UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
DEPARTAMENTO DE FISIOLOGIA E FARMACOLOGIA

ANA LUIZA DE ARAUJO LIMA REIS

CAMUNDONGOS TRATADOS COM L-DOPA DURANTE O ESTRESSE DE SEPARAÇÃO MATERNAL APRESENTAM ALTERAÇÕES COMPORTAMENTAIS DIMÓRFICAS

ORIENTADOR: PROF. DR. BRUNO REZENDE DE SOUZA

BELO HORIZONTE, MG
JULHO/2017

Ana Luiza de Araujo Lima Reis

Camundongos tratados com L-Dopa durante o estresse de separação maternal apresentam alterações comportamentais dimórficas

Dissertação de Mestrado 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 Mestre em Fisiologia.

Orientador: Prof. Dr. Bruno Rezende de Souza

Belo Horizonte, MG

2017

043 Reis, Ana Luiza de Araujo Lima.
Camundongos tratados com L-Dopa durante o estresse de separação maternal apresentam alterações comportamentais dimórficas [manuscrito] / Ana Luiza de Araujo Lima Reis. – 2017.
73 f. : il. ; 29,5 cm.

Orientador: Prof. Dr. Bruno Rezende de Souza.
Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Minas Gerais, Instituto de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Fisiologia e Farmacologia.

1. Fisiologia. 2. Estresse Psicológico. 3. Dopamina. 4. Transtornos do Neurodesenvolvimento. I. Souza, Bruno Rezende de. II. Universidade Federal de Minas Gerais. Instituto de Ciências Biológicas. III. Título.

CDU: 612:615

Ficha catalográfica elaborada pela bibliotecária Fabiane C M Reis – CRB 6 – 2680

"CAMUNDONGOS TRATADOS COM L-DOPA DURANTE O ESTRESSE DE SEPARAÇÃO MATERNAL APRESENTAM ALTERAÇÕES COMPORTAMENTAIS DIMÓRFICAS"

ANA LUIZA DE ARAUJO LIMA REIS

Dissertação de Mestrado defendida e aprovada, no dia **18 de julho de 2017**, pela Banca Examinadora constituída pelos seguintes professores:

PROF. DR. FABRÍCIO DE ARAUJO MOREIRA
ICB/UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

PROF. DR. CLEITON LOPES AGUIAR
ICB/UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

PROF. DR. BRUNO REZENDE DE SOUZA
ICB/UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
ORIENTADOR

Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas - Fisiologia e Farmacologia
Instituto de Ciências Biológicas - Universidade Federal de Minas Gerais - UFMG

Belo Horizonte, 18 de julho de 2017

AGRADECIMENTOS

Esta conquista somente foi possível porque encontrei alguém que acreditou em meu potencial e se dispôs a me ajudar e orientar durante o percurso. Assim, agradeço ao meu orientador, Prof. Bruno Rezende de Souza pela oportunidade, conselhos, ensinamentos e amizade. Agradeço especialmente pelo voto de confiança dado a mim quando apresentei uma nova proposta de projeto. Bruno, você soube de uma maneira muito sábia guiar meu aprendizado na ciência, sempre que eu pensava em desistir, você vinha com sua empolgação e com sua capacidade de me fazer encantar pela ciência novamente, me motivando a continuar.

Agradeço aos professores do Núcleo de Neurociências (NNC), Prof. André Ricardo Massenssini, Prof. Marcio Moraes, Profa. Grace Schenatto, Profa. Juliana Tavares e Prof. Cleiton Lopes, pela estrutura e ensinamentos, tanto nas aulas quanto nas discussões nos seminários do laboratório.

Agradeço também as alunas de iniciação científica. Beatriz Codo, que me ajudou com as incansáveis tentativas de fazer o *western blot.* Laila Blanc que estava sempre disposta a ajudar. Lorena Terene, Sofia Avritzer e Paula Bertu que me ajudaram e revezaram os finais de semana de trabalho comigo. Sem vocês eu jamais conseguiria realizar esse trabalho. A ajuda, o apoio e a empolgação de vocês foi essencial para a conclusão do meu mestrado, o mérito também é de vocês. À aluna de doutorado Muiara Aparecida, pelo apoio, paciência e principalmente pela ajuda com os cálculos. E ao Dr. Flávio Mourão pela ajuda com os experimentos de ressonância magnética estrutural, pelas dicas de microscopia e por todo ensinamento.

Aos colegas no NNC pelas experiências compartilhadas, pelo apoio durante os momentos de desespero, pelas risadas e por proporcionarem alegria e motivação

em nosso ambiente de trabalho. Agradeço especialmente a Luciana, Laura, Ana Flávia e Lorena Fernandes que vivenciaram comigo todos os momentos dessa jornada.

Agradeço aos meus pais, Odair e Maria Inês, minha irmã Ana Laura e a minha tia Maria Beatriz e ao André, sem vocês eu não teria chegado até aqui. Obrigada pelo incentivo e carinho e por terem entendido muitas vezes a minha ausência. Agradeço aos meus tios, Maria Eugênia e Brasil, pelo suporte e apoio em Belo Horizonte durante todos esses anos, não tenho palavras para agradecer o tanto que fizeram e fazem por mim.

Agradeço também as agências financiadoras do projeto: CNPq, FAPEMIG, CAPES, ISN e PRPq.

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS **10**

LISTA DE ABREVIATURAS **12**

RESUMO **13**

ABSTRACT **14**

1. INTRODUÇÃO **15**

1.1 Estresse **16**

1.2 Estresse no neurodesenvolvimento **18**

1.3 Sinalização dopaminérgica **20**

1.4 Dopamina no neurodesenvolvimento **23**

1.5 Estresse e a sinalização dopaminérgica **24**

2. JUSTIFICATIVA **27**

3. OBJETIVOS **28**

3.1 Objetivo geral **28**

3.2 Objetivos específicos **28**

4. MATERIAIS E MÉTODOS **29**

4.1 Animais Experimentais **29**

4.2 Procedimento Experimental **29**

4.3 Testes Comportamentais **30**
4.3.2 Campo aberto (CA) 31
4.3.3 Labirinto em cruz elevado (LCE) 31
4.3.4 Enterrar bolinhas na maravalha (EBM) 32
4.3.5 Nado forçado (NF) 32

4.4 Ressonância Magnética Estrutural (RME) **32**

4.5 Análise estatística **33**

5. RESULTADOS **34**

5.1 O estresse crônico por separação maternal e/ou o tratamento crônico com L-Dopa durante o desenvolvimento não alteraram o ganho de peso dos camundongos pré-púberes **34**

5.2 O estresse crônico por separação maternal e/ou o tratamento com L-Dopa durante o desenvolvimento não alteraram a memória de curta nem a de longa duração em camundongos machos e fêmeas pré-púberes **35**
5.2.1 Memória de curta duração 35
5.2.2 Memória de longa duração 35

5.3 O estresse crônico por separação maternal e/ou o tratamento crônico com L-Dopa durante o desenvolvimento não alteram o comportamento motor de camundongos machos e fêmeas pré-púberes **37**
5.3.1 Distância total percorrida 37
5.3.2 Tempo de permanência no centro 37
5.3.3 Número de *rearings* 37
5.3.4 Velocidade média 38

5.4 Efeito do estresse crônico por separação maternal e/ou do tratamento crônico com L-Dopa durante o desenvolvimento no comportamento tipo ansioso de animais pré-púberes **40**
5.4.1 O tratamento com L-Dopa juntamente com o estresse de separação maternal, aumentam o comportamento tipo ansioso em fêmeas pré-púberes 40

5.4.2 O estresse de separação maternal juntamente com o tratamento com L-Dopa aumentam o comportamento tipo ansioso em machos pré-púberes.....43

5.5 Estresse crônico por separação maternal durante o desenvolvimento e/ou o tratamento crônico com L-Dopa não alteram o comportamento tipo compulsivo em animais machos e fêmeas pré-púberes.....46

5.6 Efeito do estresse crônico por separação maternal e do tratamento crônico com L-Dopa durante o desenvolvimento no comportamento tipo depressivo de animais pré-púberes.....47

5.6.1 O tratamento crônico com L-Dopa durante o desenvolvimento diminuiu o comportamento tipo depressivo em fêmeas pré-púberes.....47

5.6.2 O tratamento crônico com L-Dopa juntamente com o estresse crônico por separação maternal aumenta o comportamento tipo depressivo em machos pré-púberes...50

6. DISCUSSÃO.....54

7. CONCLUSÃO.....60

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....61

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: O sistema do estresse.....15

Figura 2: Vias dopaminérgicas no cérebro humano.....19

Figura 3: Cascata de sinalização intracelular após a ativação dos receptores dopaminérgicos.....21

Figura 4: Procedimento experimental.....28

Figura 5: Efeito do estresse crônico e do tratamento com L-Dopa durante o desenvolvimento no ganho de peso.....32

Figura 6: Efeito do estresse crônico e do tratamento com L-Dopa durante o desenvolvimento na memória não espacial dependente de hipocampo.....34

Figura 7: Efeito do estresse crônico e do tratamento com L-Dopa durante o desenvolvimento na atividade motora exploratória.....37

Figura 8: Efeito do estresse crônico e do tratamento com L-Dopa durante o desenvolvimento no comportamento tipo ansioso em fêmeas.....40

Figura 9: Efeito do estresse crônico e do tratamento com L-Dopa durante o desenvolvimento no comportamento tipo ansioso em machos.....43

Figura 10: Efeito do estresse crônico e do tratamento com L-Dopa durante o desenvolvimento no comportamento tipo impulsivo.....44

Figura 11: Efeito do estresse crônico e do tratamento com L-Dopa durante o desenvolvimento no comportamento tipo depressivo em fêmeas.....47

Figura 12: Efeito do estresse crônico e do tratamento com L-Dopa durante o desenvolvimento no comportamento tipo depressivo em machos.....50

Figura 13: Resumo dos resultados comportamentais.....51

Figura 14: Efeito do estresse crônico e do tratamento com L-Dopa durante o desenvolvimento no volume do hipocampo.....52

LISTA DE ABREVIATURAS

Ac - Adenilato ciclase

ACTH - Corticotropina

AKT - Proteína Kinase B

BLA – Amígdala basolateral

CA – Campo aberto

cAMP - Adenosina monofosfato cíclica

CRH - Hormônio liberador de corticotropina

CRH 1 - Receptor 1 do hormônio liberador de corticotropina

DARPP-32 - Fosfoproteína Regulada por Dopamina de 32 kD

EBM – Enterrar bolinhas na maravalha

GR - Receptores de glicocorticoides

GSK3-β - Glicogênio Kinase Sintase 3β

HPA - Eixo Hipotálamo – hipófise – adrenal

L-Dopa - 1-3,4-diidroxifenilalanina ou levodopa

LCE – Labirinto em cruz elevado

MR - Receptores de mineralocorticoides

NF – Nado forçado

OMS – Organização Mundial da Saúde

PKA - Proteína kinase A

POMC - pró- opiomelanocortina

PP-1 - Proteína fosfatase 1

PVN - Núcleo Paraventricular

RME – Ressonância magnética estrutural

RON – Reconhecimento de objeto novo

SM - Separação maternal

VTA - Área Tegmental Ventral

RESUMO

Sabe-se que o estresse crônico no início da vida pode levar a alterações comportamentais que podem estar envolvidas em muitos transtornos neuropsiquiátricos, incluindo ansiedade e depressão. Várias destas etiologias surgem durante a adolescência, quando ocorre o remodelamento do cérebro. Esta é uma das razões pelas quais a prática de psiquiatria infantil / adolescente ainda é um desafio. Por isso, investigamos os efeitos da separação materna (SM) no comportamento de camundongos pré-púberes. Vários estudos mostraram que o estresse crônico gera desequilíbrios na sinalização dopaminérgica. Uma das principais alterações é a diminuição da atividade dos neurônios dopaminérgicos e alterações na expressão dos receptores dopaminérgicos. Então, investigamos se a administração de L-Dopa durante a SM pode interagir ou proteger contra o estresse no início da vida. Finalmente, um dos desafios nos estudos de psiquiatria é o viés sexual na prevalência de alguns distúrbios mentais. Para abordar esta questão, utilizamos camundongos machos e fêmeas C57 / BL6. Nós dividimos os camundongos em seis grupos experimentais: grupo não manipulado (Naïve) e cinco grupos tratados com drogas e / ou submetidos ao protocolo SM (180 min / dia) de P2-P14. Estes grupos são: tratados com solução salina (SAL); Grupo tratado com L-dopa / Benserazida (50/25 mg / kg) (DOPA); Grupo SM; SM tratados diariamente com Salina (SM+SAL); e grupo tratado com L-dopa / Benserazida durante a SM (SM+DOPA). Com 4 semanas de idade, analisamos o comportamento dos animais através dos testes de reconhecimento de objeto, teste de campo aberto, labirinto em cruz elevado, teste de enterrar bolinhas na maravalha e teste de nado forçado. Além dos testes comportamentais, os animais foram submetidos à ressonância magnética estrutural, para análise do volume do hipocampo. Vimos que o tratamento com L-Dopa diminuiu o comportamento tipo depressivo em fêmeas e o comportamento tipo ansioso em machos. Quando o tratamento com L-Dopa é feito juntamente com o estresse de separação maternal, tanto fêmeas quanto machos têm um aumento do comportamento tipo ansioso, porém machos também apresentam um aumento do comportamento tipo depressivo. As imagens de ressonância demonstraram uma tendência na diminuição do volume hipocampal somente em machos do grupo SM+DOPA. Nossos resultados sugerem um dimorfismo sexual em resposta ao tratamento com L-Dopa durante o protocolo de separação maternal.

Palavras chave: Estresse, dopamina e neurodesenvolvimento.

ABSTRACT

It is well known that early life stress can lead to behavioral alterations that might be involved in many neuropsychiatric disorders, including anxiety and depression. Several of these aetiologies emerge during adolescence, when remodeling of the brain occurs. This is one of the reasons that child/adolescent psychiatry practice is still a challenge. Because of this, we investigated the effects of maternal separation (SM) in prepubertal mice behavior. Several studies showed that chronic stress imbalances dopaminergic system. One of the main alterations is a decrease in dopaminergic neurons activity and alterations in dopaminergic receptors expression. So, we investigated if L-Dopa administration during SM can protect against early life stress. Finally, one of the challenges in psychiatry studies is the sex bias in the prevalence of some mental disorders. To tackle this question, we used both males and females C57/BL6 mice. We divided the mice in six experimental groups: non-manipulated group (Naïve) and five groups drug treated and/or submitted to SM protocol (180 min/day) from P2-P14. These groups are: treated with Saline (SAL); L-dopa/Benserazide treated group (50/25 mg / kg) (DOPA); SM group; SM daily treated with Saline (SM+SAL); and L-dopa/Benserazide treated during SM (SM+DOPA). At the 4 week old, their behavior were tested by object recognition task, open field test, elevated plus maze, marble burying and forced swimming test. In addition to the behavioral tests, the animals were submitted to structural magnetic resonance, to analyze the volume of the hippocampus. We have seen that treatment with L-Dopa decreased the depressive like behavior in females and the anxious like behavior in males. When L-Dopa treatment is done along with maternal separation stress, both females and males have an increase in anxious like behavior, but males also show an increase in depressive like behavior. In addition, brain imaging showed a tendency to the decrease of hippocampal volume in SM+DOPA males. Our results suggest a sexual dimorphism in response to treatment with L-Dopa during the maternal separation protocol.

Key words: Stress, dopamine and neurodevelopment.

1. INTRODUÇÃO

Segundo uma pesquisa feita em fevereiro de 2017 pela Organização Mundial da Saúde (OMS), 322 milhões de pessoas no mundo sofrem de depressão. Isso corresponde à 4,4% da população mundial (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2017). No Brasil, a OMS estima que 5,8% da população é afetada pela depressão (ORGANIZAÇÃO PAN-AMERICANA DA SAÚDE, 2017). Ainda de acordo com a OMS, a depressão é a doença que mais gera incapacidade e afastamento do trabalho no mundo, sendo também a maior causa das mortes por suicídio, 800 mil casos por ano (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2017). Outra doença psiquiátrica que tem afetado grande parte da população mundial é o transtorno de ansiedade. Cerca de 264 milhões de pessoas no mundo sofrem com a doença hoje em dia. Sendo o Brasil líder mundial nos casos, 9,3% dos brasileiros são afetados pelo transtorno de ansiedade (ORGANIZAÇÃO PAN-AMERICANA DA SAÚDE, 2017). Muitos dos casos de ansiedade e depressão surgem durante a adolescência, fase em que ocorre remodelação do cérebro. Esta é uma das razões pelas quais a prática psiquiátrica da criança ou do adolescente ainda é um desafio.

Além dos males para a saúde, a vida profissional e social dos doentes, a ansiedade e a depressão geram grandes gastos para a economia mundial. Estima-se que, a cada ano, as consequências dos transtornos neuropsiquiátricos, tais como ansiedade e depressão, geram uma perda econômica de 1 trilhão de dólares para o mundo (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2016).

Mas por que tem aumentado os casos de depressão e ansiedade na população? Não existe uma única resposta para essa pergunta. Ao contrário de outras doenças, existem muitos fatores que atuam de forma conjunta para gerar os quadros de ansiedade e depressão. Um desses fatores é o estresse crônico, que atinge cerca de 90% da população mundial (ORGANIZAÇÃO PAN-AMERICANA DA SAÚDE, 2017). Apesar de o estresse ser vital para a sobrevivência das espécies, a exposição contínua a um evento estressor pode levar a problemas fisiológicos e comportamentais. Sabe-se que o estresse crônico está envolvido com o desenvolvimento de diversos transtornos psiquiátricos (DE KLOET; JOËLS; HOLSBOER, 2005). Assim como o estresse tem crescido entre a população jovem e adulta, ele também está crescendo entre as crianças (RAMOS, 2015). O estresse infantil gera danos que vão muito além da infância, podendo ser responsável pelo surgimento de transtornos de ansiedade e depressão ao longo da vida (BIFULCO; BROWN; ADLER, 1991). Dados de uma pesquisa feita em São Paulo pela

International Stress Management Association no Brasil (Isma-BR), mostraram que oito em cada dez casos em que os pais buscam ajuda profissional por alterações comportamentais de seus filhos, têm sua origem no estresse (COSTA, 2012).

Deste modo, trona-se essencial entender os mecanismos por trás do estresse, principalmente do estresse no início da vida, para futuramente poder desenvolver ferramentas de prevenção para as crianças e tratamentos adequados para jovens e adultos. Neste estudo, investigamos o papel da dopamina como um dos mecanismos envolvidos na modulação dos comportamentos induzidos pelo estresse.

1.1 Estresse

O endocrinologista canadense Hans Selye (1907 – 1982) foi o primeiro a formular o conceito de estresse. Ele observou que organismos diferentes apresentam o mesmo padrão de resposta fisiológica para determinadas experiências sensoriais ou psicológicas que podem gerar efeitos nocivos em órgãos, tecidos ou processos metabólicos ou são percebidas como nocivas. Assim, Hans Selye definiu estresse como uma síndrome que se desenvolve a partir da adaptação do organismo a algum evento estressor (SELYE, 1936), ou seja, qualquer adaptação requerida a uma pessoa. Hoje, estresse é definido como uma interrupção real ou prevista da homeostase do corpo provocado por fatores psicológicos, ambientais ou fisiológicos. A alostase é o processo ativo de adaptação aos eventos estressores por meio de mediadores como o cortisol e o sistema autonômico, metabólico e imunológico que atuam em conjunto de forma não linear para manter a homeostase (STERLING; REASON, 1988; MCEWEN et al., 2015).

A resposta a um evento estressor ocorre mediante a ativação do sistema nervoso simpático e parassimpático e do eixo hipotálamo-hipófise-adrenal (HPA). A resposta mais imediata ao evento estressor é fornecida pelo sistema nervoso autônomo, conhecida como reação de luta ou fuga, que provoca rápidas respostas nos seus órgãos alvo. A ativação do eixo HPA resulta em elevação dos glicocorticóides circulantes (Fig. 1). Ela acontece através da ativação do receptor CRH1 que leva à produção do hormônio liberador de corticotropina (CRH) e vasopressina pelas células parvocelulares do núcleo paraventricular hipotalâmico (PVN). Esses hormônios são secretados por sua vez, no sistema porta hipotalâmico-hipofisário, culminando na produção de pró-opiomelanocortina (POMC) pela hipófise anterior, o POMC por sua vez é clivado originando a corticotropina (ACTH) e outros hormônios. O ACTH atua no córtex adrenal promovendo a produção de cortisol em humanos e corticoesterona em

roedores (DE KLOET; JOËLS; HOLSBOER, 2005; LUPIEN et al., 2009). Os glicocorticóides, se ligam tanto em receptores de glicocorticoides (GR) quanto em receptores mineralocorticoides (MR). Através da sua ligação ao GR, promovem uma cascata de ações catabólicas nos tecidos periféricos, proporcionando uma resposta adequada ao evento estressor. Por fim, os glicocorticóides fornecem o feedback negativo no eixo HPA para retornar a um estado homeostático (BALE; EPPERSON, 2015).

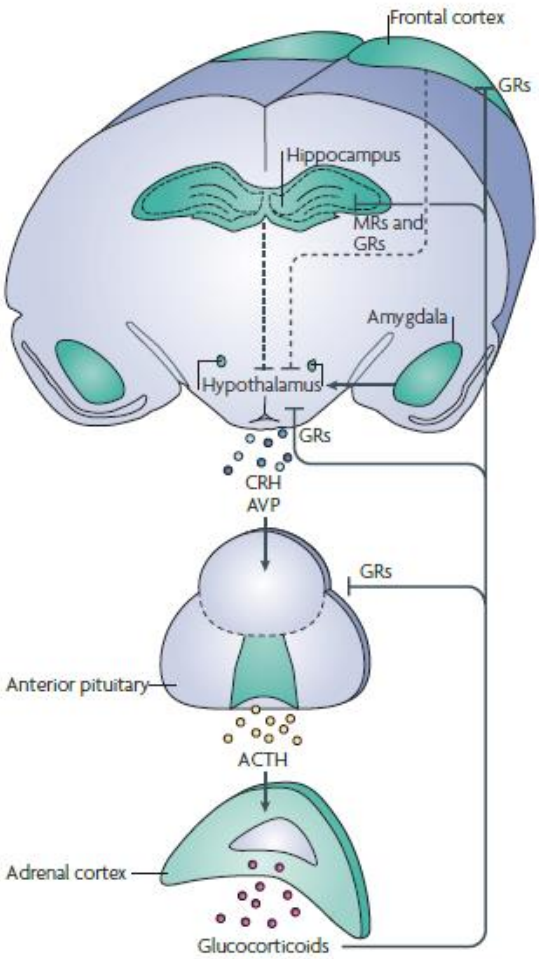

Figura 1: O sistema do estresse. Neurônios do hipotálamo liberam CRH que agem estimulando a hipófise a liberar ACTH. O ACTH por sua vez age no córtex da glândula adrenal aumentando a liberação de glicocorticoides. Estes controlam tanto a liberação de CRH quanto a liberação de ACTH por mecanismos de feedback negativo. O hipocampo e o córtex pré-frontal regulam negativamente o eixo HPA, em contrapartida, a amígdala estimula esse eixo (LUPIEN et al., 2009).

Uma das maneiras pelas quais os hormônios do estresse podem modular o comportamento é através do hipocampo. O hipocampo é uma região presente no lobo temporal envolvido no processo da memória. Em roedores ele é separado em dorsal e sub-regiões

ventrais. O hipocampo dorsal, análogo ao hipocampo posterior em primatas, é responsável por funções cognitivas, enquanto que as regiões ventrais (anterior em primatas) são as porções límbicas do hipocampo, que regulam as emoções (FANSELOW; DONG, 2010). Alterações no hipocampo ventral estão associadas com distúrbios psiquiátricos incluindo a esquizofrenia (HECKERS; KONRADI, 2002; NELSON et al., 2011). Além disso, o hipocampo ventral está associado ao controle negativo do eixo HPA em resposta ao estresse (HERMAN et al., 1995). Portanto, o hipocampo ventral representa um importante local de convergência pelo qual o estresse pode modular as emoções, contribuindo assim para os sintomas associados às doenças neuropsiquiátricas. Em resposta ao estresse, o hipocampo sofre uma série de alterações adaptativas. O estresse pode inibir a neurogênese ou a sobrevivência celular no hipocampo, principalmente na região do giro dentado e CA3 (MCEWEN, 2006).

Além de alterações no hipocampo, o estresse pode provocar alterações em neurônios do córtex pré-frontal e da amígdala, uma região do cérebro envolvida no medo, na ansiedade e na agressividade. Assim, a capacidade de aprendizado, a memória e a capacidade de tomar decisões podem ser comprometidas pelo estresse, podendo ser acompanhada de níveis elevados de ansiedade e agressão (MCEWEN, 2006).

1.2 Estresse no neurodesenvolvimento

O neurodesenvolvimento se dá através de interações entre os genes e o meio ambiente. Os primeiros anos de vida compõem uma fase importante do desenvolvimento e eventos estressores nessa fase podem ser responsáveis por alterações desenvolvimentais. Crianças estressadas podem apresentar dificuldade de concentração e aprendizado, além de atrasos cognitivos (RAMOS, 2015). Um desequilíbrio fisiológico durante a fase de desenvolvimento pode ser responsável por gerar alterações permanentes no cérebro (KUNDAKOVIC; CHAMPAGNE, 2015). Portanto, estresse sofrido durante o neurodesenvolvimento pode gerar mudanças a níveis estruturais e funcionais no cérebro (HART; RUBIA, 2012), além de alterações comportamentais que persistem na vida adulta (BIFULCO; BROWN; ADLER, 1991).

O eixo HPA evoluiu de forma que no início do desenvolvimento ele permanece hiporesponsivo. Em humanos esse período corresponde aos primeiros anos de vida e em roedores corresponde às duas primeiras semanas pós-natal. O equilíbrio fisiológico do eixo HPA nessa fase do desenvolvimento, assim como outros fatores tais como liberação do

hormônio do crescimento e frequência cardíaca, parece ser mantido pela presença materna (LEVINE, 1994; LUPIEN et al., 2009). A estimulação tátil parece inibir a maioria das alterações cerebrais, já o leite materno é essencial para reduzir a sensibilidade da glândula adrenal ao ACTH (LEVINE, 2001, 2002). Porém, na ausência do cuidado materno, ocorre a desinibição do eixo, deixando o indivíduo vulnerável aos efeitos do estresse. Desta forma, estudos têm demonstrado que crianças negligenciadas ou que sofreram algum tipo de abuso possuem maiores probabilidades de desenvolverem depressão quando adultas (BIFULCO; BROWN; ADLER, 1991; SCHEDULE, 2007). Além de aumentar as chances do indivíduo se tornar depressivo, o histórico de abuso durante a infância é responsável por maiores índices de suicídio entre adolescentes e adultos jovens (BROWN et al., 1999; SCOTT et al., 2012).

Outros transtornos psiquiátricos que podem surgir como consequência da exposição à fatores estressantes durante o desenvolvimento, são os transtornos de ansiedade, tais como transtorno obsessivo compulsivo e a síndrome do pânico (FERGUSSON; HORWOOD; LYNSKEY, 1996). Em suma, eventos estressantes que podem ocorrer durante a infância são fatores de risco para o desenvolvimento de transtornos psiquiátricos durante a vida adulta, tais como transtorno de ansiedade, depressão, déficit de atenção e hiperatividade, transtorno do estresse pós-traumático, transtorno do uso de substâncias, dentre outros (ACKERMAN et al., 1998; FERGUSSON; HORWOOD; LYNSKEY, 1996; KENDLER et al., 2000; KESSLER et al., 2010; SCOTT; SMITH; ELLIS, 2010).

Estudos de neuroimagem estrutural têm mostrado alterações no cérebro de adultos que passaram por estresse crônico durante a infância. Foram vistas alterações volumétricas no hipocampo, na amígdala, no corpo caloso, no córtex pré-frontal, no córtex cingulado anterior e núcleo caudado. Além disso, estudos mostraram déficits na conectividade dessas áreas, sugerindo anormalidades nas redes neurais (COHEN et al., 2006; RIEM et al., 2015; TEICHER et al., 2004; BICK; NELSON, 2016; HART; RUBIA, 2012).

Além de alterações comportamentais e morfológicas, dados publicados em 2004 mostraram que o estresse crônico durante o desenvolvimento pode alterar também os níveis de monoaminas e seus metabólitos no hipocampo e na amígdala de animais machos e fêmeas quando adultos (BOWMAN et al., 2004). Sugerindo que o estresse pode modular os comportamentos através dos seus efeitos na alteração da sinalização por neurotransmissores.

1.3 Sinalização dopaminérgica

A dopamina foi primeiramente descrita em cérebros humanos por Kathleen Montagu em 1957 (MONTAGU, 1957). Neste mesmo ano, Arvid Carlsson demonstrou que a dopamina era um neurotransmissor, e que também está presente em cérebros de animais (CARLSSON et al., 1957). Sabe-se hoje que a dopamina é um neurotransmissor catecolaminérgico, ou seja, possui um grupo catecol ligado a um grupamento amina. Origina-se do aminoácido tirosina que pode ser obtido através da alimentação ou por produção endógena. A tirosina por sua vez é convertida em L-Dopa (1-3,4-diidroxifenilalanina) pela enzima tirozina hidroxilase, e por fim, a enzima aminoácido aromático descarboxilase converte L-Dopa em dopamina (BLASCHKO, 1942).

Os neurônios dopaminérgicos fazem parte de circuitos neurais responsáveis por diversas funções fisiológicas tais como controle motor, memória de trabalho, sono, atenção, regulação hormonal, aprendizado e sistema de recompensa (GIRAULT; GREENGARD, 2004; SCHULTZ, 1997). Quatro vias principais do sistema dopaminérgico no cérebro adulto são bem conhecidas (Fig.2). Cada uma dessas vias possui funções distintas, porém, seus circuitos são conectados, tornando um sistema complexo e interligado (BJÖRKLUND; DUNNETT, 2007). Abaixo serão descritas cada uma delas:

(1) via mesocortical é a via na qual os neurônios dopaminérgicos que se originam na área tegumentar ventral (VTA) enviam suas projeções para o córtex frontal. Esta via está relacionada ao desenvolvimento normal das funções cognitivas, memória de trabalho e aprendizagem (BENTIVOGLIO; MORELLI, 2005; BJÖRKLUND; DUNNETT, 2007).

(2) via mesolímbica, onde neurônios localizados na VTA enviam projeções para regiões do sistema límbico. Está envolvida nos comportamentos aditivos, motivação e recompensa (BENTIVOGLIO; MORELLI, 2005)

(3) via nigroestriatal, onde os neurônios da substância negra parte compacta enviam projeções para o estriado dorsal, sendo essa via a responsável pelo controle dos movimentos voluntários (CARPENTER; PETER, 1972; DUNNETT, 2005).

(4) via túberoinfundibular, que conecta o núcleo infundibular à eminência mediana da glândula pituitária. Esta via está relacionada ao controle da produção de prolactina (LYONS; HELLYSAZ; BROBERGER, 2012).

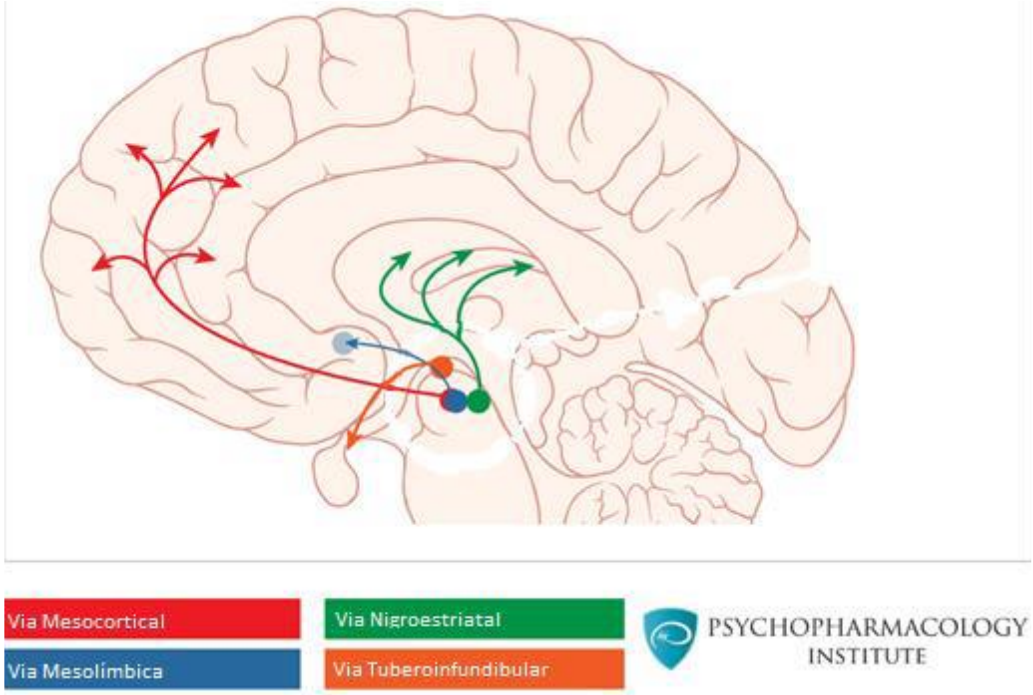

Figura 2: Vias dopaminérgicas no cérebro humano. Adaptado de Psychopharmacology Institute - First-Generation Antipsychotics: An Introduction *http://psychopharmacologyinstitute.com/antipsychotics/first-generation-antipsychotics/*

As ações fisiológicas da dopamina são mediadas por receptores transmembranas acoplados a proteína G. Em humanos são encontrados cinco receptores divididos em duas famílias: D1 e D2, sendo assim divididos devido às características farmacológicas e a interação com a enzima adenilato ciclase (AC), enzima responsável pela modulação da adenosina 3',5'-monofosfato cíclico (cAMP) que controla diversas fases da cascata de sinalização (KEBABIAN; CALNE, 1979; NEVE; SEAMANS; TRANTHAM-DAVIDSON, 2004).

A família D1, compreende os receptores D1 e D5, que estão presentes no terminal pós-sináptico e estão associados à proteína G estimulatória (Gs), se assemelham por terem o terceiro loop citoplasmástico curto e uma grande cauda C-terminal. O receptor D1 está distribuído principalmente nas áreas nigroestriatais, mesolímbica e mesocorticais (MISSALE et al., 1998). O receptor D5 possui maior afinidade pela dopamina, porém, tem uma menor densidade no cérebro de mamíferos em comparação com o receptor D1, encontra-se em regiões como o córtex pré-frontal, córtex pré-motor, substância negra, hipotálamo, hipocampo e giro denteado.

A família D2, compreende os receptores D2, D3 e D4, está associada à proteína G inibitória (Gi) (NEVE; SEAMANS; TRANTHAM-DAVIDSON, 2004). Esses receptores se encontram tanto nos terminais pré-sinápticos como nos pós-sinápticos e estão presentes no estriado, núcleo accumbens e tubérculo olfatório. São ainda encontrados, em menor densidade

na substância negra, VTA, hipotálamo, áreas corticais, septum, amigdala e hipocampo (MISSALE et al., 1998; SEEMAN, 2006). Estes receptores apresentam o terceiro loop citoplasmástico longo e uma cauda C-terminal curta, ao contrário dos receptores da família D1 (MISSALE et al., 1998).

A ativação de receptores D1 (Fig. 3) promove formação de AC que forma o segundo mensageiro cAMP e, consequentemente, leva a ativação da proteína quinase A (PKA) aumentando a fosforilação da Fosfoproteína Regulada por Dopamina de 32 kD (DARPP-32) (NEVE; SEAMANS; TRANTHAM-DAVIDSON, 2004). A DARPP-32 tem um importante papel na integração da sinalização intracelular (SVENNINGSSON et al., 2004), pois é um potente inibidor da proteína fosfatase-1 (PP-1) que é responsável por desfosforilar diversas proteínas com amplas funções celulares (BEAULIEU; GAINETDINOV, 2011; SVENNINGSSON et al., 2004). Além disso, a DARPP-32 integra a sinalização intracelular por ser regulada por diversos receptores de membrana, tais como, GABA e NMDA. A ativação dos receptores dopaminérgicos D2 (Fig. 3), é conhecida por regular processos intracelulares que são fundamentais para o neurodesenvolvimento, transcrição de genes e proliferação celular, inibindo a formação de AC e consequentemente diminuindo a ativação de cAMP e PKA e reduzindo a fosforilação DARPP-32 (NEVE; SEAMANS; TRANTHAM-DAVIDSON, 2004).

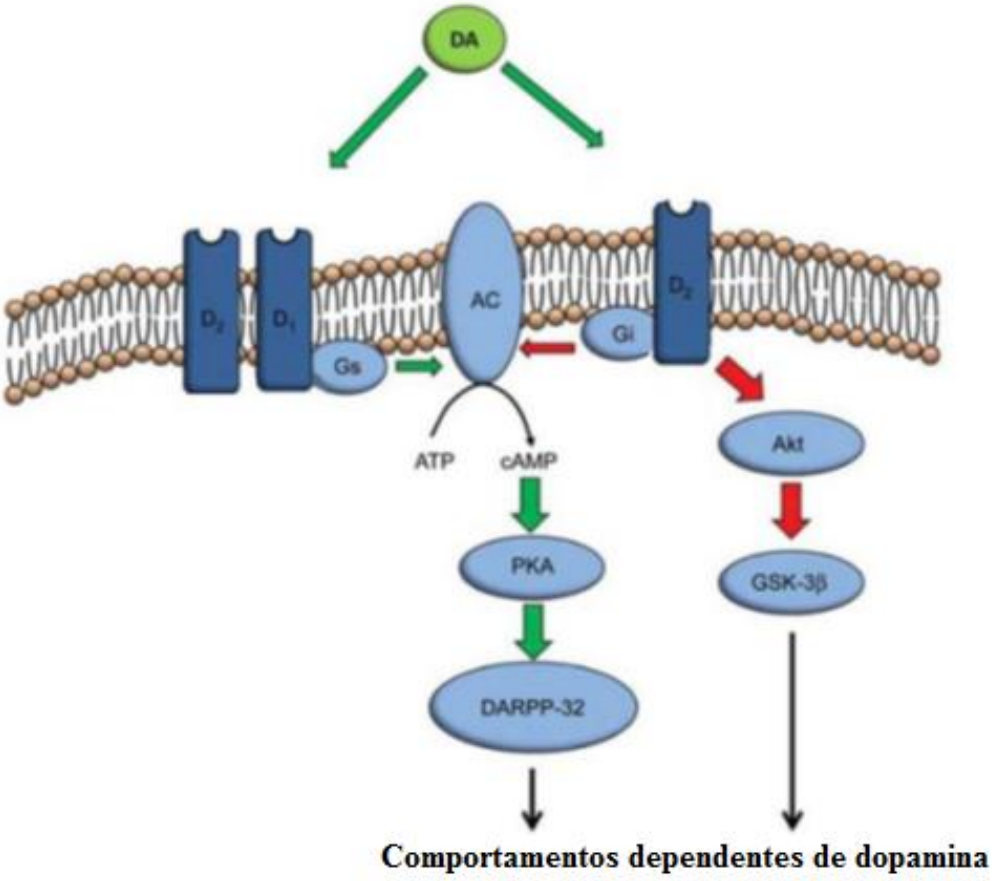

Figura 3: Cascata de sinalização intracelular após a ativação dos receptores dopaminérgicos. Adaptado de SOUZA e TROPEPE, 2011

Além de modular a via cAMP/DARPP-32, Beaulieu *et al*., 2005, demonstraram que receptores da família D2 também modulam a via Akt/GSK3 através da formação do complexo PP-2A/beta-arrestina, alterando respostas comportamentais. Com a ativação do receptor D2, este complexo é formado e a Akt fica inativa, aumentando assim, a atividade do glicogênio quinase 3β (GSK-3β) que favorece a expressão de comportamentos associados à dopamina.

1.4 Dopamina no neurodesenvolvimento

O início da síntese de dopamina e da expressão dos seus receptores ocorre já durante o desenvolvimento fetal dos mamíferos (ARAKI, K.Y., SIMS, J.R., AND BHIDE, 2007; SHEARMAN; ZEITZER; WEAVER, 1997). Em humanos, os neurônios dopaminérgicos surgem por volta da 6ª - 8ª semana de gestação (SUNDSTRÖM et al., 1993) e em camundongos por volta dos dias 10 – 15 de gestação, ocorrendo mais cedo em fêmeas do que em machos

(SEIGER; OLSON, 1973). Apesar de começarem a ser expressas no início do desenvolvimento embrionário, as inervações dopaminérgicas somente se tornarão maduras no final da adolescência. Em camundongos, isso ocorre por volta do dia pós-natal 60 (MONEY; STANWOOD, 2013). Esse longo amadurecimento, permite uma larga janela de período crítico no desenvolvimento, onde alguma alteração pode induzir efeitos a longo prazo.

No cérebro de embriões a ativação dos receptores dopaminérgicos modula a migração, proliferação e diferenciação neuronal, sugerindo que o equilíbrio fisiológico na ativação dos receptores dopaminérgicos seja importante para o desenvolvimento do cérebro (CRANDALL et al., 2009; MONEY; STANWOOD, 2013; SOUZA; ROMANO-SILVA; TROPEPE, 2011). Os receptores dopaminérgicos, principalmente D3, são muito expressos durante o desenvolvimento do cérebro, principalmente nas zonas germinativas neuroepiteliais, que são ativamente envolvidas na neurogênese no prosencéfalo basal, dando base para a hipótese de que a dopamina desempenha um papel no desenvolvimento do cérebro durante a neurogênese (DIAZ et al., 1997). Além disso, níveis elevados dos receptores D1 foram encontrados no cérebro de camundongos no período perinatal. A ativação desses receptores modula a transcrição de diversos genes. Portanto, a ativação anormal do sistema dopaminérgico durante um período crítico de desenvolvimento, pode gerar alterações duradouras (HERLENIUS; LAGERCRANTZ, 2004).

O desequilíbrio na sinalização dopaminérgica afeta diversos comportamentos, o que é observado em pacientes com transtornos psiquiátricos, tais como esquizofrenia, déficit de atenção de hiperatividade, transtorno bipolar, dentre outros. Além disso, estudos demonstraram que pacientes com diversos distúrbios psiquiátricos apresentam alterações no desenvolvimento do cérebro, antes mesmo dos sintomas aparecerem (INSEL, 2010), evidenciando um problema neurodesenvolvimental. Existe a probabilidade de que mesmo um desequilíbrio transitório dos níveis de dopamina durante o desenvolvimento do cérebro poderia gerar prejuízos duradouros na estrutura e função do cérebro maduro (JONES et al., 2000; SHEARMAN; ZEITZER; WEAVER, 1997).

1.5 Estresse e a sinalização dopaminérgica

Os sistemas de neurotransmissão no cérebro, em resposta ao estresse agudo, agem de forma a manter o organismo em alerta para enfrentar os desafios. Já a resposta prolongada do organismo ao estresse, promove componentes adaptativos de forma a retornar ao estado de

homeostase do organismo. Portanto, as alterações na liberação de neurotransmissores são importantes para a resposta do organismo ao estresse.

O estresse agudo provoca um aumento na liberação de dopamina nas vias mesolímbica e mesocortical. Estudos mostram níveis elevados de dopamina no estriado, no núcleo acumbens e no córtex pré-frontal em resposta a um estresse agudo (PRUESSNER, 2004; TIDEY; MICZEK, 1996; VALENTI; GILL; GRACE, 2012). O aumento dos níveis de dopamina na via mesolímbica, se dá principalmente pela ligação de glicocorticoides a seus receptores localizados no córtex pré-frontal, resultando em déficits cognitivos (BUTTS et al., 2011). Além disso, estudos mostraram que o tratamento agudo com glicocorticóides, produto final da ativação do eixo HPA, foi capaz de aumentar a atividade dos neurônios dopaminérgicos (PIAZZA et al., 1996). Dados sugerem que o aumento do efluxo de dopamina é acionado pela ativação de receptores NMDA no hipocampo ventral, que é estimulado diretamente pelo córtex pré-frontal, levando a ativação dos neurônios dopaminérgicos na VTA (BUTTS et al., 2011; LEGAULT; WISE, 1999). O hipocampo ventral é a principal área associada com a regulação negativa do eixo HPA. Além disso, o hipocampo ventral não está somente associado à resposta ao estresse, mas pode também regular emoção e comportamento afetivos, portanto, representa um local de convergência do estresse com sintomas associados às doenças neuropsiquiátricas (LODGE; GRACE, 2011).

O estresse agudo leva ao aumento da atividade dos neurônios dopaminérgicos na VTA logo após a ocorrência do evento estressor (VALENTI; LODGE; GRACE, 2011). Porém, algumas horas após o estresse agudo ou o estresse crônico gerou uma diminuição da atividade dos neurônios dopaminérgicos na VTA, na amígdala e no hipocampo ventral (CHANG; GRACE, 2013; LIN et al., 2016; MOORE; ROSE; GRACE, 2001; VALENTI; GILL; GRACE, 2012). Estas alterações indicam que ao contrário do estresse agudo, que ativa o sistema dopaminérgico nas vias mesolímbica e mesocortical, o estresse crônico ou um tempo após o estresse agudo conduz a uma redução no número de neurônios dopaminérgicos ativos, sendo este um processo fisiológico de adaptação ao estresse. Além disso, a administração de antagonista dos receptores noradrenérgicos tanto sistemicamente, quanto intra-amígdala basolateral (BLA) reverteu essa diminuição da atividade dos neurônios dopaminérgicos, sugerindo que os sistemas noradrenégico e dopaminérgico interagem para gerar uma resposta apropriada a eventos estressores (CHANG; GRACE, 2013). É provável que a ação noradrenérgica sobre os neurônios dopaminérgicos da VTA seja modulada pela BLA.

Uma explicação para esses efeitos no sistema dopaminérgico seria que o aumento imediato na atividade dos neurônios dopaminérgicos logo após o evento estressor poderia facilitar a fuga, e a posterior atenuação da atividade desses neurônicos poderia impedir uma segunda ocorrência do evento estressor. Por isso, é importante compreender o papel do sistema dopaminérgico dentro do complexo mecanismo dos efeitos gerados pelo estresse crônico durante o desenvolvimento.

2. JUSTIFICATIVA

O estresse durante o desenvolvimento é um dos principais fatores que culminam em alterações comportamentais, morfológicas e estruturais no cérebro, podendo aumentar a probabilidade do indivíduo desenvolver alguns distúrbios neuropsiquiátricos. Diversos estudos mostraram que adultos que sofreram algum tipo de estresse durante os primeiros anos de vida apresentavam déficit cognitivo e maiores probabilidades de desenvolverem distúrbios de ansiedade e depressão. Além disso, estudos de neuroimagem estrutural mostraram alterações em diversas áreas no cérebro de pessoas que passaram por estresse crônico durante a infância. Estes resultados indicam que o estresse sofrido durante o neurodesenvolvimento tem efeitos duradouros que se estendem para a idade adulta.

As vias de sinalização dopaminérgica modulam diversas funções vitais do sistema nervoso, entre as quais estão o controle motor, a memória, atenção, aprendizado, aspectos afetivos e de recompensa, etc. Estudos têm mostrado o envolvimento da dopamina na etiologia de diversos transtornos psiquiátricos e sua importância para o desenvolvimento do cérebro.

O estresse pode alterar as vias de sinalização dopaminérgica, essas alterações sugerem que o desenvolvimento de vias neurais pode ser permanentemente alterado como resultado do estresse sofrido em um período crítico de neurodesenvolvimento. O mau desenvolvimento destas vias pode favorecer o desenvolvimento de esquizofrenia e outros distúrbios neuropsiquiátricos. Deste modo, torna-se essencial o melhor entendimento do papel do sistema dopaminérgico sobre os efeitos gerados pelo estresse durante o desenvolvimento.

Dados mostram que o estresse crônico diminui a ativação dos neurônios dopaminérgicos nas vias mesolímbica e mesocortical com isso, neste trabalho, espera-se que o tratamento com L-Dopa durante o estresse crônico de separação maternal reverta os efeitos comportamentais, em animais pré-púberes, gerados pela diminuição da sinalização dopaminérgica. Nossos resultados poderão contribuir para a elucidação do papel da dopamina sobre as alterações fisiológicas e comportamentais geradas pelo estresse.

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Estudar o papel do sistema dopaminérgico sobre os efeitos gerados pelo estresse no início da vida em animais jovens.

3.2 Objetivos específicos

Verificar os efeitos do tratamento com L-Dopa durante o estresse pós-natal na memória de curta e longa duração em camundongos machos e fêmeas pré-púberes.

Verificar os efeitos do tratamento com L-Dopa durante o estresse pós-natal sobre a atividade locomotora de camundongos machos e fêmeas pré-púberes.

Verificar os efeitos do tratamento com L-Dopa durante o estresse pós-natal sobre o comportamento tipo-ansioso de camundongos machos e fêmeas pré-púberes.

Verificar os efeitos do tratamento com L-Dopa durante o estresse pós-natal sobre o comportamento tipo-compulsivo de camundongos machos e fêmeas pré-púberes.

Verificar os efeitos do tratamento com L-Dopa durante o estresse pós-natal sobre o comportamento tipo-depressivo de camundongos machos e fêmeas pré-púberes.

Verificar se os efeitos do estresse pós-natal e do tratamento com L-Dopa foram capazes de alterar o volume do hipocampo de camundongos machos e fêmeas pré-púberes.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Animais Experimentais

Foram utilizados camundongos C57/BL6 fêmeas e machos como matrizes, com idade entre 8 e 12 semanas. Os animais foram mantidos em gaiolas dentro de uma estante ventilada com temperatura ambiente de 22 ±1°C e umidade 40-70%, em ciclo claro-escuro de 12/12 horas, e tiveram livre acesso à ração e água. O Comitê de Ética em Experimentação Animal da UFMG aprovou todos os experimentos, sob o protocolo n° 86/2016.

Os animais foram colocados para o cruzamento na proporção de 2 fêmeas para 1 macho, durante 7 dias. Após esse período, as fêmeas eram deixadas aos pares nas suas caixas, sendo separadas no provável 19º dia de gestação. Após o nascimento, a ninhada foi mantida junto com a mãe, e depois do 22º dia pós-natal, os filhotes eram separados de acordo com o sexo e mantidos sob as condições citadas acima.

Para que os animais fossem identificados de acordo com o tratamento recebido, eles tinham uma parte dos dedos indicador e mínimo das patas dianteiras, direitas e esquerdas cortados de acordo com o grupo que pertenciam. O número de animais por ninhada foi mantido entre 4 e 6.

4.2 Procedimento Experimental

Os animais foram divididos em seis grupos: (1) sem separação maternal e sem tratamento farmacológico (Naïve); (2) animais tratados intraperitonealmente com solução salina (SAL); (3) animais tratados com 50mg/Kg de L-Dopa (Sigma - Aldrich, D-1507) com 25mg/Kg de benserazida (Sigma – Aldrich, B-7283) um inibidor da degradação periférica de L-Dopa (DOPA); (4) animais que passaram pelo protocolo de separação maternal (SM); (5) animais que passaram pelo protocolo de separação maternal e tratados com salina (SM+SAL); (6) animais que foram tratados com L-Dopa e benserazida durante o protocolo de separação maternal (SM+DOPA).

Ao todo foram utilizadas 20 fêmeas e 11 machos Naïve, 10 fêmeas e 14 machos SAL, 12 fêmeas e 14 machos DOPA, 14 fêmeas e 19 machos SM, 20 fêmeas e 13 machos SM + SAL e 22 fêmeas e 16 machos SM + DOPA. As ninhadas foram separadas de forma que em cada uma delas continha animais de diferentes grupos, com exceção da ninhada Naïve. Assim,

animais SAL e DOPA ou SM, SM + SAL e SM + DOPA pertenciam a mesma ninhada, devido a isso, houve uma diferença grande no número de animais por grupo.

Do dia pós-natal 2 (P2) ao dia pós-natal 14 (P14) os filhotes receberam as injeções de L-Dopa ou de salina e logo em seguida foram expostos ao protocolo de separação maternal. Os animais foram separados diariamente da mãe por 180 minutos. Durante a separação maternal os animais da mesma ninhada foram mantidos juntos e aquecidos a uma temperatura de 32ºC ± 2ºC. Todos os animais foram pesados nos dias P2, P8, P15, P22 e P29.

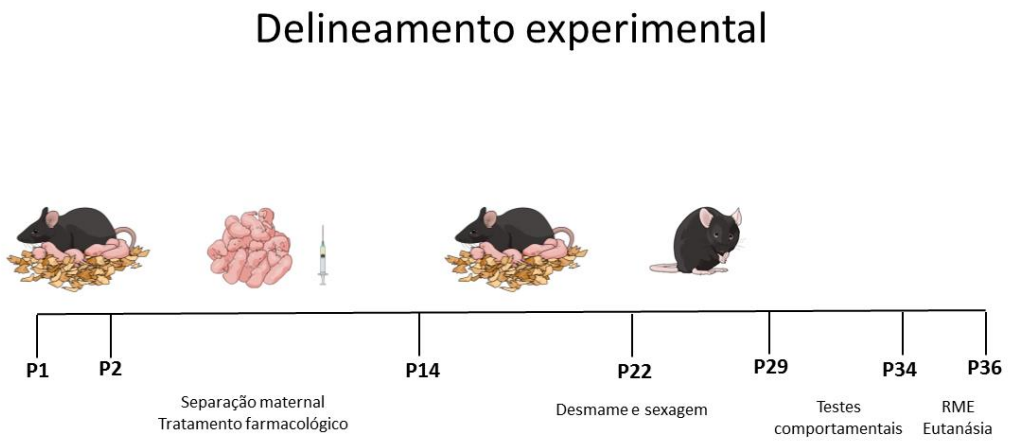

Figura 4: Procedimento experimental.

4.3 Testes Comportamentais

Ao completarem quatro semanas os animais foram submetidos aos testes comportamentais, visando avaliar alterações na manifestação fenotípica comportamental em decorrência do tratamento. Todos os protocolos foram conduzidos durante a fase clara do ciclo.

Os testes comportamentais foram realizados com machos e fêmeas separadamente assim que completaram 30 dias. Todos os animais passaram por todos os testes comportamentais na seguinte ordem: reconhecimento do objeto novo, atividade locomotora, labirinto em cruz elevado, enterrar bolinhas na maravalha e teste de nado forçado.

4.3.1 Reconhecimento do objeto novo (RON)

A tarefa de Reconhecimento do Objeto Novo (RON) acessa uma memória não espacial dependente de hipocampo (FERNANDEZ et al., 2008; PEREIRA et al., 2014) e baseia-se na premissa de que camundongos têm preferência natural por novidade. O protocolo utilizado foi descrito por GRESACK; FRICK, 2006. A habituação foi realizada no primeiro dia, no qual os animais foram colocados em uma caixa de plástico (50cm x 40cm x 20 cm) e tiveram 10 minutos para livre exploração. A fase de treino foi realizada 24hs depois da habituação. Os grupos foram reabituados durante 1 minuto na caixa e foram apresentados a dois objetos idênticos. O tempo de investigação em ambos os objetos até atingir 30s totais de exploração foi mensurado. Foi quantificado como exploração todas as vezes que o animal tocou o objeto com as patas dianteiras, nariz ou com as vibrissas. Para testar a memória de curta duração, 1 hora e meia após o treino, um dos objetos familiar ao animal foi trocado por um objeto novo. Para testar a memória de longa duração, 24 horas após o treino, os animais foram novamente reabituados durante 1 minuto e expostos a um objeto familiar e um objeto novo. Em ambos os testes, o tempo utilizado para acumular 30 segundos de exploração dos objetos foi registrado. A caixa foi higienizada com álcool 70% a cada novo teste para prevenir adaptações olfativas. Para a escolha dos objetos foram considerados o peso e a altura apropriados, para se evitar tanto o movimento do animal sobre o objeto quanto o movimento do objeto da sua posição inicial.

O coeficiente de exploração do objeto novo foi calculado dividindo-se o tempo de exploração do objeto novo sobre o tempo de exploração total.

4.3.2 Campo aberto (CA)

Utilizou-se o sistema automatizado (Actitrack v2.7.13.) para mensurar a atividade locomotora e exploratória dos animais. O aparato consiste em uma arena em acrílico que é acoplada a um sistema externo de infravermelho (25x25cm). Este sistema permite monitorar a distância total percorrida horizontalmente pelo animal, o tempo de exploração nas divisões feitas na arena (centro e periferia) e sua exploração vertical. O animal permaneceu na arena por 20 minutos em livre exploração. A caixa foi higienizada com álcool 70% antes que um novo teste fosse iniciado (BRANCHI; ALLEVA; COSTA, 2002).

4.3.3 Labirinto em cruz elevado (LCE)

O Labirinto em Cruz Elevado (LCE) é um método comumente utilizado para avaliar o comportamento do tipo-ansiedade. O aparato utilizado para a realização do teste consiste em

um labirinto de acrílico em forma de cruz, elevado a 30cm do solo, sendo dois braços abertos (30cm comprimento) e dois fechados (30cm de comprimento e altura de 50cm). A premissa do teste é a que animais que exibem o comportamento tipo-ansioso tendem a permanecer por menos tempo nos braços abertos do labirinto. Durante 5 minutos os animais exploraram livremente o labirinto e o tempo de permanência nos braços abertos e fechados, o número de *rearings*, comportamento em que o animal se apoia nas patas traseiras para explorar o ambiente verticalmente, *dippings*, quando o animal explora o ambiente colocando a cabeça para fora dos braços abertos, e a porcentagem de entradas no braço aberto foi mensurado (LISTER, 1987; PELLOW et al., 1985).

4.3.4 Enterrar bolinhas na maravalha (EBM)

O teste de Enterrar Bolinhas na Maravalha (EBM) é um teste utilizado para detectar o comportamento do tipo-compulsivo. Os animais foram individualmente colocados em uma caixa de acrílico (37cm x 21cm x 14cm) contendo 20 bolinhas de gude separadas entre si. A bolinhas foram colocadas por cima da maravalha, que foi colocada a uma profundidade de 5cm na caixa. A duração do teste foi de 20min e ao final foi mensurado o número de bolinhas, no mínimo 2/3 enterradas na maravalha. O comportamento do tipo-compulsivo e atribuído ao maior número de bolas de gude enterradas (THOMAS et al., 2009).

4.3.5 Nado forçado (NF)

O teste de nado forçado (NF) é uma tarefa utilizada para se avaliar o comportamento tipo-depressivo em roedores e foi conduzido como descrito por PORSOLT; LE PICHON; JALFRE, 1977. Os animais foram individualmente colocados em um cilindro de vidro vertical (17cm de diâmetro x 27 cm de altura) contendo água na temperatura de 26°C a 28°C. Os animais se movimentavam livremente na água e os seguintes comportamentos foram quantificados: tempo de escalada, frequência de escalada, tempo de nado, frequência de nado e o tempo de imobilidade, frequência de imobilidade e latência para a imobilidade durante 6 minutos.

4.4 Ressonância Magnética Estrutural (RME)

Os animais foram submetidos à análise do volume do cérebro pela técnica de ressonância magnética estrutural (RME), a fim de verificar se existem alterações morfológicas

no cérebro desses animais. Foram inicialmente anestesiados com isofurano (indução a 3% e manutenção a 1.5%) e oxigênio (2.5%), liberados na máscara facial acoplada ao nariz do animal. A cabeça do animal foi fixada a um suporte para evitar artefatos de movimento durante as análises.

As imagens foram obtidas utilizando-se um magneto de 4.7T NMR (Oxford Systems) controlado por console de imagens UNITY Inova-200 (Varian). O protocolo de imaginologia consistiu em imagens de múltiplas varreduras coronais (TR-300ms, TE=50ms), 20 contínuas, 1mm de espessura.

As análises foram feitas utilizando-se o programa Image J.

4.5 Análise estatística

Os dados obtidos foram analisados estatisticamente com os programas SigmaPlot 11.0 e GraphPad Prism 6. Para as análises do volume do hipocampo, foi utilizada a análise de variância de uma via (One way ANOVA). Para os testes comportamentais e de ganho de peso, foi utilizado a análise de variância de duas vias (Two way ANOVA). Foi utilizado Tukey como teste de comparação de médias dos tratamentos. O nível de significância usado foi $p < 0.05$. As figuras mostram os gráficos com as barras demonstrando a média ± SEM (erro padrão das médias). As figuras demonstram diferenças significativas por meio do símbolo (* $p \leq 0.05$). As tendências à diferença significativa foram apresentadas pelo símbolo (# $p \leq 0.1$). O número amostral de cada grupo está indicado nas barras referentes a cada grupo.

5. RESULTADOS

5.1 O estresse crônico por separação maternal e/ou o tratamento crônico com L-Dopa durante o desenvolvimento não alteraram o ganho de peso dos camundongos pré-púberes

Não foram observadas interações entre os fatores tratamento/estresse e idade (F (20,492) = 0.12 p = 0.18). Também não observamos diferença significativa entre os grupos experimentais (F (5,123) = 0.43 p = 0.82). No entanto, observamos diferenças significativas no peso dos animais ao longo dos dias (F (4,492) = 0.44 p < 0.0001), o que indica que todos os animais cresceram com o passar das semanas de forma linear (Fig. 6)

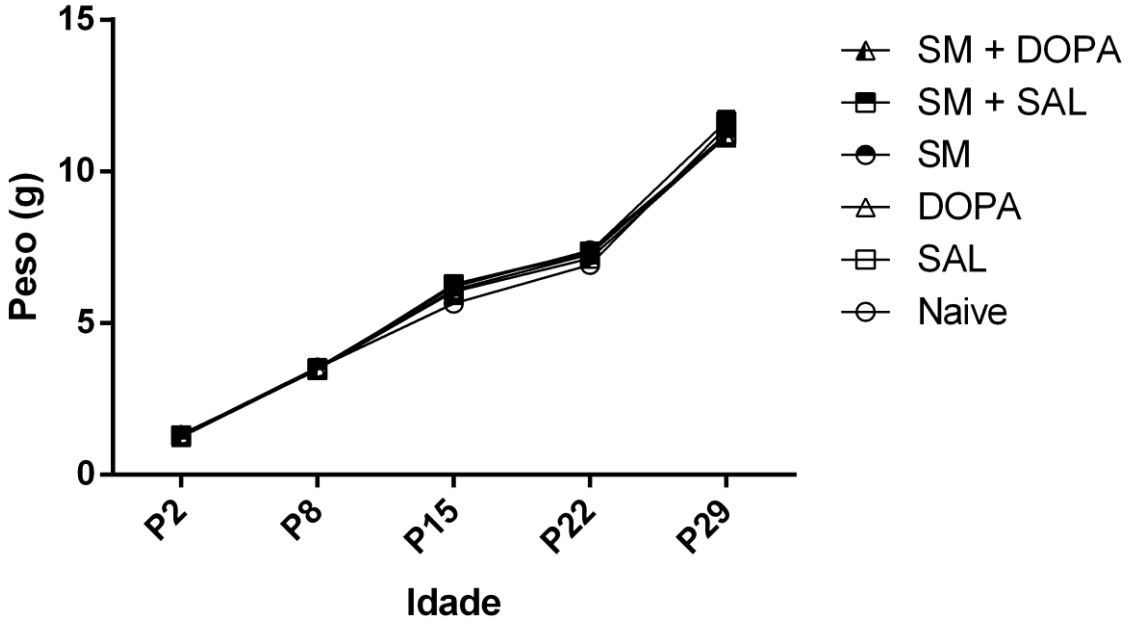

Figura 5: Efeito do estresse crônico por separação maternal e/ou do tratamento crônico com L-Dopa durante o desenvolvimento no ganho de peso. Os grupos de animais Naïve (n = 21), SAL (n = 18), DOPA (n = 22), SM (n = 23), SM+SAL (n = 20) e SM+DOPA (n = 25), foram pesados nos dias P2, P8, P15, P22 e P29. Média ± SEM; Two Way ANOVA.

5.2 O estresse crônico por separação maternal e/ou o tratamento com L-Dopa durante o desenvolvimento não alteraram a memória de curta nem a de longa duração em camundongos machos e fêmeas pré-púberes

Para verificar se o estresse crônico e/ou o tratamento com L-Dopa durante o desenvolvimento foram capazes de alterar a memória não espacial dependente de hipocampo, fizemos o teste de memória de reconhecimento de objeto novo.

5.2.1 Memória de curta duração

Não foram detectadas interações entre os fatores tratamento e estresse crônico em machos ($F(2,62) = 1.33$ $p = 0.27$) nem em fêmeas ($F(2,78) = 0.53$ $p = 0.58$) através da ANOVA de duas vias. Também não observamos diferenças significativas na memória de curta duração nos fatores tratamento de machos ($F(2,62) = 0.15$ $p = 0.85$) e fêmeas ($F(2,78) = 0.76$ $p = 0.46$), e nem no fator estresse de machos ($F(1,62) = 0.025$ $p = 0.87$). Já, no fator estresse, foi detectado diferença entre grupos em relação à memória de curta duração em fêmeas ($F(1,78) = 6.40$ $p = 0.01$) (Fig. 7 A e C). Porém, no teste de comparações múltiplas Tukey, não foi detectada diferença entre os grupos.

5.2.2 Memória de longa duração

Assim como na memória de curta duração, as análises da ANOVA de duas vias não detectaram interações entre os fatores tratamento e estresse crônico na memória de longa duração de animais machos ($F(2,62) = 1.04$ $p = 0.59$) e fêmeas ($F(2,78) = 1.46$ $p = 0.23$). Também não observamos diferenças significativas na memória de longa duração nos fatores tratamento de machos ($F(2,62) = 0.25$ $p = 0.77$) e fêmeas ($F(2,78) = 1.11$ $p = 0.33$), e no fator estresse de machos ($F(1,62) = 0.92$ $p = 0.34$) e fêmeas ($F(1,78) = 1.47$ $p = 0.22$) (Fig. 7 A e C).

Portanto, os animais machos e fêmeas pré-púberes que passaram pelo tratamento crônico com L-Dopa e/ou pelo estresse crônico de separação maternal durante o desenvolvimento, não apresentam alterações na memória não espacial dependente de hipocampo, tanto de curta (Fig. 7 A e C) quanto de longa duração (Fig. 7 B e D).

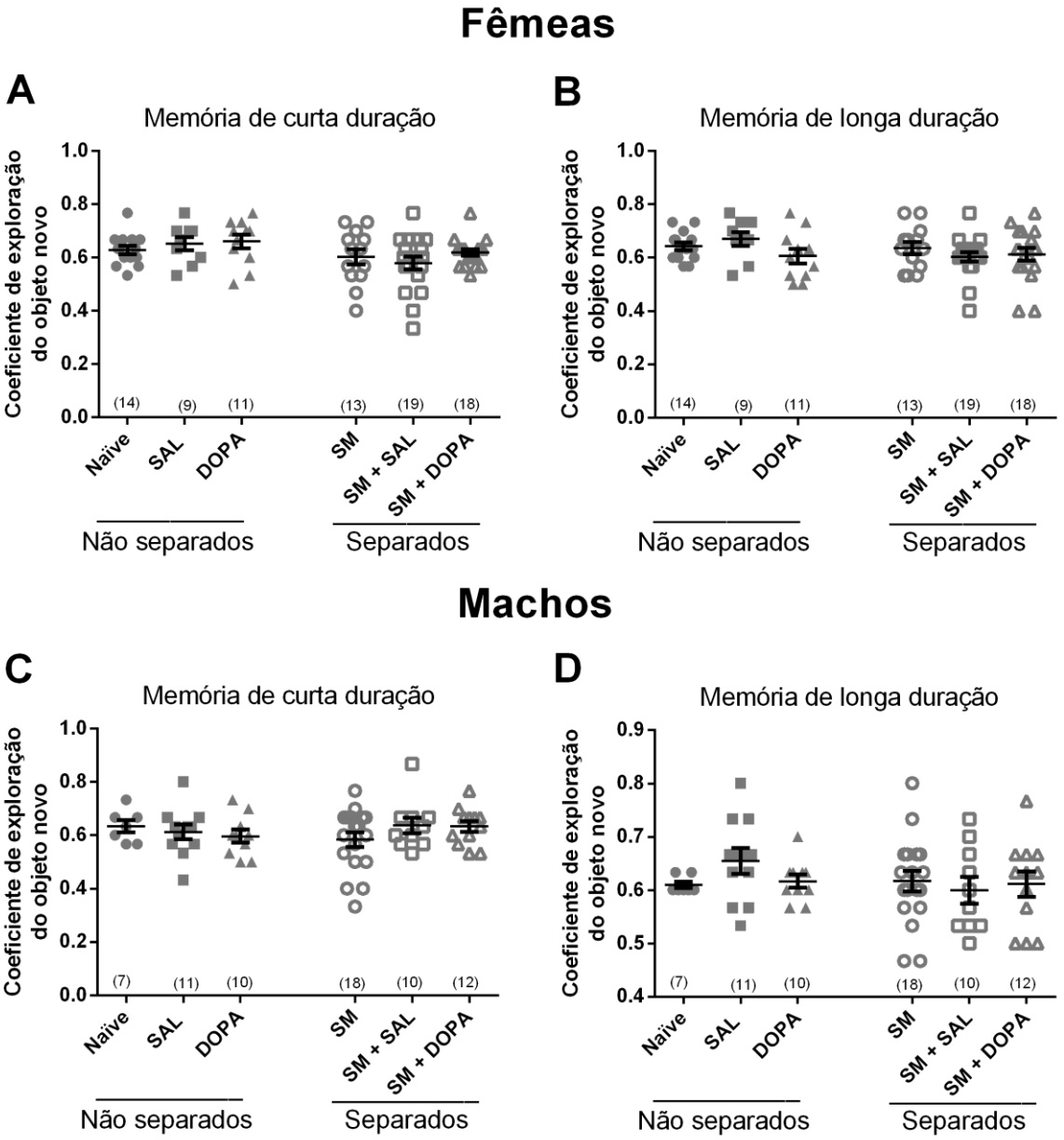

Figura 6: Efeito do estresse crônico por separação maternal e/ou do tratamento crônico com L-Dopa durante o desenvolvimento a memória não espacial dependente de hipocampo de curta e longa duração. Fêmeas (A-B) e machos (C-D) Naïve, SAL, DOPA, SM, SM+SAL e SM+DOPA passaram pelo teste de memória de reconhecimento de objeto novo. Média ± SEM; Two Way ANOVA.

5.3 O estresse crônico por separação maternal e/ou o tratamento crônico com L-Dopa durante o desenvolvimento não alteram o comportamento motor de camundongos machos e fêmeas pré-púberes

Investigamos se o estresse crônico por separação maternal e/ou tratamento crônico com L-Dopa durante o desenvolvimento foram capazes de alterar o comportamento locomotor exploratório de animais machos e fêmeas pré-púberes. Para isso, os animais foram submetidos ao teste de Campo Aberto e avaliamos a distância total percorrida, o tempo de permanência no centro, o número de *rearings* e a velocidade média do animal.

5.3.1 Distância total percorrida

Ao avaliarmos a distância total percorrida, não observamos interações entre os fatores tratamento e estresse crônico em machos ($F (2,65) = 0.49$ $p = 0.60$) nem em fêmeas ($F (2,82) = 2.52$ $p = 0.08$). Também não observamos diferenças significativas no tratamento em machos ($F (2,65) = 0.38$ $p = 0.68$) e fêmeas ($F (2,82) = 0.29$ $p = 0.74$), e no estresse crônico em machos ($F (1,65) = 0.057$ $p = 0.81$) e fêmeas ($F (1,82) = 1.24$ $p = 0.26$) (Fig. 8 A e E).

5.3.2 Tempo de permanência no centro

Ao avaliarmos o tempo que os animais permaneceram no centro da arena no teste de campo aberto, não identificamos interações entre os fatores em machos ($F (2,73) = 0.25$ $p = 0.77$) e em fêmeas ($F (2,82) = 1.66$ $p = 0.19$). Quando analisamos os fatores tratamento em machos ($F (2,73) = 0.52$ $p = 0.59$) e em fêmeas ($F (2,82) = 0.76$ $p = 0.46$), e no estresse crônico em machos ($F (1,73) = 2.40$ $p = 0.12$) e em fêmeas ($F (1,82) = 2.27$ $p = 0.13$) isoladamente, também não observamos diferenças significativas (Fig. 8 B e F).

5.3.3 Número de *rearings*

Quando analisamos o número de *rearings* em fêmeas, observamos uma interação entre os fatores ($F (2,82) = 5.39$ $p = 0.006$). Porém não observamos diferença no tratamento ($F (2,82) = 1.71$ $p = 0.18$) e no estresse crônico ($F (1,82) = 0.091$ $p = 0.76$) isoladamente. No teste de comparações múltiplas Tukey, detectamos que fêmeas DOPA apresentaram um aumento de 30% no número de *rearings* quando comparadas ao grupo Naïve ($p = 0,02$) (Fig. 8C). Além disso, vimos uma tendência não significância ao aumento de 32% no número de *rearings* das

fêmeas DOPA em relação às fêmeas SAL (p = 0,07). Ao avaliarmos esse mesmo comportamento em machos, não observamos interação entre os fatores (F (2,73) = 0.10 p = 0.90). Também não vimos diferenças significativas no tratamento (F (2,73) = 1.34 p = 0.26) e no estresse crônico (F (1,73) = 0.079 p = 0.77) (Fig. 8G).

5.3.4 Velocidade média

No parâmetro velocidade média, não observamos interações entre os fatores em machos (F (2,73) = 0.80 p = 0.45) e em fêmeas (F (2,82) = 2.42 p = 0.09). Também não observamos diferenças no fator tratamento em machos (F (2,73) = 0.37 p = 0.69) nem em fêmeas (F (2,82) = 0.30 p = 0.73), e no estresse crônico em machos (F (1,73) = 0.031 p = 0.85) e em fêmeas (F (1,82) = 1.13 p = 0.29) (Fig. 8 D e H).

O tratamento crônico com L-Dopa e/ou o estresse crônico por separação maternal não foram capazes de alterar o comportamento motor de camundongos machos e fêmeas. Porém, o tratamento crônico com L-Dopa durante os 14 primeiros dias de vida foi capaz de aumentar o número de exploração vertical apenas em camundongos fêmeas.

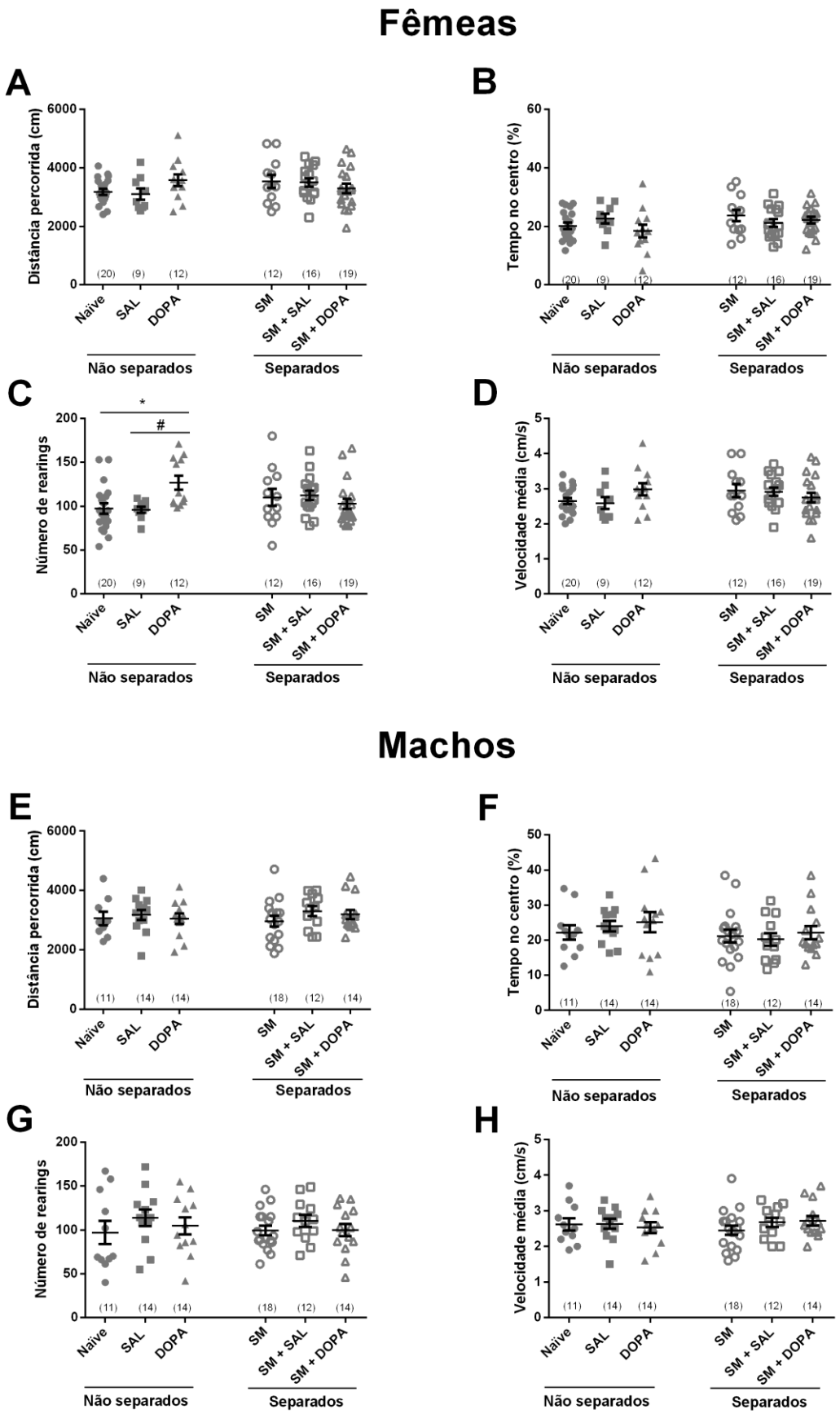

Figura 7: Efeito do estresse crônico e do tratamento com L-Dopa durante o desenvolvimento na atividade motora exploratória. Fêmeas (A-D) e machos (E-H) Naïve, SAL, DOPA, SM, SM+SAL e SM+DOPA passaram pelo teste de campo aberto e os parâmetros distância total percorrida, tempo de permanência no centro, número de *rearings* e velocidade média foram analisados. Média ± SEM; Two Way ANOVA. * $p \leq 0,05$; # $p \leq 0,1$.

5.4 Efeito do estresse crônico por separação maternal e/ou do tratamento crônico com L-Dopa durante o desenvolvimento no comportamento tipo ansioso de animais pré-púberes

Investigamos os efeitos do estresse crônico por separação maternal e do tratamento crônico com L-Dopa durante o desenvolvimento no comportamento tipo ansioso em camundongos machos e fêmeas jovens. Para isso, os animais foram submetidos ao teste de LCE.

5.4.1 O tratamento com L-Dopa juntamente com o estresse de separação maternal, aumentam o comportamento tipo ansioso em fêmeas pré-púberes

5.4.1.1 Entradas no braço aberto

Ao avaliamos a porcentagem de entradas no braço aberto, observamos uma interação entre os fatores tratamento e estresse ($F (2,88) = 3.25$ $p = 0.04$), e um efeito principal no tratamento ($F (2,88) = 3.68$ $p = 0.02$) mas não no estresse crônico ($F (1,88) = 0.38$ $p = 0.53$). No teste de comparações múltiplas Tukey, observamos que fêmeas SAL tiveram um aumento de 31% na porcentagem de entradas no braço aberto quando comparadas às fêmeas Naïve ($p = 0,02$) (Fig.9A).

5.4.1.2 Tempo no braço aberto

No parâmetro tempo no braço aberto, observamos uma interação entre os fatores ($F (2,88) = 6.19$ $p = 0.003$) porém, quando analisamos os fatores isoladamente não observamos diferenças significativas no tratamento ($F (2,88) = 1.15$ $p = 0.32$) nem no estresse crônico ($F (1,88) = 0.032$ $p = 0.85$). No teste de comparações múltiplas Tukey, vimos que as fêmeas DOPA ($p = 0,09$) e SM + SAL ($p = 0,08$) apresentam um aumento respectivamente de 41% e 31% no tempo no braço aberto, quando comparadas com as fêmeas Naïve (Fig. 9B).

5.4.1.3 Número de rearings

Quanto ao número de *rearings*, a ANOVA de duas vias não detectou interação entre os fatores ($F (2,88) = 0.40$ $p = 0.66$). Observamos um efeito principal do tratamento ($F (2,88) = 6.76$ $p = 0.001$), mas não do fator estresse ($F (1,88) = 0.038$ $p = 0.84$). O grupo SM + DOPA teve uma diminuição de 34% no número de *rearings* em relação ao grupo Naïve ($p = 0,01$) e

uma tendência de diminuição de 32% em relação ao grupo SM ($p = 0.05$) demonstrados pelo teste de comparações múltiplas Tukey (Fig. 9C).

5.4.1.4 Número de dippings

A análise ANOVA de duas vias não detectou interações entre o tratamento e o protocolo de estresse crônico no parâmetro número de *dippings* ($F (2,88) = 2.62$ $p = 0.07$). Ao analisar os fatores separadamente, também não observamos diferenças no tratamento ($F (2,88) = 1.22$ $p = 0.30$) nem no estresse crônico ($F (1,88) = 0.10$ $p = 0.74$). No teste de comparações múltiplas Tukey, observamos uma tendência de redução de 34% no número de *dippings* nas fêmeas SM + DOPA em relação às fêmeas SM ($p = 0.07$) (Fig. 9D).

5.4.1.5 Tempo no centro

O último parâmetro analisado no teste de LCE foi o tempo no centro. Nesse parâmetro não encontramos interações entre os fatores ($F (2,88) = 0.44$ $p = 0.66$). Também não detectamos diferenças quando analisamos os fatores tratamento ($F (2,88) = 1.02$ $p = 0.36$) e estresse crônico ($F (1,88) = 0.31$ $p = 0.57$) independentes (Fig. 9E).

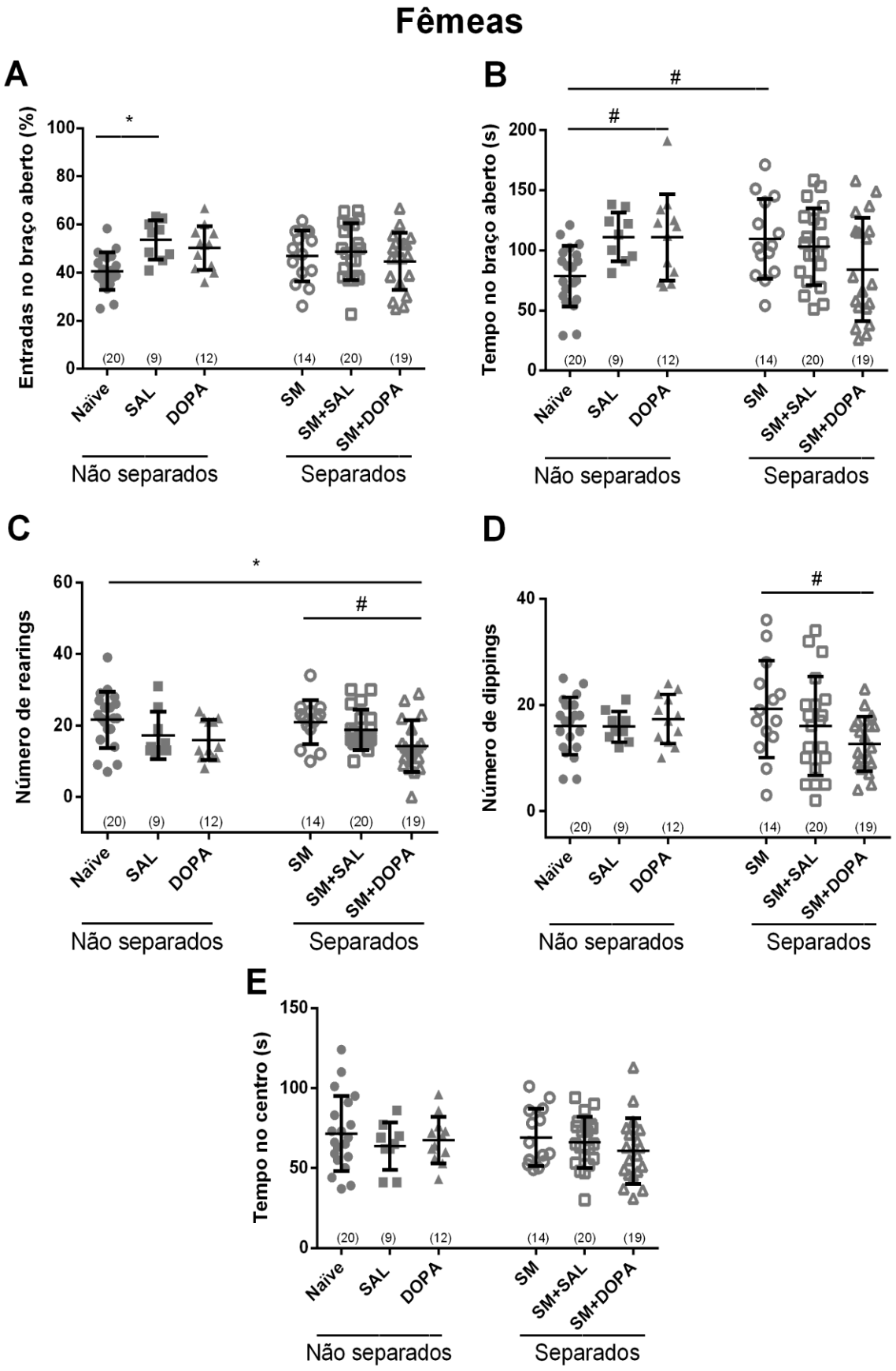

Figura 8: Efeito do estresse crônico de separação maternal e do tratamento crônico com L-Dopa durante o desenvolvimento no comportamento tipo ansioso em fêmeas Naïve, SAL, DOPA, SM, SM+SAL e SM+DOPA. Os animais passaram pelo teste de LCE e os parâmetros entradas no braço aberto, tempo no braço aberto, número de rearings, número de dippings e tempo no centro foram analisados. Média ± SEM; Two Way ANOVA. * $p \leq 0,05$; # $p \leq 0,1$.

5.4.2 O estresse de separação maternal juntamente com o tratamento com L-Dopa aumentam o comportamento tipo ansioso em machos pré-púberes

5.4.2.1 Entradas no braço aberto

No parâmetro entradas no braço aberto, a ANOVA de duas vias não detectou interação entre os fatores ($F(2,68) = 2.33$ $p = 0.10$). Não foram observados efeitos do tratamento ($F(2,68) = 0.08$ $p = 0.92$) nem do estresse crônico ($F(1,68) = 3.43$ $p = 0.06$). No teste de comparações múltiplas Tukey, observamos uma tendência à diminuição de 20% no número de entradas no braço aberto no grupo SM + DOPA em relação ao grupo DOPA ($p = 0.07$) (Fig. 10A).

5.4.2.2 Tempo no braço aberto

Ao analisarmos o tempo de permanência nos braços abertos, verificamos uma interação entre os fatores ($F(2,68) = 4.26$ $p = 0.01$) com efeito principal no estresse ($F(1,68) = 10.9$ $p = 0.001$) mas não no tratamento ($F(2,68) = 1.75$ $p = 0.18$). No teste de comparações múltiplas Tukey, vimos que machos DOPA apresentaram um aumento significativo de 44% no tempo de permanência nos braços abertos quando comparados com o grupo SM ($p = 0.02$), de 66% com o grupo SM + SAL ($p = 0.003$) e de 77% com o grupo SM + DOPA ($p = 0.001$). Também observamos uma tendência de aumento de 44% em relação ao grupo SAL ($p = 0.06$) (Fig. 10B).

5.4.2.3 Número de *rearings*

Ao analisarmos o número de explorações verticais dos animais, a ANOVA de duas vias não detectou interação entre os fatores ($F(2,68) = 0.29$ $p = 0.74$). A análise detectou um efeito no tratamento farmacológico ($F(2,68) = 3.63$ $p = 0.03$), mas não detectou efeitos do protocolo de estresse crônico ($F(1,68) = 0.26$ $p = 0.61$). Porém, o teste de comparações múltiplas Tukey não detectou diferenças entre os grupos (Fig. 10C).

5.4.2.4 Número de *dippings*

No parâmetro número de *dippings*, a ANOVA de duas vias identificou interação entre os fatores ($F(2,68) = 4.32$ $p = 0.01$). Porém não identificou efeitos dos fatores tratamento ($F(2,68) = 0.87$ $p = 0.42$) e estresse crônico ($F(1,68) = 0.56$ $p = 0.45$) isoladamente. No teste de comparações múltiplas Tukey, observamos que os camundongos SM + DOPA apresentaram

uma redução de 43% nesse parâmetro ao compararmos com o grupo DOPA ($p = 0.06$) (Fig. 10D).

5.4.2.5 Tempo no centro

O último parâmetro analisado no teste de LCE foi o tempo de permanência no centro do aparato. A ANOVA de duas vias mostrou que não houve interação entre os fatores ($F (2,68) = 0.02$ $p = 0.97$). Também não observamos diferenças nos fatores tratamento ($F (2,68) = 1.46$ $p = 0.23$) e estresse crônico ($F (1,68) = 2.93$ $p = 0.09$) (Fig. 10E).

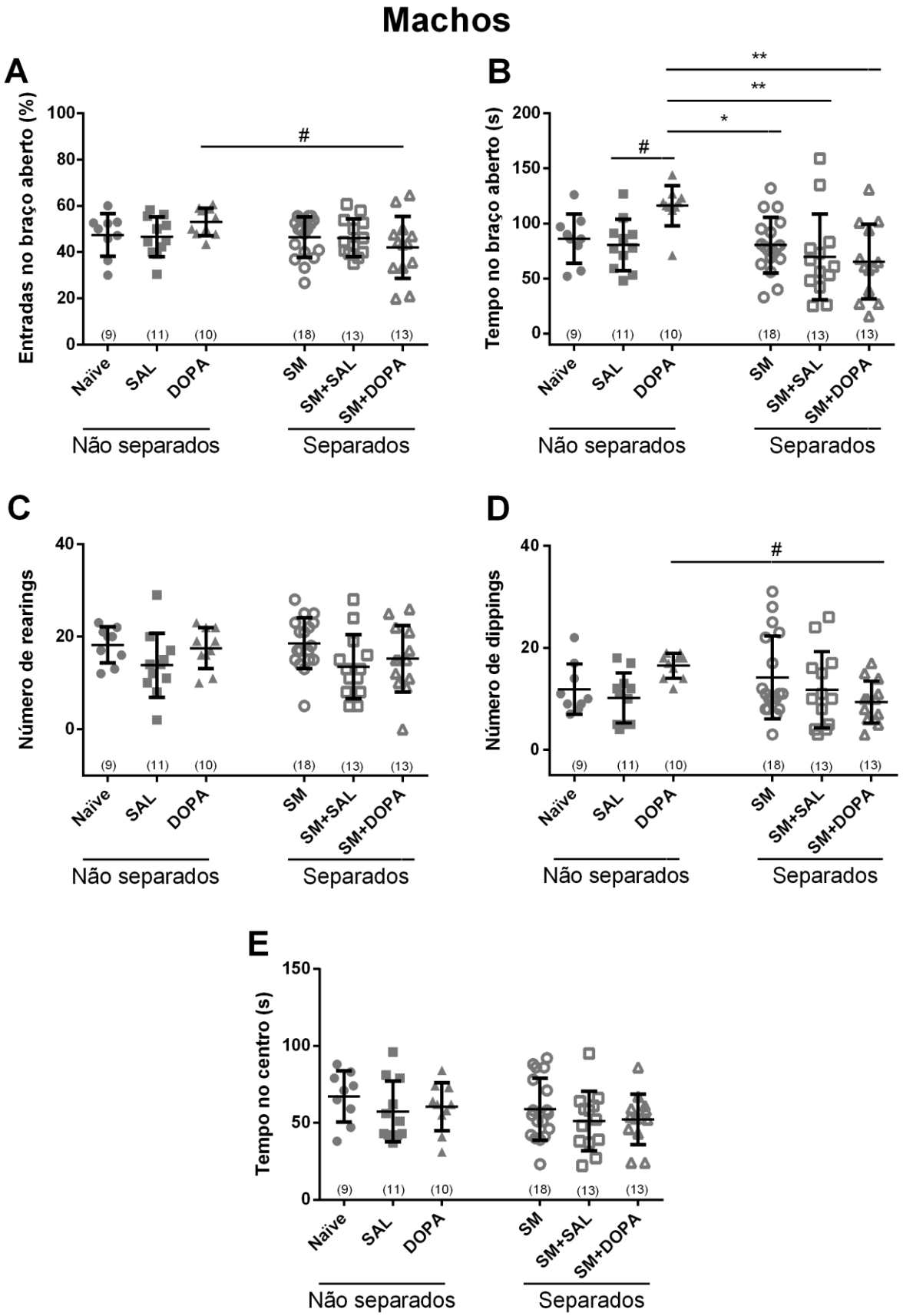

Figura 9: Efeito do estresse crônico por separação maternal e do tratamento crônico com L-Dopa durante o desenvolvimento no comportamento tipo ansioso em camundongos machos Naïve, SAL, DOPA, SM, SM+SAL e SM+DOPA. Os animais passaram pelo teste de LCE e os parâmetros entradas no braço aberto, tempo no braço aberto, número de rearings, número de dippings e tempo no centro foram analisados. Média ± SEM; Two Way ANOVA. * $p \leq 0,05$; ** $p \leq 0,01$; # $p \leq 0,1$.

5.5 Estresse crônico por separação maternal durante o desenvolvimento e/ou o tratamento crônico com L-Dopa não alteram o comportamento tipo compulsivo em animais machos e fêmeas pré-púberes

Para avaliarmos o comportamento tipo compulsivo nos camundongos que passaram pelo tratamento farmacológico e/ou pelo estresse crônico durante o desenvolvimento, submetemos os grupos de animais ao teste de enterrar bolinhas na maravalha. Ao avaliarmos o número de bolinhas enterradas, não observamos interações entre os fatores tratamento e estresse crônico em machos (F (2,74) = 0.55 p = 0.57) e em fêmeas (F (2,92) = 0.30 p = 0.73). Também não observamos diferenças significativas no fator tratamento em machos (F (2,74) = 0.043 p = 0.95) e fêmeas (F (2,92) = 1,77 p = 0.17). Observamos um efeito principal no estresse crônico tanto em machos (F (1,74) = 6.37 p = 0.01) quanto em fêmeas (F (1,92) = 7.20 p = 0.008) (Fig. 11 A e B). Porém, o teste de comparações múltiplas Tukey não detectou diferenças entre os grupos.

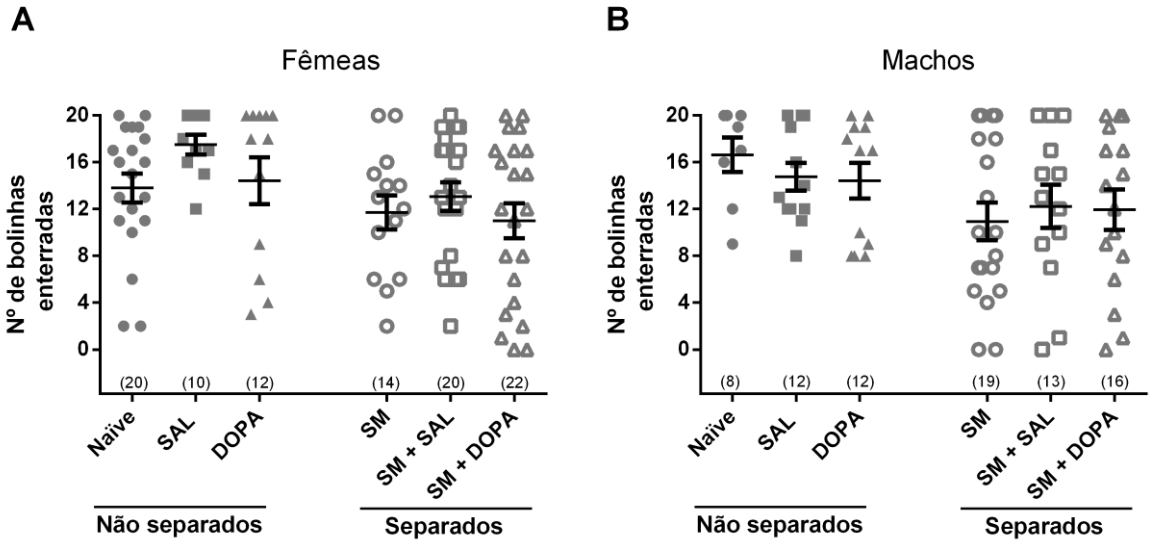

Figura 10: Efeito do estresse crônico por separação maternal e do tratamento crônico com L-Dopa durante o desenvolvimento no comportamento tipo impulsivo. Fêmeas (A) e machos (B) Naïve, SAL, DOPA, SM, SM+SAL e SM+DOPA foram testados pelo teste de enterrar bolinhas na maravalha. Média ± SEM; Two Way ANOVA.

5.6 Efeito do estresse crônico por separação maternal e do tratamento crônico com L-Dopa durante o desenvolvimento no comportamento tipo depressivo de animais pré-púberes

Para investigarmos os efeitos do estresse crônico por separação maternal e do tratamento crônico com L-Dopa durante o desenvolvimento no comportamento tipo depressivo, submetemos os animais machos e fêmeas jovens ao teste de NF.

5.6.1 O tratamento crônico com L-Dopa durante o desenvolvimento diminuiu o comportamento tipo depressivo em fêmeas pré-púberes

5.6.1.1 Latência

Ao analisarmos a latência, a ANOVA de duas vias não detectou interação entre os fatores (F (2,83) = 1.88 p = 0.57). Não houve efeito do tratamento (F = (2,83) = 2.34 p = 0.10) nem do estresse crônico (1,83) = 0.31 p = 0.57) (Fig. 12A).

5.6.1.2 Frequência de imobilidade

No parâmetro frequência de imobilidade a ANOVA detectou interação entre os fatores (F (2,83) = 3.29 p = 0.04) com efeito principal do tratamento (F (2,83) = 3.24 p = 0.04), mas não do estresse crônico (F (1,83) = 3.26 p = 0.07). No teste de comparações múltiplas Tukey, observamos que as fêmeas do grupo DOPA tiveram uma redução significativa de 47% na frequência de imobilidade aos compararmos com o grupo SM (p = 0.02), e de 43% quando comparadas com o grupo SM + DOPA (p = 0.03). Também observamos uma tendência de redução de 41% em relação ao grupo Naïve (p = 0.09) e de 45% em relação ao grupo SAL (p = 0.06) (Fig. 12B).

5.6.1.3 Tempo imóvel

Em relação ao tempo imóvel, a ANOVA de duas vias mostrou uma interação entre os fatores (F (2,83) = 4.74 p = 0.01), sem efeitos do tratamento (F (2,83) = 1.14 p = 0.32) bem como do estresse crônico (F (1,83) = 0.01 p = 0.88). No teste de comparações múltiplas Tukey, observamos uma tendência à diminuição de 63% nas fêmeas DOPA em relação às fêmeas SAL (p = 0.06) (Fig. 12 C).

5.6.1.4 Tempo de nado

Assim como no tempo imóvel, detectamos interação entre os fatores ($F (2,83) = 3.59$ $p = 0.03$) no parâmetro tempo de nado. Não foram detectados efeitos dos fatores tratamento ($F (2,83) = 0.82$ $p = 0.44$) e estresse ($F (1,83) = 2.00$ $p = 0.16$). No teste de comparações múltiplas Tukey, vimos uma tendência à redução de 14% no tempo de nado dos camundongos do grupo SM + DOPA em relação ao grupo DOPA ($p = 0.053$) (Fig. 12D).

5.6.1.5 Frequência de *climbing*

No parâmetro frequência de *climbing*, a ANOVA de duas vias mostrou que não existe interação entre os fatores ($F (2,83) = 2.97$ $p = 0.056$) bem como não detectamos efeito do fator tratamento ($F (2,83) = 1.01$ $p = 0.36$). Porém, a ANOVA detectou uma diferença no fator estresse crônico ($F (1,83) = 23.71$ $p < 0.0001$). No teste de comparações múltiplas Tukey, observamos um aumento de 119% na frequência de *climbing* no grupo SM ($p = 0.02$), de 138% no grupo SM + SAL ($p = 0.003$) e de 151% no grupo SM + DOPA ($p = 0.0006$) em relação ao grupo SAL. Também observamos um aumento de 89% da frequência de *climbing* no grupo SM + SAL ($p = 0.02$) e de 99% no grupo SM + DOPA ($p = 0.007$) em relação ao grupo DOPA (Fig. 12E).

5.6.1.6 Tempo de *climbing*

A ANOVA de duas vias mostrou que não existe interação entre os fatores ($F (2,83) = 0.53$ $p = 0.58$) no parâmetro tempo de *climbing*. Mas demonstramos um efeito principal do fator estresse ($F (1,83) = 11.34$ $p = 0.001$) e não do fator tratamento ($F (2,83) = 0.14$ $p = 0.86$). No teste de comparações múltiplas Tukey, observamos uma tendência de aumento de 266% no tempo de *climbing* do grupo SM + SAL em relação ao grupo SAL ($p = 0.08$) (Fig. 12 F).

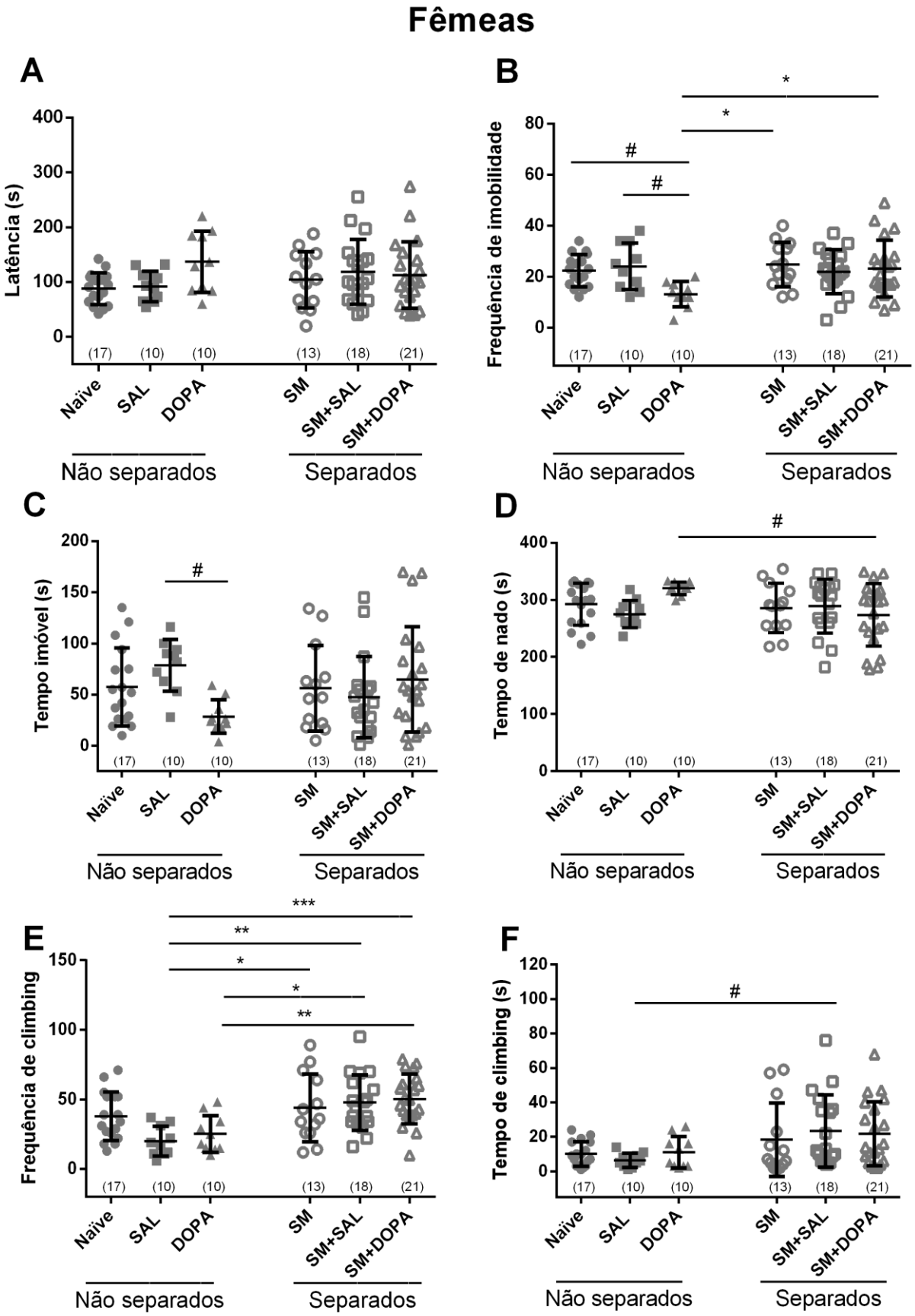

Figura 11: Efeito do estresse crônico por separação maternal e do tratamento crônico com L-Dopa durante o desenvolvimento no comportamento tipo depressivo. Fêmeas Naïve, SAL, DOPA, SM, SM+SAL e SM+DOPA foram submetidos ao teste de nado forçado e os parâmetros latência, frequência de imobilidade, tempo imóvel, tempo de nado, frequência de climbing e tempo de climbing foram analisados. Média ± SEM; Two Way ANOVA. * $p \leq 0,05$; ** $p \leq 0,01$; *** $p \leq 0,001$; # $p \leq 0,1$

5.6.2 O tratamento crônico com L-Dopa juntamente com o estresse crônico por separação maternal aumenta o comportamento tipo depressivo em machos pré-púberes

5.6.2.1 Latência

Por meio da análise de ANOVA de duas vias foi possível verificar que não existe interação entre os fatores ($F(2,68) = 0.61$ $p = 0.54$) no parâmetro latência. Assim como também não existe diferenças significativas no fator tratamento ($F(2,68) = 0.03$ $p = 0.96$). Porém, existe um efeito no fatore estresse ($F(1,68) = 7.49$ $p = 0.007$) que não foi detectado no teste de comparações múltiplas Tukey (Fig. 13A).

5.6.2.2 Frequência de imobilidade

Com relação a frequência de imobilidade, não houve interação entre os fatores ($F(2,68) = 2.72$ $p = 0.07$). Também não detectamos efeitos do tratamento ($F(2,68) = 0.30$ $p = 0.74$), mas sim do fator estresse ($F(1,68) = 15.71$ $p = 0.0002$). No teste de comparações múltiplas Tukey, observamos um aumento de 95% na frequência de imobilidade do grupo SM + DOPA em relação ao grupo SAL ($p = 0.007$) e de 105% em relação ao grupo DOPA ($p = 0.003$) (Fig. 13B).

5.6.2.3 Tempo imóvel

Não houve interação entre os fatores ($F(2,68) = 0.27$ $p = 0.75$) no tempo imóvel, bem como não detectamos efeitos do tratamento ($F(2,68) = 2.47$ $p = 0.09$). Foram encontrados efeitos apenas no fator estresse ($F(1,68) = 4.23$ $p = 0.04$). No teste de comparações múltiplas Tukey, não observamos diferenças entre os grupos (Fig. 13C).

5.6.2.4 Tempo de nado

No tempo de nado, não houve interação entre os fatores tratamento e estresse crônico ($F(2,68) = 0.21$ $p = 0.80$). A ANOVA de duas vias não mostrou interferência do fator tratamento ($F(2,68) = 1.11$ $p = 0.33$) mas sim do fator estresse crônico ($F(1,68) = 6.97$ $p = 0.01$). No teste de comparações múltiplas Tukey, não detectamos diferença entre os grupos (Fig. 13D).

5.6.2.5 Frequência de *climbing*

A ANOVA de duas vias demonstrou que existe interação entre os fatores ($F(2,68) = 3.82$ $p = 0.02$), bem como efeitos do tratamento ($F(2,68) = 9.009$ $p = 0.0003$) e do estresse

crônico (F (1,68) = 5.37 p = 0.02). No teste de comparações múltiplas Tukey, observamos que machos do grupo DOPA apresentam uma redução significativa na frequência de *climbing* quando comparados aos grupos Naïve (p = 0.0002), SM (p= 0.0004), SM + SAL (p= 0.004), SM + DOPA (p = 0.01) apresentam uma redução significativa respectivo de 64%, 61%, 58% e 54% (Fig. 13E).

5.6.2.6 Tempo de *climbing*

Ao analisarmos o tempo de *climbing*, não identificamos interação entre os fatores (F (2,68) = 0.13 p = 0.87). Não identificamos efeitos no fator estresse (F (1,68) = 3.36 p = 0.07) mas vimos um principal efeito do tratamento (F (2,68) = 5.15 p = 0.008). No teste de comparações múltiplas Tukey, demostramos um aumento significativo de 325% no tempo de *climbing* no grupo SM em relação ao grupo DOPA (p = 0.0006) (Fig. 13 F).

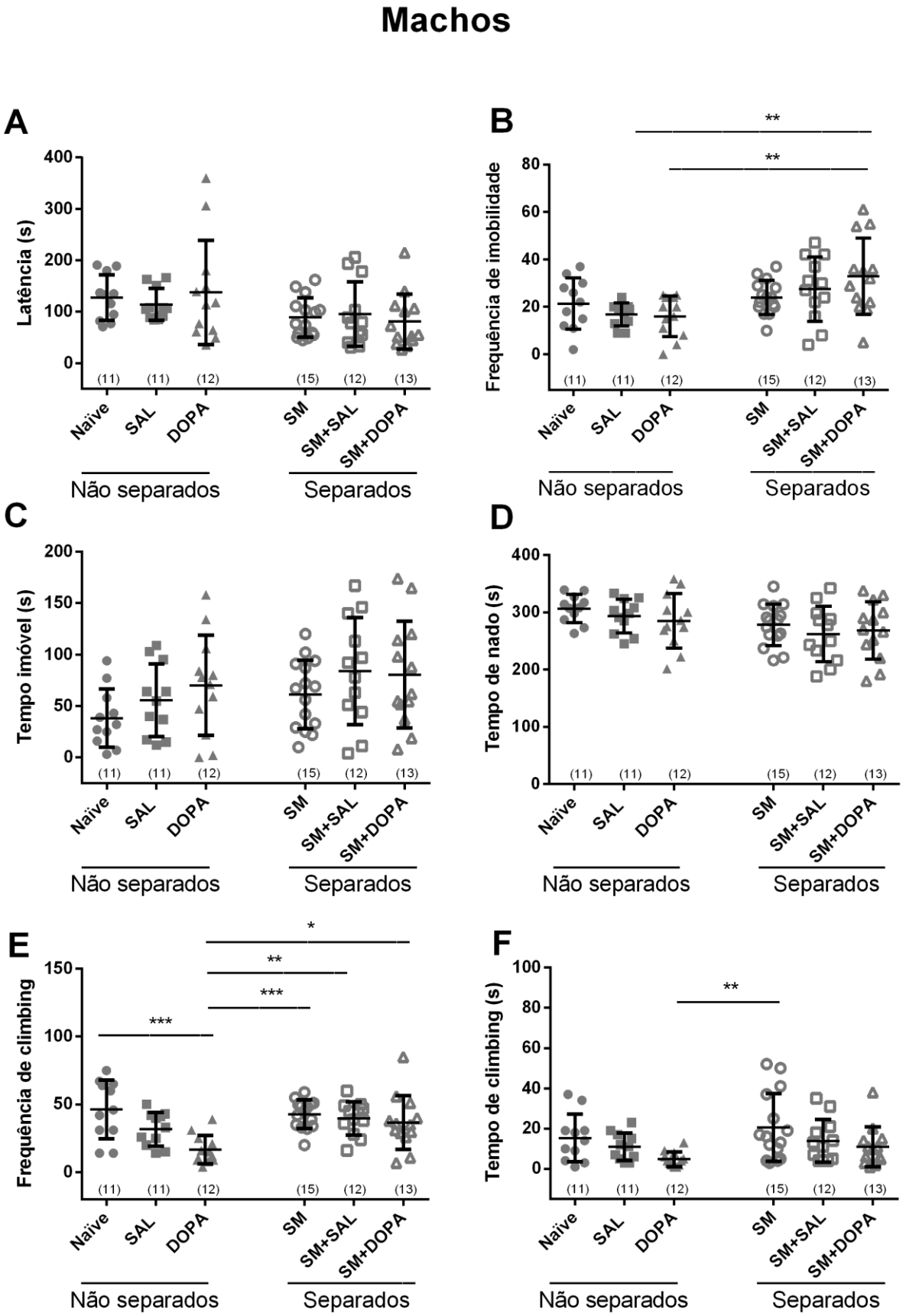

Figura 12: Efeito do estresse crônico por separação maternal e do tratamento crônico com L-Dopa durante o desenvolvimento no comportamento tipo depressivo. Machos Naïve, SAL, DOPA, SM, SM+SAL e SM+DOPA foram submetidos ao teste de nado forçado e os parâmetros latência, frequência de imobilidade, tempo imóvel, tempo de nado, frequência de climbing e tempo de climbing foram analisados. Média ± SEM; Two Way ANOVA. * $p \leq 0,05$; ** $p \leq 0,01$; *** $p \leq 0,001$; # $p \leq 0,1$.

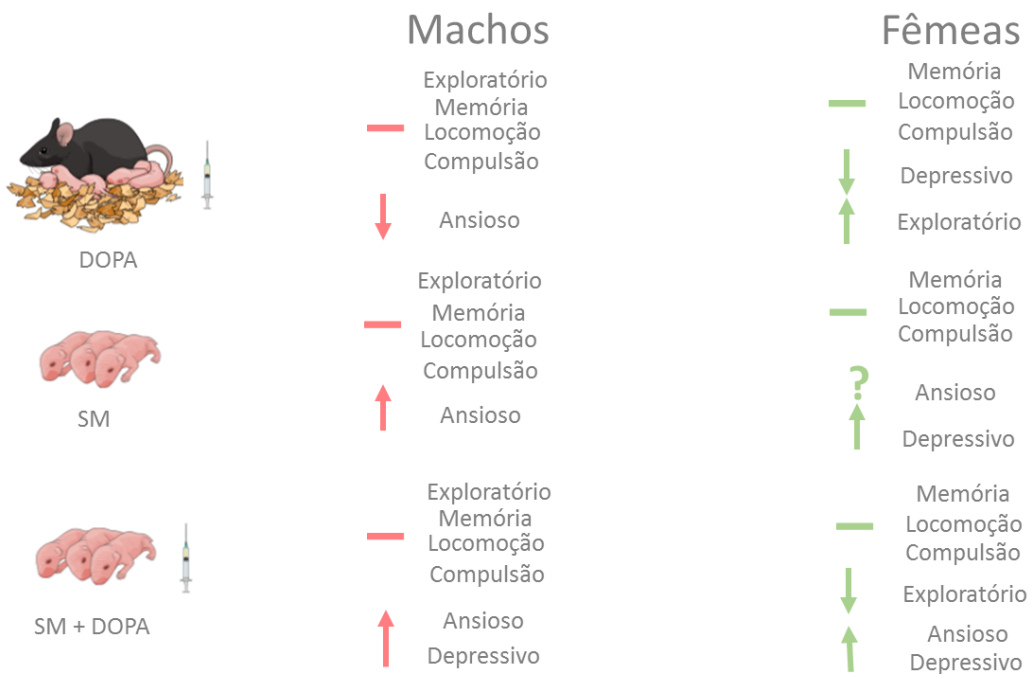

Figura 13: Resumo dos resultados comportamentais.

5.7 O estresse crônico por separação maternal e o tratamento crônico com L-Dopa durante o desenvolvimento não alteram o volume do hipocampo em animais pré-púberes

O volume do hipocampo é sensível ao estresse crônico durante o desenvolvimento (RIEM et al., 2015). Assim, o volume do hipocampo foi quantificado em animais naïve, SM, SM+SAL e SM+DOPA, utilizando-se a técnica de RME. Por meio de ANOVA de uma via, foi possível identificar que nem o estresse durante a SM e nem o tratamento com L-Dopa durante o desenvolvimento alteram o volume do hipocampo total de machos ($F (3,20) = 2,136$ $p = 0,133$) e fêmeas ($F (3,18) = 1,796$ $p = 0,191$) (Fig. 14C) e o volume do hipocampo ventral em machos ($F (3,20) = 1,912$ $p = 0,166$) e fêmeas ($F (3,18) = 0,523$ $p = 0,673$) (Fig. 14D).

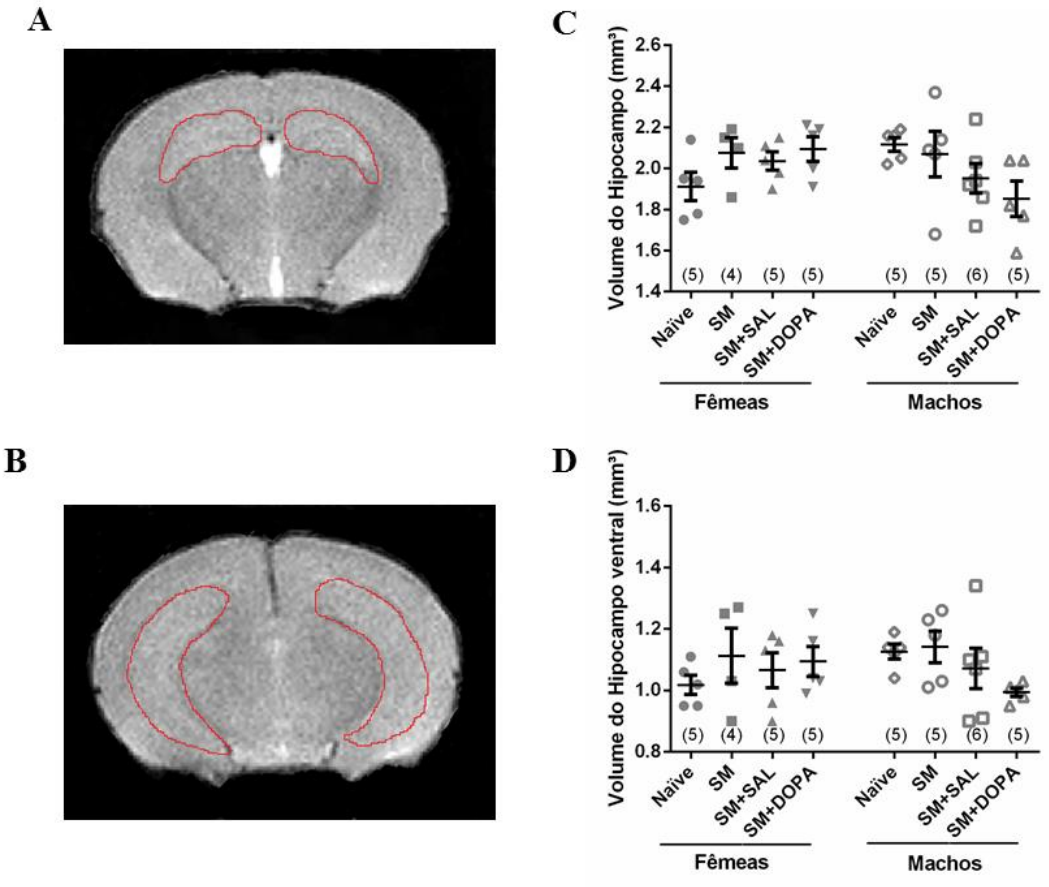

Figura 14: Efeito do estresse crônico por separação maternal e do tratamento crônico com L-Dopa durante o desenvolvimento no volume do hipocampo. Os grupos de animais Naïve, SM, SM+SAL e SM+DOPA, tiveram seus hipocampos analisados por Ressonância Magnética Estrutural. Imagens representativas do hipocampo dorsal (A) e ventral (B). (C) Quantificação do volume do hipocampo total. (D) Quantificação do volume do hipocampo ventral. Média ± SEM; Two Way ANOVA.

6. DISCUSSÃO

Alterações, mesmo que transitórias, na sinalização dopaminérgica durante o desenvolvimento estão associadas à modificações duradouras no cérebro, que podem levar a diversos transtornos psiquiátricos (JONES et al., 2000). Além disso, o estresse crônico no início da vida pode ser responsável pelo surgimento desses transtornos, como ansiedade e depressão (BIFULCO; BROWN; ADLER, 1991; LUPIEN et al., 2009). O aparecimento dos transtornos de ansiedade e depressão em sua maioria se dá durante a adolescência ou no início da fase adulta. Sabe-se que o estresse crônico gera uma diminuição na liberação de dopamina nas vias mesocortical e mesolímbica (MOORE; ROSE; GRACE, 2001; VALENTI; GILL; GRACE,

2012). Com isso, resolvemos investigar se o tratamento com L-Dopa durante o desenvolvimento seria capaz de alterar o comportamento de animais pré-púberes. Posteriormente, investigamos os efeitos comportamentais gerados pelo estresse crônico de separação maternal e se o tratamento com L-Dopa juntamente com o estresse seria capaz de alterar o comportamento dos animais.

Vimos que o tratamento com L-Dopa, além de aumentar o comportamento exploratório (Fig. 8C), diminui o comportamento depressivo nas fêmeas (Fig. 12). Em machos, observamos que o tratamento com L-Dopa durante o desenvolvimento aumentou o tempo de permanência no braço aberto (Fig. 10B) e diminuiu a frequência de *climbing* no NF (Fig. 13E). Portanto, os resultados sugerem que os machos ficaram menos ansiosos. Com isso, sugerimos que o tratamento com L-Dopa durante o desenvolvimento teria efeitos comportamentais dimórficos, mas teria um efeito protetor em ambos os gêneros.

Já o estresse de separação maternal em fêmeas mostrou um aumento no tempo de permanência nos braços abertos (Fig. 9B), sugerindo diminuição do comportamento tipo ansioso. Sugerimos a realização de outros testes comportamentais para melhor entender os efeitos da SM no comportamento em fêmeas. No NF, vimos um aumento na frequência de imobilidade em relação às fêmeas DOPA (Fig. 12B), sugerindo aumento do comportamento depressivo. Em machos, vimos uma diminuição no tempo de permanência nos braços abertos (Fig. 10B) e um aumento tanto na frequência (Fig. 13E) quanto no tempo de *climbing* (Fig. 13F) ao compararmos com os machos DOPA, sugerindo um aumento do comportamento tipo ansioso.

Quando analisamos o tratamento com L-Dopa juntamente com o estresse de separação maternal, vimos que as fêmeas no LCE mostraram uma diminuição da exploração (Fig. 9C e D). No NF, vimos um aumento na frequência de imobilidade (Fig. 12B), uma diminuição no tempo de nado (Fig. 12D) e aumento na frequência de *climbing* (Fig. 12E) comparados aos animais DOPA, sugerindo um aumento do comportamento tipo ansioso e tipo depressivo. Apesar de ter aumentado a frequência de imobilidade (Fig. 12 B), não encontramos diferenças no parâmetro tempo de imobilidade (Fig. 12C). Já os machos, no teste LCE mostraram uma diminuição do tempo de permanência nos braços abertos (Fig. 10B), na porcentagem de entradas nos braços abertos (Fig. 10A) e na exploração (Fig. 10D) em relação ao grupo DOPA. No NF os machos apresentaram um aumento na frequência de imobilidade (Fig. 13B) além de um aumento na frequência de *climbing* (Fig. 13E) em relação aos animais DOPA, sugerindo que esses animais possuem um aumento do comportamento tipo ansioso e tipo depressivo.

Segundo o relatório da ONU de 2017, a depressão e a ansiedade são mais frequentemente encontradas em mulheres do que em homens (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2017). Embora haja maior prevalência de depressão em mulheres, isso não significa que homens não podem desenvolver o transtorno. Como vimos em nosso estudo, o aumento de dopamina juntamente com o evento estressor durante a infância, pode ser responsável pelo desenvolvimento de depressão e ansiedade em machos e em fêmeas. Porém, esse resultado não é observado quando os animais passam apenas pelo tratamento com L-Dopa. Nossos dados sugerem que existe uma forte interação entre o estresse e os níveis elevados de dopamina.

Apesar de nossos experimentos terem sido realizados durante a quarta semana de vida dos animais, fase na qual ainda não ocorreu maturação sexual, nossos resultados sugerem um dimorfismo sexual nos comportamentos tipo ansioso e tipo depressivo induzidos pelo estresse crônico durante o desenvolvimento.

A exposição aos hormônios sexuais começa durante já o desenvolvimento fetal, resultando em diferenciação sexual dos órgãos genitais, cérebro e de tecidos específicos. Durante o início da vida, o eixo hipotálamo-hipófise-gonadal está ativo, isso é importante para o desenvolvimento adequado e para a diferenciação entre os gêneros (ALTEMUS et al., 2016). Portanto, apesar de durante os procedimentos experimentais os animais do presente estudo não estarem maduros sexualmente, durante o protocolo de SM e durante o tratamento farmacológico, os animais estavam expostos aos hormônios sexuais, sugerindo que a diferença prévia à exposição aos hormônios sexuais pode ser determinante para modular o comportamento.

O teste comportamental EBM é um teste utilizado para analisar o comportamento tipo compulsivo dos animais, que é um comportamento característico para o alívio a algum tipo de ansiedade. No presente estudo, observamos o fenótipo tipo ansioso tanto machos quanto em fêmeas, porém, no teste EBM, nossos resultados não demonstraram diferenças significativas entre os grupos (Fig. 11). Além disso, dispersão dos dados amostrais no EBM é maior em camundongos que foram submetidos ao protocolo de SM. Com isso, sugerimos realizar outros testes comportamentais para podermos avaliar melhor o comportamento tipo compulsivo nesses animais.

Ao avaliarmos os efeitos do estresse crônico e/ou do tratamento com L-Dopa durante o desenvolvimento em uma memória não espacial dependente de hipocampo, observamos que os animais mantiveram as memórias de curta e longa duração (Fig 7). Quanto à memória não

espacial dependente de hipocampo, a literatura é controversa. Alguns estudos mostraram que o protocolo de SM não prejudica a memória de reconhecimento de objetos em adultos (KLUG; VAN DEN BUUSE, 2012; TATA et al., 2015) e outros afirmam o contrário (SOLAS et al., 2010; WEI et al., 2012). Porém, um estudo publicado em 2017, mostrou que diferentes protocolos de SM levam a diferentes efeitos na memória de reconhecimento de objeto novo. Os autores mostraram que 10 dias de SM foi capaz de alterar a memória apenas em animais adolescentes, já o protocolo de 21 dias de SM gerou alterações que persistiam na vida adulta (BANQUERI; MENDEZ; ARIAS, 2017).

Ao analisarmos os efeitos do estresse crônico e/ou do tratamento com L-Dopa durante o desenvolvimento no comportamento motor exploratório, foi possível notar que nem o tratamento com L-Dopa e nem o protocolo de estresse crônico foram capazes de alterar o comportamento locomotor dos animais (Fig. 8). Esses dados são consistentes com os encontrados na literatura, onde animais submetidos ao protocolo de SM não apresentaram alterações na atividade locomotora (KLUG; VAN DEN BUUSE, 2012; SHIN et al., 2016). Além disso, esses dados mostram que os resultados observados no teste de NF não foram devido a um prejuízo locomotor.

Durante o protocolo de separação maternal, os filhotes permaneceram 180 minutos separados de sua mãe durante 13 dias consecutivos, com isso, os grupos de animais que foram submetidos a esse protocolo poderiam tem um prejuízo no ganho de peso. Ao avaliarmos os efeitos do estresse crônico e/ou do tratamento com L-Dopa durante o desenvolvimento no ganho de peso dos animais, não observamos diferenças entre os grupos (Fig. 6). Isso sugere que os animais que foram separados, se alimentavam mais frequentemente quando eram devolvidos para sua mãe. Esses dados são consistentes com os encontrados na literatura. Dados de um estudo publicado em 2016 mostraram que animais que passaram pelo protocolo de separação maternal não diferiram de animais controle no ganho de peso (SHIN et al., 2016). Caso o ganho de peso entre os grupos fosse diferente, poderia influenciar nos comportamentos analisados. Portanto, os resultados sugerem que as alterações comportamentais observadas no presente estudo não foram originadas por atraso no desenvolvimento físico.

Sabe-se que o hipocampo é a região responsável pelo controle negativo do eixo HPA (HERMAN et al., 1995), além disso, o volume do hipocampo é sensível ao estresse crônico no início da vida (RIEM et al., 2015). Com base em nossos resultados, nem o estresse crônico durante o desenvolvimento pós-natal, nem o tratamento com L-Dopa foram capazes de alterar o volume do hipocampo (Figura 14). Estudos com humanos mostraram que a alteração

volumétrica observada no hipocampo devido ao estresse durante o desenvolvimento, pode aparecer ainda durante a infância (HANSON et al., 2015), outros estudos mostram que essas alterações surgem apenas após a adolescência (WOON; HEDGES, 2008), sugerindo um hipocampo inicialmente normal, com desenvolvimento volumétrico anormal ocorrendo após o evento estressor. Porém, um trabalho publicado em 2014 mostrou que a alteração de volume no hipocampo observada em crianças que passaram por algum evento estressor estava relacionada à polimorfismos de genes ligados ao sistema do estresse (PAGLIACCIO et al., 2014). Portanto, sugerimos que o que poderia determinar a alteração volumétrica no hipocampo é uma interação existente entre genes e ambiente. Além disso, apesar de nossos resultados não terem apresentado diferenças significativas entre os grupos (Fig. 14), observamos uma tendência à redução no volume do hipocampo, principalmente do hipocampo ventral, nos machos SM+DOPA (Fig, 14D). Sabemos que o hipocampo ventral é responsável pela regulação das emoções (FANSELOW; DONG, 2010), assim, esse resultado corrobora com nossos dados comportamentais que sugerem um aumento do comportamento ansioso e depressivo nesses animais. Devido ao baixo número de amostras analisadas, é possível que detectemos alterações com o aumento do número de amostras.

Alterações no hipocampo ventral estão associadas com distúrbios psiquiátricos incluindo a esquizofrenia (HECKERS; KONRADI, 2002; NELSON et al., 2011). A esquizofrenia é uma doença que afeta principalmente homens, caracterizada pelo aumento da liberação de dopamina na via mesolímbica e pode ser desencadeada por algum fator estressante ao longo da vida (INSEL, 2010; MESSIAS; CHEN; EATON, 2007). Além disso, pacientes esquizofrênicos apresentam uma leve redução no volume do hipocampo (NELSON et al., 2011). Portanto, nossos resultados de machos SM+DOPA sugerem alterações de vias dopaminérgicas e volumétricas nestes animais, assim como as alterações observadas em pacientes esquizofrênicos.

Vários fatores limitantes podem ser observados em nosso trabalho. Não foram feitas dosagens dos níveis de dopamina e seus metabólitos para podermos confirmarmos o aumento dos níveis de dopamina após a injeção intraperitoneal de L-Dopa. Além disso, não dosamos os níveis de hormônios envolvidos na resposta ao estresse. Outros testes comportamentais devem ser feitos para melhor caracterização dos fenótipos depressivo e ansioso observado nos animais, além de testes que avaliam outros comportamentos relacionados com estresse crônico no início da vida e com a circuitaria dopaminérgica, como a agressividade.

A SM realizada no presente estudo consistiu em deixar os animais da mesma ninhada juntos e aquecidos. Esse é um protocolo já validado de estresse durante o desenvolvimento, porém, é considerado um estresse médio. Dados mostram que os efeitos cerebrais vistos como consequências da separação maternal se dão pela falta de contato físico (LEVINE, 2001, 2002), sugerindo que o contato com os irmãos minimizaria o estresse gerado pela ausência da mãe. A partir disso, pretendemos realizar os mesmos procedimentos em animais isolados dos irmãos.

Para maiores investigações dos dados obtidos até aqui, nossa intenção é realizar outros testes comportamentais. Além disso, pretendemos fazer o tratamento com agonistas dos receptores dopaminérgicos para verificarmos a influência de cada receptor nos fenótipos observados. Pretendemos também, analisar a morfologia do hipocampo nos animais SAL e DOPA, além de analisar outras regiões do cérebro, como por exemplo a amígdala, que está relacionada principalmente ao comportamento tipo ansioso.

7. CONCLUSÃO

Com esse estudo podemos concluir que (I) o aumento de dopamina durante o desenvolvimento diminui o comportamento tipo depressivo em fêmeas e o comportamento tipo ansioso em machos, (II) o estresse crônico por separação maternal aumenta o comportamento tipo ansioso em machos e o comportamento tipo depressivo em fêmeas e (III) o estresse crônico por separação maternal juntamente com o tratamento com L-Dopa aumenta o comportamento tipo ansioso e tipo depressivo em fêmeas e em machos. Assim, observamos que o estresse crônico e o aumento da dopamina durante o desenvolvimento, geram consequências comportamentais dimórficas em animais pré-púberes**.**

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ACKERMAN, P. T. et al. Prevalence of post traumatic stress disorder and other psychiatric diagnoses in three groups of abused children (sexual, physical, and both). **Child Abuse & Neglect**, v. 22, n. 8, p. 759–774, 1998.

ALTEMUS, M. et al. Sex differences in anxiety and depression clinical perspectives. **Front Neuroendocrinology**, v. 35, n. 3, p. 320–330, 2016.

ARAKI, K.Y., SIMS, J.R., AND BHIDE, P. G. Dopamine receptor mRNA and protein expression in the mouse corpus striatum and cerebral cortex during pre- and postnatal development. **Brain Res**, v. 1156, p. 31–45, 2007.

BALE, T. L.; EPPERSON, C. N. Sex differences and stress across the lifespan. **Nature neuroscience**, v. 18, n. 10, p. 1413–20, 2015.

BANQUERI, M.; MENDEZ, M.; ARIAS, J. L. Behavioral effects in adolescence and early adulthood in two length models of maternal separation in male rats. **Behavioural Brain Research**, v. 324, p. 77–86, 2017.

BEAULIEU, J.; GAINETDINOV, R. R. The Physiology , Signaling , and Pharmacology of Dopamine Receptors. v. 63, n. 1, p. 182–217, 2011.

BENTIVOGLIO, M.; MORELLI, M. **The organization and circuits of mesencephalic dopaminergic neurons and the distribution of dopamine receptors in the brain**. [s.l: s.n.]. v. 21

BICK, J.; NELSON, C. A. Early Adverse Experiences and the Developing Brain. **Neuropsychopharmacology**, v. 41, n. 1, p. 177–196, 2016.

BIFULCO, A.; BROWN, G. W.; ADLER, Z. Early sexual abuse and clinical depression in adult life. **The British Journal of Psychiatry**, v. 159, p. 115–122, 1991.

BJÖRKLUND, A.; DUNNETT, S. B. Dopamine neuron systems in the brain: an update. **Trends in Neurosciences**, v. 30, n. 5, p. 194–202, 2007.

BLASCHKO, H. The activity of l(—)-dopa decarboxylase. **The Journal of Physiology**, v. 101, n. 3, p. 337–349, 1942.

BOWMAN, R. E. et al. Sexually dimorphic effects of prenatal stress on cognition, hormonal responses, and central neurotransmitters. **Endocrinology**, v. 145, n. 8, p. 3778–3787, 2004.

BRANCHI, I.; ALLEVA, E.; COSTA, L. G. Effects of perinatal exposure to a polybrominated diphenyl ether (PBDE 99) on mouse neurobehavioural development. **NeuroToxicology**, v. 23, n. 3, p. 375–384, 2002.

BROWN, J. et al. Childhood Abuse and Neglect: Specificity of Effects on Adolescent and Young Adult Depression and Suicidality. **Journal of the American Academy of Child & Adolescent Psychiatry**, v. 38, n. 12, p. 1490–1496, 1999.

BUTTS, K. A et al. Glucocorticoid receptors in the prefrontal cortex regulate stress-evoked dopamine efflux and aspects of executive function. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 108, n. 45, p. 18459–64, nov. 2011.

CARLSSON, A. et al. On the presence of 3-Hydroxytyramine in Brain. **Science**, v. 127, n. 3296, p. 471, 1957.

CARPENTER, M.; PETER, P. Nigrostriatal and Nigrothalamic Fibers in the Rhesus Monkey. **Journal of Comparative Neurology**, v. 788, p. 779–788, 1972.

CHANG, C.; GRACE, A. A. Amygdala β-noradrenergic receptors modulate delayed downregulation of dopamine activity following restraint. **The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience**, v. 33, n. 4, p. 1441–50, jan. 2013.

COHEN, R. A et al. Early life stress and morphometry of the adult anterior cingulate cortex and caudate nuclei. **Biological psychiatry**, v. 59, n. 10, p. 975–82, maio 2006.

COSTA, R. **Estresse infantil**.

CRANDALL, J. E. et al. Dopamine Receptor Activation Modulates GABA Neuron Migration from the Basal Forebrain to the Cerebral Cortex. **Journal of neuroscience**, v. 27, n. 14, p. 3813–3822, 2009.

DE KLOET, E. R.; JOËLS, M.; HOLSBOER, F. Stress and the brain: from adaptation to disease. **Nature Reviews Neuroscience**, v. 6, n. 6, p. 463–475, 2005.

DIAZ, J. et al. Selective Expression of Dopamine D 3 Receptor mRNA in Proliferative Zones during Embryonic Development of the Rat Brain. v. 17, n. 11,

p. 4282–4292, 1997.

DUNNETT, S. B. Motor funtion(s) of the nigrostriatal dopamine system: studies of lesions and behavior. **Handbook of Chemical Neuroanatomy**, v. 21, n. Chapter V, p. 237–301, 2005.

FANSELOW, M.; DONG, H.-W. Are the Dorsal and Ventral Hippocampus functionally distinct structures. **Neuron**, v. 65, n. 1, p. 1–25, 2010.

FERGUSSON, D. M.; HORWOOD, L. J.; LYNSKEY, M. T. Childhood Sexual Abuse and Psychiatric Disorder in Young Adulthood: II. Psychiatric Outcomes of Childhood Sexual Abuse. **Journal of the American Academy of Child & Adolescent Psychiatry**, v. 35, n. 10, p. 1365–1374, 1996.

FERNANDEZ, S. M. et al. ESTRADIOL-INDUCED ENHANCEMENT OF OBJECT MEMORY CONSOLIDATION INVOLVES HIPPOCAMPAL ERK ACTIVATION AND MEMBRANE-BOUND ESTROGEN RECEPTORS. **Journal of Neuroscience**, v. 28, n. 35, p. 8660–8667, 2008.

GIRAULT, J.-A.; GREENGARD, P. The Neurobiology of Dopamine Signaling. **Archives of Neurology**, v. 61, n. 5, p. 641, 2004.

GRESACK, J. E.; FRICK, K. M. Post-training estrogen enhances spatial and object memory consolidation in female mice. **Pharmacology Biochemistry and Behavior**, v. 84, n. 1, p. 112–119, 2006.

HANSON, J. L. et al. Behavioral problems after early life stress: Contributions of the hippocampus and amygdala. **Biological Psychiatry**, v. 77, n.

4, p. 314–323, 2015.

HART, H.; RUBIA, K. Neuroimaging of child abuse: a critical review. **Frontiers in human neuroscience**, v. 6, n. March, p. 52, jan. 2012.

HECKERS, S.; KONRADI, C. Hippocampal neurons in schizophrenia. **Journal of Neural Transmission**, v. 109, n. 5–6, p. 891–905, 2002.

HERLENIUS, E.; LAGERCRANTZ, H. Development of neurotransmitter systems during critical periods. **Experimental Neurology**, v. 190, n. SUPPL. 1, p. 8–21, 2004.

HERMAN, J. P. et al. Contribution of the Ventral Subiculum to Inhibitory Regulation of the Hypothalamo Pituitary Adrenocortical Axis. **Journal of Neuroendocrinology**, v. 7, n. 6, p. 475–482, 1995.

INSEL, T. R. Rethinking schizophrenia. **Nature**, v. 468, n. 7321, p. 187–193, 2010.

JONES, L. B. et al. In Utero Cocaine-Induced Dysfunction of Dopamine D 1 Receptor Signaling And Abnormal Differentiation of Cerebral Cortical Neurons. **The Journal of neuroscience**, v. 20, n. 12, p. 4606–4614, 2000.

KEBABIAN, J. W.; CALNE, D. B. Multiple receptors for dopanime. **Nature**, v. 277, 1979.

KENDLER, K. et al. Childhood Sexual Abuse and Adult Psychiatric and Substance Use Disorders in Women. **Arch Gen Psychiatry**, v. 57, 2000.

KESSLER, R. C. et al. Childhood adversities and adult psychopathology in

the WHO World Mental Health Surveys. **The British journal of psychiatry : the journal of mental science**, v. 197, n. 5, p. 378–85, nov. 2010.

KLUG, M.; VAN DEN BUUSE, M. Chronic cannabinoid treatment during young adulthood induces sex-specific behavioural deficits in maternally separated rats. **Behavioural Brain Research**, v. 233, n. 2, p. 305–313, 2012.

KUNDAKOVIC, M.; CHAMPAGNE, F. A. Early-Life Experience, Epigenetics, and the Developing Brain. **Neuropsychopharmacology**, v. 40, n. 1, p. 141–153, 2015.

LEGAULT, M.; WISE, R. A. Injections of N-methyl-D-aspartate into the ventral hippocampus increase extracellular dopamine in the ventral tegmental area and nucleus accumbens. **Synapse**, v. 31, n. 4, p. 241–249, 1999.

LEVINE, S. The ontogeny of the hypothalamic–pituitary–adrenal axis. The influence of many factors. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 746, p. 275–288, 1994.

LEVINE, S. Primary social relationships influence the development of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis in the rat. **Physiology and Behavior**, v. 73, n. 3, p. 255–260, 2001.

LEVINE, S. Regulation of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis in the neonatal rat: The role of maternal behavior. **Neurotoxicity Research**, v. 4, n. 5–6, p. 557–564, 2002.

LIN, C. C. et al. Traumatic stress causes distinctive effects on fear circuit

catecholamines and the fear extinction profile in a rodent model of posttraumatic stress disorder. **European Neuropsychopharmacology**, v. 26, n. 9, p. 1484–1495, 2016.

LISTER, R. The use of a plus-maze to measure anxiety in the mouse. **Psychopharmacology**, v. 92, n. 2, p. 0–5, 1987.

LODGE, D. J.; GRACE, A. A. Developmental pathology, dopamine, stress and schizophrenia. **International journal of developmental neuroscience : the official journal of the International Society for Developmental Neuroscience**, v. 29, n. 3, p. 207–13, maio 2011.

LUPIEN, S. J. et al. Effects of stress throughout the lifespan on the brain, behaviour and cognition. **Nature Reviews Neuroscience**, v. 10, n. 6, p. 434–445, 2009.

LYONS, D. J.; HELLYSAZ, A.; BROBERGER, C. Prolactin Regulates Tuberoinfundibular Dopamine Neuron Discharge Pattern: Novel Feedback Control Mechanisms in the Lactotrophic Axis. **Journal of Neuroscience**, v. 32, n. 23, p. 8074–8083, 2012.

MCEWEN, B. S. Protective and damaging effects of stress mediators: Central role of the brain. **Dialogues in Clinical Neuroscience**, v. 8, n. 4, p. 367–381, 2006.

MCEWEN, B. S. et al. Mechanisms of stress in the brain. **Nature neuroscience**, v. 18, n. 10, p. 1353–63, 2015.

MESSIAS, E.; CHEN, C.; EATON, W. Epidemiology of Schizophrenia: Review of Finding and Myths. **National Institutes of Health**, v. 30(3), n. 3, p. 323–338, 2007.

MISSALE, C. et al. Dopamine Receptors: From Structure to Function. **Physiol Rev**, v. 78, n. 1, p. 189–225, 1998.

MONEY, K. M.; STANWOOD, G. D. Developmental origins of brain disorders: roles for dopamine. **Frontiers in cellular neuroscience**, v. 7, n. December, p. 260, 2013.

MONTAGU, K. A. Catechol compounds in rat tissues and in brains of different animals. **Nature**, v. 180, n. 4579, p. 244–245, 1957.

MOORE, H.; ROSE, H. J.; GRACE, A. A. Chronic cold stress reduces the spontaneous activity of ventral tegmental dopamine neurons. **Neuropsychopharmacology**, v. 24, n. 4, p. 410–419, 2001.

NELSON, M. D. et al. Hippocampal Volume Reduction in Schizophrenia as Assessed by Magnetic Resonance Imaging. v. 55, n. May 1998, p. 433–440, 2011.

NEVE, K. A; SEAMANS, J. K.; TRANTHAM-DAVIDSON, H. Dopamine Receptor Signaling. **Journal of Receptor and Signal Transduction Research**, v. 24, n. 3, p. 165–205, 2004.

ORGANIZAÇÃO PAN-AMERICANA DA SAÚDE. **Aumenta o número de pessoas com depressão no mundo**.

PAGLIACCIO, D. et al. Stress-System Genes and Life Stress Predict Cortisol Levels and Amygdala and Hippocampal Volumes in Children. **Neuropsychopharmacology**, v. 39, n. 5, p. 1245–1253, 2014.

PELLOW, S. et al. Validation of open : closed arm entries in an elevated plus-maze as a measure of anxiety in the rat. **Journal of Neuroscience Methods**, v. 14, n. 3, p. 149–167, 1985.

PEREIRA, L. M. et al. Estradiol enhances object recognition memory in Swiss female mice by activating hippocampal estrogen receptor ?? **Neurobiology of Learning and Memory**, v. 114, p. 1–9, 2014.

PIAZZA, P. V. et al. Glucocorticoids have state-dependent stimulant effects on the mesencephalic dopaminergic transmission. **PNAS**, v. 93, n. August, p. 8716–8720, 1996.

PORSOLT, R. D.; LE PICHON, M.; JALFRE, M. Depression: a new animal model sensitive to antidepressant treatments. **Nature**, v. 266, n. 5604, p. 730–732, 1977.

PRUESSNER, J. C. Dopamine Release in Response to a Psychological Stress in Humans and Its Relationship to Early Life Maternal Care: A Positron Emission Tomography Study Using [11C]Raclopride. **Journal of Neuroscience**, v. 24, n. 11, p. 2825–2831, 2004.

RAMOS, E. G. ESTRESSE INFANTIL: IMPACTOS SOBRE O DESEMPENHO E SAÚDE DO ESCOLAR. **Psicologia em Foco**, v. 5, 2015.

RIEM, M. M. E. et al. Beating the brain about abuse: Empirical and meta-analytic studies of the association between maltreatment and hippocampal volume across childhood and adolescence. **Development and Psychopathology**, v. 27, n. 2, p. 507–520, 2015.

SCHEDULE, D. I. A Prospective Investigation of Major Depressive Disorder and Comorbidity in Abused and Neglected Children Grown Up. **Arch Gen Psychiatry**, v. 64, p. 49–56, 2007.

SCHULTZ, W. Dopamine neurons and their role in reward mechanisms. **Current Opinion in Neurobiology**, v. 7, n. 2, p. 191–197, 1997.

SCOTT, K. M. et al. Childhood maltreatment and DSM-IV adult mental disorders: comparison of prospective and retrospective findings. **The British journal of psychiatry : the journal of mental science**, v. 200, n. 6, p. 469–75, jun. 2012.

SCOTT, K. M.; SMITH, D. R.; ELLIS, P. M. Prospectively Ascertained Child Maltreatment and Its Association With DSM-IV Mental Disorders in Young Adults. **Archives of General Psychiatry**, v. 67, n. 7, p. 712, 2010.

SEEMAN, P. Targeting the dopamine D 2 receptor in schizophrenia. **Expert Opinion on Therapeutic Targets**, v. 10, n. 4, p. 515–531, 18 ago. 2006.

SEIGER, Å.; OLSON, L. Early prenatal ontogeny of central monoamine neurons in the rat: Fluorescence histochemical observations. **Zeitschrift Anatomie und Entwicklungsgeschichte**, v. 140, n. 3, p. 281–318, 1973.

SELYE, H. A syndrome produced by diverse nocuous agents. **Nature**, 1936.

SESACK, S. R.; GRACE, A. A. Cortico-Basal Ganglia reward network: microcircuitry. **Neuropsychopharmacology : official publication of the American College of Neuropsychopharmacology**, v. 35, n. 1, p. 27–47, jan. 2010a.

SESACK, S. R.; GRACE, A. A. Cortico-Basal Ganglia Reward Network: Microcircuitry. **Neuropsychopharmacology**, v. 35, n. 1, p. 27–47, 2010b.

SHEARMAN, L. P.; ZEITZER, J.; WEAVER, D. R. Widespread expression of functional D 1 -dopamine receptors in fetal rat brain. **Developmental Brain Research**, v. 102, p. 105–115, 1997.

SHIN, S. Y. et al. Adolescent mice show anxiety- and aggressive-like behavior and the reduction of long-term potentiation in mossy fiber-CA3 synapses after neonatal maternal separation. **Neuroscience**, v. 316, n. December, p. 221–231, 2016.

SOLAS, M. et al. Interactions Between Age, Stress and Insulin on Cognition: Implications for Alzheimer's Disease. **Neuropsychopharmacology**, p. 1664–1673, 2010.

SOUZA, B. R.; ROMANO-SILVA, M. A.; TROPEPE, V. Dopamine D2 receptor activity modulates Akt signaling and alters GABAergic neuron development and motor behavior in zebrafish larvae. **The Journal of**

neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience, v. 31, n. 14, p. 5512–5525, 2011.

SOUZA, B. R.; TROPEPE, V. The role of dopaminergic signalling during larval zebrafish brain development: A tool for investigating the developmental basis of neuropsychiatric disorders. **Reviews in the Neurosciences**, v. 22, n. 1, p. 107–119, 2011.

STERLING, P.; REASON, J. Allostasis: a new paradigm to explain arousal pathology. **Handbook of life stress, cognition and health**, 1988.

SUNDSTRÖM, E. et al. Neurochemical differentiation of human bulbospinal monoaminergic neurons during the first trimester. **Developmental Brain Research**, v. 75, n. 1, p. 1–12, 1993.

SVENNINGSSON, P. et al. DARPP-32: an integrator of neurotransmission. **Annual review of pharmacology and toxicology**, v. 44, p. 269–296, 2004.

TATA, D. A. et al. Effects of maternal separation on behavior and brain damage in adult rats exposed to neonatal hypoxia-ischemia. **Behavioural Brain Research**, v. 280, p. 51–61, 2015.

TEICHER, M. H. et al. Childhood neglect is associated with reduced corpus callosum area. **Biological psychiatry**, v. 56, n. 2, p. 80–5, jul. 2004.

THOMAS, A. et al. Marble burying reflects a repetitive and perseverative behavior more than novelty-induced anxiety. **Psychopharmacology**, v. 204, n. 2,

p. 361–373, 2009.

TIDEY, J. W.; MICZEK, K. A. Social defeat stress selectively alters mesocorticolimbic dopamine release: An in vivo microdialysis study. **Brain Research**, v. 721, n. 1–2, p. 140–149, 1996.

VALENTI, O.; GILL, K. M.; GRACE, A. A. Different stressors produce excitation or inhibition of mesolimbic dopamine neuron activity: Response alteration by stress pre-exposure Ornella. **European Journal Neuroscience**, v. 35, n. 8, p. 1312–1321, 2012.

VALENTI, O.; LODGE, D. J.; GRACE, A. A. Aversie stimuli alter ventral tegmental area dopamine neuron activity via a common action in the ventral hippocampus. **Journal of Neuroscience**, v. 31, n. 11, p. 4280–4289, 2011.

WEI, L. et al. Early Life Stress Inhibits Expression of a Novel Innate Immune Pathway in the Developing Hippocampus. **Neuropsychopharmacology**, v. 37, n. 2, p. 567–580, 2012.

WOON, F. L.; HEDGES, D. W. Hippocampal and amygdala volumes in children and adults with childhood maltreatment-related posttraumatic stress disorder: a meta-analysis. **Hippocampus**, v. 18, n. 8, p. 729–36, jan. 2008.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Investing in treatment for depression and anxiety leads to fourfold return**.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. Depression and other common mental disorders: global health estimates. **World Health Organization**, p. 1–24,

2017.