões onde ocorre a neurogênese adulta.....	23
Figura 3.	Foto representativa das 4 diferentes condições de alojamento utilizadas .....	33
Figura 4.	Caixa de locomoção automatizada .....	36
Figura 5.	Labirinto em cruz elevado .....	37
Figura 6.	Teste de neofagia .....	37
Figura 7.	Teste de esconder esferas .....	38
Figura 8.	Teste de suspensão pela cauda .....	39
Figura 9.	Teste do nado forçado .....	40
Figura 10.	Teste de preferência por sacarose .....	41
Figura 11.	Delineamento do experimento 1 .....	41
Figura 12.	Delineamento do experimento 2 .....	42
Figura 13.	Delineamento do experimento 3 .....	43
Figura 14.	Delineamento experimental 4 .....	43
Figura 15.	Delineamento experimental 5 .....	44
Figura 16.	Delineamento experimental 6 .....	44
Figura 17.	Delineamento experimental 7 .....	45
Figura 18.	Delineamento do experimento 8 .....	46
Figura 19.	Alterações nos níveis de monoaminas causadas pelo isolamento social .....	48
Figura 20.	Alterações no volume do bulbo olfatório; hipocampo dorsal e hipocampo ventral .....	49
Figura 21.	Ganho de peso .....	50
Figura 22.	Ingestão de alimento .....	51
Figura 23.	Ingestão hídrica .....	52
Figura 24.	Comportamento locomotor .....	53

Figura 25.	Labirinto em cruz elevado .....	54
Figura 26.	Labirinto em cruz elevado: parâmetros etológicos .....	56
Figura 27.	Teste da neofagia .....	57
Figura 28.	Comportamento compulsivo .....	58
Figura 29.	Teste de suspensão de cauda .....	59
Figura 30.	Teste do nado forçado .....	61
Figura 31.	Preferência por sacarose .....	62
Figura 32.	Tratamento com Diazepam .....	64
Figura 33.	Tratamento com fluoxetina .....	66
Figura 34.	Tratamento com desipramina .....	68
Figura 35.	Tarefa de memória social .....	75
Figura 36.	Aparato utilizado no teste de reconhecimento social .....	80
Figura 37.	Delineamento do experimento 9 .....	84
Figura 38.	Delineamento do experimento 10 .....	85
Figura 39.	Delineamento do experimento 11 .....	86
Figura 40.	Delineamento do experimento 12 .....	86
Figura 41.	Delineamento do experimento 13 .....	87
Figura 42.	Influência do tratamento agudo com antidepressivos no déficit de memória social .....	88
Figura 43.	Influência do tratamento crônico com antidepressivos no déficit de memória social .....	90
Figura 44.	Proliferação, neurogênese e astrogênese da região mitral do bulbo olfatório .....	91
Figura 45.	Proliferação, neurogênese e astrogênese da região grânular do bulbo olfatório .....	92
Figura 46.	Proliferação e neurogênese do bulbo olfatório .....	93
Figura 47.	Proliferação e astrogenese do bulbo olfatório .....	93

Figura 48.	Proliferação, neurogênese e astrogênese do giro denteado do hipocampo dorsal .....	94
Figura 49.	Proliferação, neurogênese e astrogênese do giro denteado do hipocampo ventral .....	95
Figura 50.	Reconhecimentos social de curta e longa duração mediante inativação da neurotransmissão serotoninérgica anterior ao treino .....	97
Figura 51.	Tarefa de reconhecimentos social de curta e longa duração mediante inativação da neurotransmissão serotoninérgica anterior ao teste da memória de longo prazo .....	98
Figura 52.	Efeito isolamento social nos níveis de BDNF .....	99
Figura 53.	Efeito da administração intra-hipocampal de hrBDNF 0 e 12h após o treino .....	100
Figura 54.	Efeito da administração intra-hipocampal de BDNFab 0 e 12h após o treino .....	101
Figura 55.	Tarefa de detecção de odores não sociais .....	111
Figura 56.	Tarefa de distinção de odores não sociais .....	111
Figura 57.	Teste do chocolate .....	112
Figura 58.	Teste de habituação / desabituação .....	113
Figura 59.	Detecção de odor aversivo de predador .....	113
Figura 60.	Detecção de odor social familiar .....	114
Figura 61.	Detecção de odor social familiar e odor social novo .....	115
Figura 62.	Detecção de odor não-social .....	116
Figura 63.	Distinção de odores não-sociais .....	117

## *Lista de tabelas*

Tabela 1.	Resumo dos experimentos 1 e 2 .....	69
Tabela 2.	Resumo dos experimentos 3 e 4 .....	69
Tabela 3.	Resumo do experimento 5 .....	70

## *Abreviaturas*

5HIAA – Ácido 5-hidroxi-indolacético

5HT – Serotonina

AE – Animais agrupados em ambiente enriquecido

AG – Animais agrupados

AP – Antero-posterior

BDNF - Fator Neurotífico Derivado do Cérebro (Brain-derived neurotrophic fator)

BO – Bulbo olfatório

BrdU - 5-bromo-2'-deoxiuridina

CEBIO – Centro de bioterismo

CEUA – Comitê de ética no uso de animais

CTPMag - Centro de Tecnologia e Pesquisa em Magneto-Ressonância

DA – Dopamina

DG – Giro denteado (Dentate gyrus)

DHBA – Ácido dihidroxi- benzoico

DOPAC – Ácido 3,4-di-hidroxifenilacético

DV – Dorso-ventral

GFAP – Proteína ácida fibrilar glial (Glial fibrillary acidic protein)

HD – Hipocampo dorsal

HPLC – Cromatografia líquida de alta precisão (High performance liquid chromatography)

hrBDNF – BDNF recombinant human protein

HV – Hipocampo ventral.

IE – Animal isolado em ambiente enriquecido

IS – Animal isolado

ISRN - Inibidor seletivo da recaptação de noradrenalina

ISRS – Inibidor seletivo da recaptação de serotonina

LCE – Teste do labirinto em cruz elevado

MA – Massachusetts

ML – Meso-lateral

MRS – Memória de Reconhecimento Social

NA – Noradrenalina

NEO – Teste da neofagia

NeuN – Proteína nuclear neuronal (Neuronal Nuclei)

NGS – Soro normal de cabra (Normal goat serum)

NNC – Núcleo de neurociências

PVPI - Polivinil Pirrolidona Iodo

RME – Ressonância magnética estrutural

TNF – Teste do nado forçado

TR – Treino

TT – Teste

UFMG – Universidade Federal de Minas Gerais

## ***Resumo***

Essencial para a sobrevivência, a interação social compreende um conjunto de comportamentos que possibilita, entre outras coisas, a manutenção do estado emocional dos animais e a duração da memória de reconhecimento social (MRS). De fato, camundongos Swiss adultos expostos a sete dias de isolamento social (IS) têm sua MRS limitada a poucas horas de duração. Interessantemente, se o animal é mantido em IS na presença de um ambiente enriquecido (AE) o déficit de MRS não se expressa. No capítulo 1 do presente estudo, investigamos se a condição de IS também afeta o estado emocional dos animais. Indicadores biológicos de quadros depressivos, como níveis de dopamina, noradrenalina e serotonina, e o volume do bulbo olfatório (BO) foram comprometidos pelo IS. Usando diferentes paradigmas, verificamos que o IS induz comportamentos do tipo-depressivo, ansioso e compulsivo. Os tratamentos farmacológicos diazepam (1mg/Kg), fluoxetina (30 mg / kg) e desipramina (30 mg / kg) i.p.) foram capazes de reverter ou evitar os déficits comportamentais causados pelo IS. Interessantemente, o AE, além de seu conhecido efeito promnésico, teve efeito antidepressivo e ansiolítico em animais isolados. No capítulo 2, testamos a hipótese de que o IS prejudica a memória social porque compromete o estado emocional dos animais. Para tal, avaliamos o efeito das drogas antidepressivas na MRS. O tratamento crônico com a fluoxetina, mas não agudo com antidepressivos, foi capaz de recuperar o déficit de MRS. Estes resultados sugerem que a mudança transitória do estado emocional dos animais isolados não é o suficiente para resgatar a MRS. Em estudos anteriores, demonstramos que o efeito do AE em recuperar a MRS de animais isolados depende de neurogênese. Um dos mecanismos propostos para a ação crônica da fluoxetina é a neurogênese. Então, avaliamos o efeito do tratamento crônico com fluoxetina nos níveis de neurogênese. A análise da proliferação celular, neurogênese e astrogênese mostrou que o isolamento social causa uma diminuição na proliferação celular e neurogênese na região granular do BO e no giro denteado do hipocampo ventral (HV). Os tratamentos crônicos com antidepressivos revertem este quadro, porém apenas a fluoxetina foi capaz de aumentar a neurogênese na região granular do BO. Até aqui, nossos resultados sugerem que não há uma relação de causa-efeito entre o comportamento tipo-depressivo e o déficit de MRS causado pelo IS. O Fator Neurotrófico Derivado do Cérebro (BDNF) é um importante mediador dos processos plásticos ocorridos durante a formação de memórias de longo prazo hipocampo-dependentes. Além disso, a neurogênese pode exercer seus efeitos via produção de BDNF. Então, investigamos o efeito do IS na expressão de BDNF, porém não detectamos alteração nos níveis basais. Como o BDNF é sintetizado e liberado sob demanda, administramos BDNF recombinante (hrBDNF) no hipocampo de animais isolados e observamos uma recuperação da MRS. Em contrapartida, o bloqueador de BDNF (BDNFab) prejudicou a MRS de animais agrupados. Nossos resultados mostram que o IS, além de diminuir a neurogênese no HV, compromete a produção de BDNF dependente do aprendizado no hipocampo dorsal, o que prejudica a MRS. Podemos especular, então, que o AE e o tratamento crônico com fluoxetina, por restabelecerem ambas neurogênese e produção de BDNF, recuperam a MRS em animais isolados. O principal efeito da fluoxetina é aumentar a disponibilidade de serotonina. Para testar se os níveis de serotonina no BO são de fato essenciais para a formação da MRS, inibimos a principal via neural que alimenta o BO com serotonina. Utilizando a técnica de DREADDs (Designer Receptors Exclusively Activated by Designer Drug) inibimos as projeções serotoninérgicas provenientes do núcleo dorsal da raphe no BO, antes da aquisição ou da evocação da MRS. Nossos resultados mostraram que esta via é necessária para a formação e evocação da MRS. A principal entrada sensorial para a MRS é o olfato.



Além disso, a privação da função olfativa em roedores induz comportamento do tipo-depressivo. No capítulo 3 investigamos o impacto do IS em diferentes paradigmas comportamentais dependentes do olfato. Observamos que os animais isolados são capazes de detectar odores sociais, não sociais e aversivos. Entretanto, são incapazes de discriminar odores sociais familiares de novos num mesmo contexto. Adicionalmente, também verificamos o efeito da modulação serotoninérgica no BO sobre a função olfativa. Observamos que a inibição das projeções serotoninérgicas do núcleo da raphe para o BO prejudica a discriminação de odores. Em conjunto, nossos resultados mostram que o IS altera a neuroquímica e a morfologia do bulbo olfatório e hipocampo, além de comprometer comportamentos emocionais e a memória social. Porém, o IS preserva a função olfativa. Apesar de nossos resultados sugerirem não haver relação de causa-efeito entre o comportamento depressivo e o déficit na MRS de animais isolados, o tratamento farmacológico e o ambiente enriquecido recuperam os prejuízos causados pelo IS por mecanismos semelhantes, ou seja, a neurogênese.

Palavras chave: Memória social; olfato; isolamento social; ambiente enriquecido; ansiedade; depressão; neurogênese; BDNF

## *Abstract*

Essential for survival, social interaction comprises a set of behaviors that enables, among other things, the maintenance of the emotional state of the animals and the duration of the social recognition memory (SRM). In fact, Swiss adult mice exposed to seven days of social isolation (SI) have their SRM limited to a few hours long. Interestingly, if the animal is maintained in SI in the presence of an enriched environment (EE) the SRM deficit is not expressed. In Chapter 1 of the present study, we investigated whether the SI condition also affects the emotional state of the animals. Biological indicators of depressive disorders, such as dopamine, noradrenaline and serotonin levels, and the olfactory bulb (OB) volume were compromised by SI. Using different paradigms, we found that SI induces type-depressive, anxious, and compulsive behaviors. The pharmacological treatments of diazepam (1mg / kg), fluoxetine (30 mg / kg) and desipramine (30 mg / kg) i.p.) were able to reverse or avoid the behavioral deficits caused by SI. Interestingly, the EE, in addition to its known promnestic effect, had antidepressant and anxiolytic effect in isolated animals. In Chapter 2, we tested the hypothesis that SI impairs social memory because it compromises the emotional state of animals. For this, we evaluated the effect of antidepressant drugs on SRM. Chronic treatment with fluoxetine, but not with antidepressants, was able to recover the SRM deficit. These results suggest that the transient change in the emotional state of isolated animals is not enough to rescue SRM. In previous studies, we have demonstrated that the effect of EE on recovering SRM from isolated animals depends on neurogenesis. One of the proposed mechanisms for the chronic action of fluoxetine is neurogenesis. We then evaluated the effect of chronic treatment with fluoxetine on neurogenesis levels. The analysis of cell proliferation, neurogenesis and astrogenesis showed that social isolation causes a decrease in cell proliferation and neurogenesis in the GR granular region and in the ventral hippocampus (VH) dentate gyrus. Chronic antidepressant treatments reversed this condition, but only fluoxetine was able to increase neurogenesis in the GR granular region. So far, our results suggest that there is no cause-and-effect relationship between type-depressive behavior and SRM deficit caused by SI. The Brain Derived Neurotrophic Factor (BDNF) is an important mediator of the plastic processes that occurred during the formation of long-term hippocampal-dependent memories. In addition, neurogenesis may exert its effects via production of BDNF. We then investigated the effect of IS on BDNF expression, but did not detect changes in basal levels. As BDNF is synthesized and released on demand, we administer recombinant BDNF (hrBDNF) in the hippocampus of isolated animals and observe a recovery of SRM. In contrast, the BDNF blocker (BDNFab) impaired SRM from pooled animals. Our results show that SI, besides decreasing neurogenesis in HV, compromises the production of BDNF dependent on learning in the dorsal hippocampus, which impairs SRM. We can then speculate that EE and chronic treatment with fluoxetine, by restoring both neurogenesis and BDNF production, recover SRM in isolated animals. The main effect of fluoxetine is to increase the availability of serotonin. To test whether serotonin levels in OB are indeed essential for the formation of SRM, we inhibit the main neural pathway that feeds OB with serotonin. Using the DREADDs (Designer Receptors Exclusively Activated by Designer Drug) we inhibited the serotonergic projections from the dorsal nucleus of the raphe in OB prior to acquisition or recall of the SRM. Our results showed that this pathway is necessary for the formation and evocation of SRM. The main sensory input to SRM is smell. In addition, deprivation of olfactory function in rodents induces type-depressive behavior. In Chapter 3 we investigated the impact of SI on different behavioral paradigms dependent on smell. We observed that isolated animals are able to detect social, non-

social and aversive odors. However, they are unable to discriminate familiar social odors from new ones in the same context. In addition, we also verified the effect of serotonergic modulation on OB on olfactory function. We observed that the inhibition of the serotonergic projections of the raphe nucleus to OB hinders the discrimination of odors. Together, our results show that SI changes the neurochemistry and morphology of the olfactory bulb and hippocampus, as well as compromising emotional behavior and social memory. However, SI preserves the olfactory function. Although our results suggest that there is no cause-and-effect relationship between depressive behavior and SRM deficiency in isolated animals, pharmacological treatment.

**Keywords:** Social memory; olfaction; social isolation; enriched environment; anxiety; depression; neurogenesis; BDNF