

Universidade Federal de Minas Gerais  
Instituto de Ciências Biológicas  
Pós-graduação em Ciências Biológicas: Fisiologia e Farmacologia

**Laila Blanc Árabe**

EFEITOS DO ESTRESSE POR SEPARAÇÃO MATERNAL EM MICRÓGLIAS DE  
CAMUNDONGOS MACHOS E FÊMEAS

BELO HORIZONTE  
2021

Laila Blanc Árabe

EFEITOS DO ESTRESSE POR SEPARAÇÃO MATERNAL EM MICRÓGLIAS DE  
CAMUNDONGOS MACHOS E FÊMEAS

**Versão Final**

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

Co-orientador: Prof. Dr. André Gustavo de Oliveira

BELO HORIZONTE

2021

043

Árabe, Laila Blanc.

Efeitos do estresse por separação maternal em micróglia de camundongos machos e fêmeas [manuscrito] / Laila Blanc Árabe. - 2021.

64 f. : il. ; 29,5 cm.

Orientador: Dr. Bruno Rezende de Souza. Coorientação: André Gustavo de Oliveira.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Minas Gerais, Instituto de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Fisiologia e Farmacologia.

1. Fisiologia. 2. Microglia. 3. Transtornos de Estresse Pós-Traumáticos. I. Souza, Bruno Rezende de. II. Oliveira, André Gustavo de. III Universidade Federal de Minas Gerais. Instituto de Ciências Biológicas. IV. Título.

CDU: 612



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS  
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FISIOLOGIA E FARMACOLOGIA

**FOLHA DE APROVAÇÃO DA DEFESA DA DISSERTAÇÃO N° 545 DE LAILA BLANC ÁRABE**

**"Efeitos do Estresse Por Separação Maternal Em Micróglia de Camundongos Machos e Fêmeas"**

**LAILA BLANC ÁRABE**

Dissertação de Mestrado defendida e aprovada, no dia **21 de outubro de 2021**, pela Banca Examinadora constituída pelos seguintes professores:

**Prof. Dr. Antônio Carlos Pinheiro de Oliveira**, ICB/UFMG  
**Prof. Dr. Rodrigo Cunha Alvim de Menezes**, DECBI/UFOP  
**Prof. Dr. Bruno Rezende de Souza**, ICB/UFMG - Orientador

Belo Horizonte, 21 de outubro de 2021.

Assinatura dos membros da banca examinadora:



Documento assinado eletronicamente por **Rodrigo Cunha Alvim de Menezes, Usuário Externo**, em 22/10/2021, às 09:54, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Bruno Rezende de Souza, Professor do Magistério Superior**, em 22/10/2021, às 14:33, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Antonio Carlos Pinheiro de Oliveira, Professor do Magistério Superior**, em 05/11/2021, às 11:25, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).

A autenticidade deste documento pode ser conferida no site  
[https://sei.ufmg.br/sei/controlador\\_externo.php?](https://sei.ufmg.br/sei/controlador_externo.php?)



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS  
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FISIOLOGIA E FARMACOLOGIA

### ATA DA DEFESA DA DISSERTAÇÃO N° 545 DE LAILA BLANC ÁRABE

Às **15:00 horas** do dia **21 do mês de outubro de 2021**, transmitida através de webconferência da plataforma Microsoft Teams, realizou-se a sessão pública para a defesa da Dissertação de **Laila Blanc Árabe**. A presidência da sessão coube ao **Prof. Dr. Bruno Rezende de Souza**, orientador. Inicialmente, o presidente fez a apresentação da Comissão Examinadora assim constituída: **Prof. Dr. Antônio Carlos Pinheiro de Oliveira**, ICB/Universidade Federal de Minas Gerais, **Prof. Dr. Rodrigo Cunha Alvim de Menezes**, DECBI/Universidade Federal de Ouro Preto, e **Prof. Dr. Bruno Rezende de Souza**, ICB/Universidade Federal de Minas Gerais, orientador. Em seguida, a candidata fez a apresentação do trabalho que constitui sua **Dissertação de Mestrado**, intitulada: "**Efeitos do Estresse Por Separação Maternal Em Micróglias de Camundongos Machos e Fêmeas**". Seguiu-se a arguição pelos examinadores e logo após, a Comissão reuniu-se, sem a presença da candidata e do público e decidiu considerar **APROVADA** a Dissertação de Mestrado. O resultado final foi comunicado publicamente a candidata pelo presidente da Comissão. Nada mais havendo a tratar, o presidente encerrou a sessão e lavrou a presente ata que, depois de lida, se aprovada, será assinada pela Comissão Examinadora.

Belo Horizonte, 21 de outubro de 2021.

Assinatura dos membros da banca examinadora:



Documento assinado eletronicamente por **Rodrigo Cunha Alvim de Menezes, Usuário Externo**, em 22/10/2021, às 09:54, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Bruno Rezende de Souza, Professor do Magistério Superior**, em 22/10/2021, às 14:33, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Antonio Carlos Pinheiro de Oliveira, Professor do Magistério Superior**, em 05/11/2021, às 11:25, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site [https://sei.ufmg.br/sei/controlador\\_externo.php?acao=documento\\_conferir&id\\_orgao\\_acesso\\_externo=0](https://sei.ufmg.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0), informando o código verificador **1022566** e o código CRC **3C24C87A**.

## AGRADECIMENTOS

Não se vira cientista de um dia para o outro. A curiosidade que mora em mim e guia minhas escolhas foi cultivada desde cedo por meio de livros, histórias, viagens, museus e muito, muito amor e incentivo. Por isso agradeço primeiramente à minha família, por terem sempre me apoiado das mais diversas maneiras a seguir meus sonhos e terem acreditado em todo o meu potencial.

Durante os anos que precederam meu mestrado eu já me tornava cientista e me preparava para mais esse passo. Mas nada poderia me preparar para o que viria: um mestrado na pandemia, regado de medos, incertezas e frustrações. Eu jamais teria conseguido passar por isso sozinha e sou eternamente grata a todos que estiveram ao meu lado e não largaram minha mão, principalmente ao Marco. Diante de tanto caos você foi meu porto seguro, um ponto de alegria em dias ruins e uma certeza de que dias melhores viriam. O apoio psicológico durante meu mestrado também foi crucial para eu chegar até aqui com saúde, então agradeço de coração toda a ajuda da Camilla, minha psicóloga.

Não se vira cientista de um dia para o outro. É preciso muita mentoria, discussão, frustração e palha italiana. Por isso agradeço ao Bruno, meu orientador, por ter me guiado nessa jornada até aqui. Parte de mim levará pra sempre seus ensinamentos, que foram muito além do acadêmico. Com você aprendi que podemos fazer ciência em um ambiente colaborativo e acolhedor, que podemos discordar sem brigar, que fazer ciência é um ato político e que às vezes tudo que precisamos é de um bom vinho com queijo. Sua compreensão e amizade me fizeram ter forças pra continuar em momentos de desesperança. Obrigada por todos os conselhos, palavras amigas e cafés; por mais apoiar minhas ideias loucas – desde a divulgação até esse projeto. Sim, esse projeto só foi possível por causa da sua confiança em mim, que eu conseguiria me adentrar em uma área nova para nós dois.

Não se vira cientista de um dia para o outro, nem sozinha. Esse trabalho tem o dedo da Bruna em todas as etapas, e eu não poderia ser mais feliz em dividi-lo com uma pessoa tão sensacional. Ter te orientado foi uma experiência incrível e tenho muito orgulho da cientista que você mesma se tornou! Obrigada por todas as discussões e por sua companhia e ajuda em experimentos intermináveis. Sua amizade, junto à da Bia, fizeram esses anos muito mais felizes. Cada conquista compartilhada, brincadeiras e reclamações vão ficar guardadas para sempre.

Não se faz ciência de um dia para o outro, nem sozinha. Nesse caminho conheci várias pessoas que me ajudaram e sem as quais esse projeto jamais seria possível. Desde as trocas de conhecimento mais básicas no corredor e em disciplinas até a colaboração formal, esse projeto é fruto de muito aprendizado interpessoal. Meus sinceros

agradecimentos a todos os amigos e colegas do NNC e do NeuroDev, minhas duas casas nesses últimos 6 anos. Ana, Muiara, Flávio e Giovanni, obrigada por todos os conselhos e discussões. André Oliveira, obrigada pela sua interdisciplinaridade e por ter compartilhado suas ideias conosco! Obrigada por todos os ensinamentos e mediações feitas pra que eu pudesse me aventurar em uma área completamente nova. Camila, obrigada por ficar horas e mais horas comigo no microscópio, mesmo na pandemia, pra que eu pudesse ter essas imagens tão lindas que serão apresentadas aqui.

Não se vira cientista de um dia para o outro. Mas uma vez cientista, vou lembrar para sempre o impacto das minhas palavras e usá-las com responsabilidade. Jamais esquecerei os danos causados pelo negacionismo da ciência e egocentrismo durante os anos de 2020 e 2021. Independente do caminho que seguir, prometo nunca abandonar o pensamento crítico e científico que desenvolvi até aqui. Essa dissertação é dedicada aos mais de 600 mil brasileiros que perderam a vida durante a pandemia do Sars-CoV-2.

## RESUMO

O estresse crônico no início da vida é capaz de modificar o comportamento e aspectos funcionais do cérebro a longo prazo. Ele está relacionado a diversos transtornos psiquiátricos, dentre eles a depressão, o transtorno de ansiedade, a esquizofrenia e o abuso de drogas. Algumas alterações neurodesenvolvimentais são observadas antes mesmo da adolescência, quando muito dos pacientes apresentam início de sintomas. Identificar e compreender as modificações morfológicas e moleculares em resposta ao estresse durante janelas desenvolvimentais anteriores à puberdade é imprescindível para o melhor entendimento da patogenia desses transtornos, assim como para a geração de melhores intervenções na psiquiatria infantil. O neurodesenvolvimento depende de um microambiente saudável, com intensa participação de células gliais, como a micróglia. É possível que perturbações endógenas ou ambientais que modificam o funcionamento dessa célula imune no período pós-natal possam influenciar o desenvolvimento dos circuitos neurais, levando à maior susceptibilidade aos transtornos psiquiátricos. Ainda, a inclusão de modelos animais fêmeas nesse tipo de estudo é urgente, uma vez que diferenças entre os sexos são observadas tanto na incidência e sintomatologia de transtornos neurodesenvolvimentais como no funcionamento das micróglia. Nossa hipótese é que o estresse pós-natal modifica a densidade e morfologia de micróglia do hipocampo ventral, no curto e no longo prazo, mas de maneiras diferentes em machos e fêmeas. Para testá-la, camundongos transgênicos CX3CR1 GFP/+ foram submetidos ao estresse por separação materna por 13 dias, e a densidade e morfologia de micróglia foram aferidas nos dias pós-natais 15 e 30 (P15 e P30). Apenas as fêmeas responderam ao estresse por separação materna no que diz respeito a modificações microgliais: à curto prazo (P15) elas apresentaram diminuição da complexidade e tamanho celular em relação às fêmeas controle, apresentando uma morfologia de transição/desramificada, que perdurou até o P30. Interessantemente, tal morfologia é similar à de machos controle P15 e P30. Vimos que a dinâmica desenvolvimental das micróglia entre as idades estudadas é diferente entre os sexos, em que as micróglia de fêmeas tiveram modificações condizentes com uma morfologia de vigília enquanto machos não tiveram modificações morfológicas significantes. Em contrapartida, machos naive apresentaram maior densidade de micróglia no hipocampo no P15. Nosso trabalho aponta as micróglia como células de interesse para estudos de estresse pós-natal, principalmente em fêmeas. Esses resultados reiteram a importância da inclusão de fêmeas no estudo de micróglia e resposta ao estresse no início da vida. Por fim, encorajamos que estudos mais detalhados sejam feitos para elucidar as consequências funcionais dos resultados encontrados.



## ABSTRACT

Early life stress modifies behavior and function aspects of brain in long term. It is related to several psychiatric disorders, such as depression and anxiety disorder, schizophrenia and drug abuse. Symptoms start in adolescence and patients present alterations in the neurodevelopment before this period. It is crucial to unveiling cellular and molecular modifications in response to early life stress in windows of vulnerability prior to adolescence in order to better understand the pathogeny of such disorders – thus, to better psychiatric outcomes. The neurodevelopment relies on a healthy microenvironment, with major participation of glia cells, such as microglia cells. It is possible that endogenous or exogenous disturbance of this immune cells leads to erroneous development of neural circuits and increased susceptibility to stress. Importantly, the inclusion of female animal models is urgent, once sexual dimorphism is observed in the incidence and symptomatology of neurodevelopmental disorders and in microglia function. We hypothesize that post-natal stress modifies the density and morphology of microglia in short and long term, but in a sex-dependent manner. To test this hypothesis, we used a 13-days maternal separation protocol on CXCR1 GFP/+ transgenic mice and inquired microglia density and morphology in ventral hippocampus at post-natal day 15 and 30 (P15 and P30). Only females responded to early life stress. At short term (P15) microglia decreased their complexity and cell size, presenting a transition/de-ramified-like morphology – which persisted at P30. Interesting, this morphology is similar to male microglia morphology in both ages. We also reported sex differences in females in the developmental dynamics between P15 and P30 – in which females presented a surveillant-like microglia morphology at P30, while males did not differ their morphology. On the other hand, males had increased density of microglia in hippocampus at P15. Our work indicates microglia as a cell of interest to studies of early life stress, mainly in females. These results highlight the importance of inclusion of female models on microglia and early life stress studies. Finally, we encourage more detailed studies to unveil the functional consequences of the presented results.

**Palavras-chaves:** Estresse, micróglia, desenvolvimento, dimorfismo sexual.

**Key words:** Stress, microglia, development, sexual dimorphism.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Eixo hipotálamo-pituitária-adrenal.....	14
Figura 2. Papel da micróglia no desenvolvimento do sistema nervoso central.....	21
Figura 3: Desenho experimental.....	26
Figura 4. Fotomicrografias brutas.....	27
Figura 5. Análise de densidade.....	29
Figura 6. Processo de esqueletonização.....	30
Figura 7: Processo de análise fractal.....	32
Figura 8. Diferenças sexuais etológicas na densidade de micróglia.....	35
Figura 9. Diferenças sexuais etológicas nas ramificações de micróglia.....	37
Figura 10. Diferenças sexuais etológicas na morfologia de micróglia.....	38
Figura 11. Resposta da densidade microglial ao estresse por separação maternal.....	40
Figura 12. Modificações na ramificação microglial em resposta ao estresse por separação maternal.....	42
Figura 13. Modificações na morfologia microglial em resposta ao estresse por separação maternal.....	44
Figura 14. Efeito do estresse na infância no dimorfismo sexual etológico em micróglia de camundongos.....	46
Figura 15: Fêmeas SM apresentam morfologia mais próxima de machos que de seus controles Naive.....	47

## **LISTA DE TABELAS**

Tabela 1: Resumo das análises de morfologia.....	33
Tabelas 2-10: Tabelas estatísticas.....	ANEXO 2
ANEXO 1 - Lista de comandos do Image J para análise de imagens.....	58
ANEXO 2- Tabelas estatísticas.....	67

## **LISTA DE ABREVIATURAS**

ACTH - Corticotrofina  
AVP - Arginina vasopressina  
CPF - Córtex pré-frontal  
CRH - Hormônio Liberador de Corticotrofina  
Db - Dimensão de fractal  
GR - Receptor Glicocorticoide  
HPA - Hipotálamo-pituitária-adrenal  
LTP - Potencial de longa duração  
MR - Receptor mineralocorticoide  
P15/P30 - Dia pós-natal 15/ Dia pós-natal 30  
POMC - Pro-opiomelanocortina  
SM - Separação Maternal  
WT - Wild Type

## **SUMÁRIO**

1.	INTRODUÇÃO	
1.1.	A RESPOSTA AO ESTRESSE.....	14

1.2.	ESTRESSE E NEURODESENVOLVIMENTO.....	17
1.3.	A MICRÓGLIA COMO ATOR FUNDAMENTAL DO NEURODESENVOLVIMENTO.....	19
1.4.	MICROGLIA E TRANSTORNOS PSIQUIÁTRICOS.....	21
2.	OBJETIVOS	
2.1.	OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	25
3.	MATERIAL E MÉTODOS	
3.1.	ANIMAIS EXPERIMENTAIS.....	25
3.2.	DESENHO EXPERIMENTAL.....	26
3.3.	MARCAÇÕES MOLECULARES	
3.3.1.	MICRÓGLIAS.....	27
3.3.2.	NÚCLEO CELULAR.....	27
3.4.	AQUISIÇÃO E ANÁLISE DE IMAGENS	
3.4.1.	ANÁLISE DE DENSIDADE .....	28
3.4.2.	ANÁLISE DE RAMIFICAÇÕES.....	29
3.4.3.	ANÁLISE DE FRACTAL.....	31
3.5.	ESTATÍSTICA.....	32
4.	RESULTADOS	
4.1.	A MICRÓGLIA DE CAMUNDONGOS MACHOS E FÊMEAS APRESENTAM CARACTERÍSTICAS ETOLÓGICAS DISTINTAS AO LONGO DO DESENVOLVIMENTO	
4.1.1.	A DENSIDADE DE MICRÓGLIAS HIPOCAMPAIS DIMINUI COM A IDADE APENAS EM CAMUNDONGOS MACHOS.....	33
4.1.2.	A DINÂMICA DESENVOLVIMENTAL DO COMPRIMENTO DAS RAMIFICAÇÕES MICROGLIAIS É SEXUALMENTE DIMÓRFICA...36	
4.1.3.	A DINÂMICA DESENVOLVIMENTAL DO TAMANHO CELULAR DE MICROGLIAIS É SEXUALMENTE DIMÓRFICA.....	37
4.2.	O ESTRESSE POR SEPARAÇÃO MATERNAL IMPACTA A DENSIDADE E MORFOLOGIA DE MICRÓGLIAS À CURTO PRAZO, DE MANEIRA SEXUALMENTE DIMÓRFICA	
4.2.1.	O ESTRESSE NA INFÂNCIA INFLUENCIA A DENSIDADE DE MICRÓGLIAS NO SUBÍCULO DE ANIMAIS P15 DE MANEIRA SEXUALMENTE DIMÓRFICA.....	38
4.2.2.	O ESTRESSE NA INFÂNCIA INFLUENCIA A RAMIFICAÇÃO DE MICRÓGLIAS NO HIPOCAMPO DE MANEIRA SEXUALMENTE DIMÓRFICA .....	41

4.2.3.	O ESTRESSE CRÔNICO NA INFÂNCIA MODIFICA A COMPLEXIDADE E TAMANHO CELULAR DE MICRÓGLIAS HIPOCAMPAIS APENAS EM CAMUNDONGOS FÊMEAS.....	43
4.2.4.	O ESTRESSE NA INFÂNCIA ALTERA DIFERENÇAS SEXUAIS ETOLÓGICAS DE DENSIDADE E MORFOLOGIA DAS MICRÓGLIAS.....	45
4.2.5.	MICRÓGLIAS DE FÊMEAS RESPONDEM À SEPARAÇÃO MATERNAL DE MODO A SE ASSEMELHAR COM A MORFOLOGIA VISTA EM MACHOS.....	47
5.	DISCUSSÃO.....	48
6.	CONCLUSÃO.....	52
7.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	53
	ANEXO 1.....	65
	ANEXO 2.....	67

## 1. INTRODUÇÃO

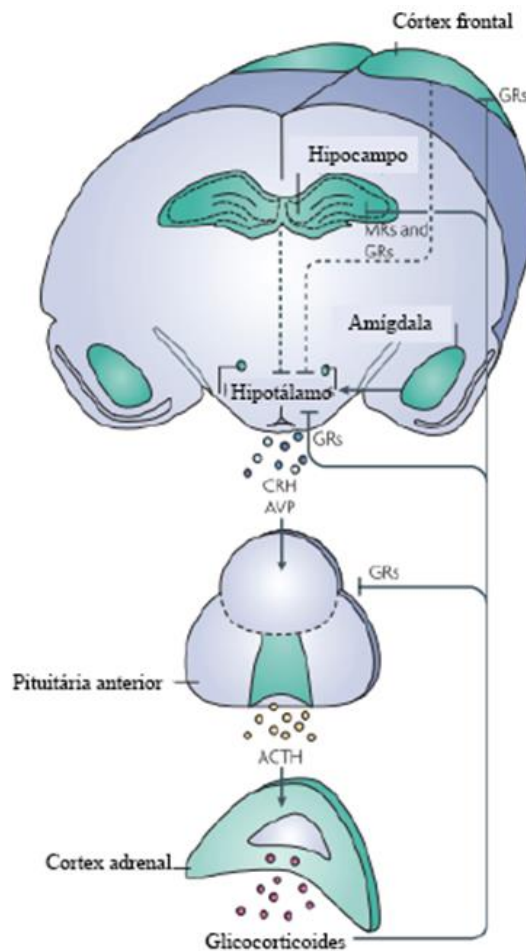
### 1.1. A resposta ao estresse

A busca pelo entendimento das respostas e adaptações físicas e psicológicas ao ambiente remonta a era dos filósofos gregos: Empédocles (495 a.C. - 430 a.C.) já postulava que o equilíbrio dos elementos constituintes da matéria era necessário para a sobrevivência (Chrousos and Gold, 1992). Essa ideia se relaciona com o conceito de homeostase cunhado por Walter Cannon (1871-1945), mais de 2 mil anos depois, que pode ser descrito como a manutenção da estabilidade do meio interno do nosso corpo em resposta às mudanças endógenas e exógenas (Brito and Haddad, 2017). Contudo, foi apenas em 1936 que o endocrinologista Hans Selye (1907- 1982) formulou o conceito de estresse, primeiramente como uma síndrome decorrente de adaptações do organismo frente a eventos estressores (Selye, 1936). Atualmente o conceito de estresse pode ser definido como uma interrupção da homeostase por fatores ambientais, fisiológicos e psicológicos (Chrousos and Gold, 1992). A resposta ao estresse para a manutenção da homeostase se denomina alostase e se dá por mediadores autonômicos, hormonais, metabólicos, imunológicos e comportamentais. A carga alostática é o efeito cumulativo de sucessivas exposições a estressores, assim como a resposta excessiva ou inadequada ao estresse (De Kloet, Joëls and Holsboer, 2005; McEwen *et al.*, 2015).

Os principais efeitos da resposta imediata ao estímulo estressor são: aumento do metabolismo basal, aumento do ritmo respiratório e cardiovascular, inibição da digestão, do crescimento, do sistema reprodutor e do sistema imunológico. Essa resposta se dá pela ativação do sistema nervoso simpático, com a ativação direta de tecidos-alvo pela noradrenalina, ou pelo estímulo da região medular da glândula adrenal, aumentando os níveis sistêmicos de adrenalina (De Kloet, Joëls and Holsboer, 2005). O aumento de noradrenalina no cérebro se dá majoritariamente pela ativação do *locus coeruleus*, que envia projeções para regiões ligadas à resposta ao estresse, como região neocortical, límbica, hipocampo e hipotálamo (Sugama and Kakinuma, 2021). Durante o estresse agudo, a noradrenalina aumenta a atenção e facilita o processamento sensorial, aumentando assim a capacidade de consolidação de memória durante o estímulo estressor (Daviu *et al.*, 2019).

Concomitantemente à ativação simpática, ocorre a estimulação do eixo hipotálamo-pituitária-adrenal (HPA), resultando no aumento dos níveis de glicocorticoides circulantes (figura 1). Neurônios do núcleo paraventricular do hipotálamo secretam o hormônio liberador de corticotrofina (CRH, do inglês *corticotropin-release hormone*) e arginina vasopressina no sistema porta-hipofisário. Esses hormônios ativam a síntese de pro-opiomelanocortina (POMC) na pituitária anterior, que é então clivada em corticotrofina (ACTH, do inglês *adrenocorticotropic hormone*) e outros peptídeos. O ACTH atinge a circulação e estimula o córtex adrenal a secretar

glicocorticoides – cortisol em humanos e corticosterona em roedores (De Kloet, Joëls and Holsboer, 2005). O eixo HPA apresenta uma via de feedback negativo, em que glicocorticoides controlam sua própria liberação por inibição do eixo via glândula adrenal, hipotálamo e hipocampo ventral (Jacobson and Sapolsky, 1991; Herman *et al.*, 2005). Outras regiões límbicas também participam do controle desse eixo, como o córtex pré-frontal medial (CPFm), que pode tanto inibi-lo quanto ativá-lo (Diorio, Viau and Meaney, 1993; Sullivan and Gratton, 1999); e a amígdala, que exerce um papel majoritariamente de ativação do eixo, aumentando os níveis de glicocorticoides circulantes (Feldman and Weidenfeld, 1998; Herman *et al.*, 2005).



**Figura 1. Eixo hipotálamo-pituitária-adrenal.** Em resposta a um evento estressor, neurônios do hipotálamo liberam os hormônios CRH e AVP, que estimulam corticotrofos da pituitária anterior (ou adenohipófise) a liberar ACTH. O ACTH cai na corrente sanguínea e 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. Além do feedback negativo, o controle do eixo HPA também é feito pelo hipocampo, o córtex pré-frontal e a amígdala. CRH. Hormônio liberador de corticotrofina; AVP. Arginina vasopressina; ACTH. Corticotrofina; GR. Receptor glicocorticoide; MR Receptor mineralocorticoide (adaptado de LUPIEN *et al.*, 2009).



O cortisol/corticosterona é um dos principais hormônios reguladores do estresse e atua por meio de dois receptores: os receptores de glicocorticoides (GR) e mineralocorticoides (MR), sendo que o primeiro apresenta uma afinidade 10 vezes menor que o segundo. Os MR atuam majoritariamente em condições fisiológicas/homeostáticas, como na variação circadiana (Russell and Lightman, 2019), assim como na resposta inicial ao estresse (De Kloet, Joëls and Holsboer, 2005; Karst *et al.*, 2005). Quando o cortisol atinge altas concentrações, ele passa a ativar também os GR. Glicocorticoides podem regular cascatas intracelulares, metabolismo celular e liberação de neurotransmissores excitatórios e inibitórios por meio de sua translocação para mitocôndrias ou interação com o sistema endocanabinoide (McEwen *et al.*, 2015). O mecanismo de regulação mais bem conhecido é a regulação epigenética, que se dá pela interação do complexo glicocorticoide-receptor com fatores de transcrição ou pela sua ligação direta em regiões específicas do DNA, conhecidas como “Elementos de Resposta de Glicocorticoide”. Essa complexa interação facilita a adaptação a próximos eventos estressores, assim como o controle do próprio eixo HPA por meio da inibição de peptídeos como o CRH e mudança no perfil de receptores das regiões envolvidas no feedback negativo (De Bosscher, Vanden Berghe and Haegeman, 2003; De Kloet, Joëls and Holsboer, 2005).

O estresse crônico gera a desregulação do feedback negativo do eixo HPA: ratos e camundongos submetidos a estresse crônico apresentam resposta exagerada do eixo, com aumento de corticosterona e CRH (Figueiredo *et al.*, 2003; Hu *et al.*, 2020). Esse efeito também pode ser visto em humanos: pacientes com depressão apresentam hipercortisolemia, hipersensibilidade da glândula adrenal e outras mal adaptações do eixo HPA (Parker, Schatzberg and Lyons, 2003; Nikkheslat *et al.*, 2020), enquanto pacientes com transtorno pós traumático tendem a apresentar o nível de cortisol sistêmico diminuído (Pan *et al.*, 2018). A carga alostática gerada pelo estresse crônico também causa modificações nas estruturas que participam do feedback negativo, majoritariamente por efeitos epigenéticos (Gray *et al.*, 2014). Há diminuição de potencial de longa duração (LTP) no hipocampo e CPF (Alfarez, Joëls and Krugers, 2003) e atrofia de dendritos na região CA3 do hipocampo (Magariños and McEwen, 1995). Há diminuição da proliferação e apoptose celular no hipocampo de ratos machos após o estresse crônico, que é parcialmente recuperada a longo prazo (Heine *et al.*, 2004). Em contradição ao estresse agudo, que aumenta os níveis de monoaminas no cérebro (De Kloet, Joëls and Holsboer, 2005), o estresse crônico diminui a concentração de dopamina no hipotálamo, córtex frontal e hipocampo; e diminui o turnover de serotonina no hipocampo de roedores machos (Bowman, Beck and Luine, 2003; Gamaro *et al.*, 2003; Favoretto *et al.*, 2020).

É evidente que a resposta ao estresse exige a interação de diversos sistemas e é capaz de gerar modificações duradouras, nem sempre adaptativas. Dessa maneira, é importante que seus mecanismos sejam elucidados não apenas no cérebro adulto, já maduro, mas também em outras fases do desenvolvimento.

## 1.2. Estresse e neurodesenvolvimento

Neurodesenvolvimento refere-se à formação e maturação do sistema nervoso que vai do período embrionário até o início da vida adulta. Durante esse período, diversos processos são influenciados pelo ambiente externo. Um exemplo é o sistema visual, em que o fechamento de um dos olhos em um período específico do desenvolvimento leva à *inputs* mais fortes no córtex visual ipsilateral (Huang, 2019). Essa influência não é vista apenas no sistema sensorial: a exposição viral materna de camundongos prenhes modifica mais intensamente parâmetros neuroanatômicos quando feita no início da gestação comparada à exposição tardia. O perfil comportamental e de transcrição gênica também é modificado de maneira idade-dependente (Guma *et al.*, 2021). Durante o desenvolvimento pós-natal, diferentes protocolos de estresse em janelas desenvolvimentais variadas levam a diferentes perfis de resiliência ou susceptibilidade a um segundo estresse na fase adulta em camundongos machos (Peña, Nestler and Bagot, 2019). Mesmo alterações curtas na neurotransmissão monoaminérgica já são capazes de modificar parâmetros moleculares e comportamentais a longo prazo. Tanto o aumento quanto a diminuição de dopamina na fase embrionária modificam o número de neurônios GABAérgicos e o comportamento de peixes zebra (*Danio Rerio*) (Souza, Romano-Silva and Tropepe, 2011). Já a hiperativação transiente de receptores dopaminérgicos nos primeiros 5 dias pós-natal em camundongos é capaz de induzir comportamento tipo ansioso em fêmeas adultas e comportamento tipo depressivo em machos jovens (DE MATOS *et al.*, 2018; MATOS *et al.*, 2020; Moraes *et al.*, em preparação). Eventos que acontecem na vida uterina, infância e adolescência podem influenciar o desenvolvimento do cérebro em diferentes níveis, tendo consequências duradouras.

Diversos transtornos psiquiátricos apresentam uma hipótese desenvolvimental. Estudos epidemiológicos apontam o estresse crônico ou eventos traumáticos no início da vida como fator de risco para o desenvolvimento de transtornos depressivos, de ansiedade, esquizofrenia, transtorno do uso de substância, dentre outros (Jaaro-Peled *et al.*, 2009; Kessler *et al.*, 2010; Reiser *et al.*, 2014). No caso da depressão, esse risco chega a ser 4 vezes maior para adultos que passaram por sucessivos eventos adversos na infância (Felitti *et al.*, 2019). Na adolescência, época em que naturalmente ocorre um pico de diagnósticos (Rohde *et al.*, 2013), o risco é

aumentado em cerca de 2,5 vezes, sendo esse efeito mais pronunciado em jovens mulheres (Gallo *et al.*, 2017; Lemoult *et al.*, 2019).

Estudos com humanos apontam que o estresse crônico na infância causa alterações cerebrais anatômicas e cognitivas. Eventos traumáticos e abusos na infância diminuem o volume do hipocampo e aumentam o volume do CPF em adultos (Hart, Rubia and Angiulli, 2012; Riem *et al.*, 2015; Nikkheslat *et al.*, 2020). Alterações volumétricas e cognitivas podem ser vistas ainda na infância e adolescência: crianças vítimas de maus tratos e abandono apresentam déficits de memória, atenção e no processamento de emoções. O volume cerebral é menor nessas crianças, e foi visto tanto aumento como diminuição do volume do CPF e amígdala de crianças e adolescentes que passaram por situações traumáticas na infância (Hart, Rubia and Angiulli, 2012). A diminuição do volume e atividade hipocampal começa a ser evidente no final da infância e início da adolescência (Carrion, Weems and Reiss, 2007; Carrión *et al.*, 2010).

Durante o início da vida, o eixo HPA encontra-se em um período chamado de “período hiporresponsivo ao estresse”, uma fase de hiperresponsividade que confere proteção contra a estimulação excessiva por glicocorticoide (Sapolsky and Meaney, 1986; Levine, 1994). Em roedores esse período vai do segundo ao décimo quarto dia pós-natal (P2-P14) e ele está presente nos primeiros anos de vida em humanos (Gunnar and Cheatham, 2003; Lupien *et al.*, 2009). O cuidado materno em roedores - contato físico, amamentação e lambida da região urogenital – estimula essa diminuição da atividade do eixo HPA. Ao separar os filhotes da mãe, esse período pode ser interrompido, sendo evidenciada uma potente resposta e desregulação do eixo HPA (Plotsky and Meaney, 1993; Levine, 1994). É possível que a atividade aumentada do eixo em uma fase desenvolvimental em que ela “deveria” estar reduzida interfira com outros aspectos do neurodesenvolvimento, contribuindo para maior susceptibilidade do indivíduo à estresses futuros.

A separação maternal é um modelo eficaz para o estudo de estresse crônico ou traumas no início da vida. Em 1993, Plotsky e Meaney viram que os ratos machos separados da mãe por períodos longos (180min) apresentaram aumento de CRH no hipotálamo (Plotsky and Meaney, 1993). Posteriormente, foi visto que após a separação maternal os filhotes de ratos e camundongos apresentam resposta exagerada do eixo HPA a um novo estressor, o que perdura até a idade adulta (Kuhn and Schanberg, 1998; Aisa *et al.*, 2007; Nishi, Horii-Hayashi and Sasagawa, 2014).

O protocolo de separação maternal também leva a modificações comportamentais na fase adulta. Devido às variações usadas em diferentes protocolos de separação maternal em camundongos, tais modificações são diversas. Uma meta-análise feita por Tractenberg e colaboradores (2016) evidenciou que as consequências comportamentais mais consistentes em

camundongos são o aumento do comportamento tipo depressivo e déficit de memória, seguido do aumento do comportamento tipo ansioso dos animais (Tractenberg *et al.*, 2016). Tanto o comportamento do tipo ansioso quanto depressivo já podem ser observados em camundongos jovens (Shin *et al.*, 2016; He *et al.*, 2020). Em contrapartida, o déficit de memória é menos observado nessa fase desenvolvimental (Reis *et al.*, em preparação; SHIN *et al.*, 2016).

A inclusão de modelos animais fêmeas é de extrema importância para o entendimento da vulnerabilidade aos transtornos relacionados ao estresse, uma vez que o estresse no início da vida também apresenta viés de sexo. Ratos machos submetidos ao protocolo de estresse apresentam déficit de atenção no início da adolescência, enquanto fêmeas apresentam melhoras cognitivas nos testes utilizados (Frankola *et al.*, 2010). Camundongos machos são mais responsivos ao protocolo de separação maternal, porém há uma falta de estudos incluindo fêmeas para avaliação mais profunda (Tractenberg *et al.*, 2016; He *et al.*, 2020). Estudos prévios do nosso laboratório mostraram que apenas machos jovens apresentam aumento de comportamento tipo ansioso e depressivo em resposta ao estresse na infância (Reis *et al.*, em preparação, Menezes *et al.*, em preparação). Interessantemente, há evidências de que na fase adulta esse fenótipo pode se inverter (Bondar, Lepeshko and Reshetnikov, 2018).

Análises morfológicas de roedores que passaram pela separação maternal também corroboram com achados clínicos de pacientes que passaram pelo estresse na infância, como diminuição do volume hipocampal (Aksić *et al.*, 2013). Essa diminuição pode estar ligada com a perda celular ou com a diminuição do comprimento dendrítico e número de espinhas dendríticas vista no hipocampo (Fabricius, Wörtwein and Pakkenberg, 2008; Monroy, Hernández-Torres and Flores, 2010). A separação maternal também leva à diminuição de LTP em CA3 e modificações dendríticas no CPF e núcleo acumbens de ratos (Monroy, Hernández-Torres and Flores, 2010; Shin *et al.*, 2016). Mesmo sem a presença de um fenótipo comportamental claro, modificações decorrentes do estresse na infância são observadas, como a modificação de micróglia em camundongos adultos (Han *et al.*, 2019).

Visto a extensão das modificações decorrentes do estresse na infância, torna-se imprescindível a compreensão dos mecanismos celulares e moleculares envolvidos na resposta ao estresse pós-natal - principalmente daqueles que foram por muito tempo desconhecidos ou pouco explorados, como o papel das células gliais nesse processo.

### **1.3. A micróglia como ator fundamental do neurodesenvolvimento**

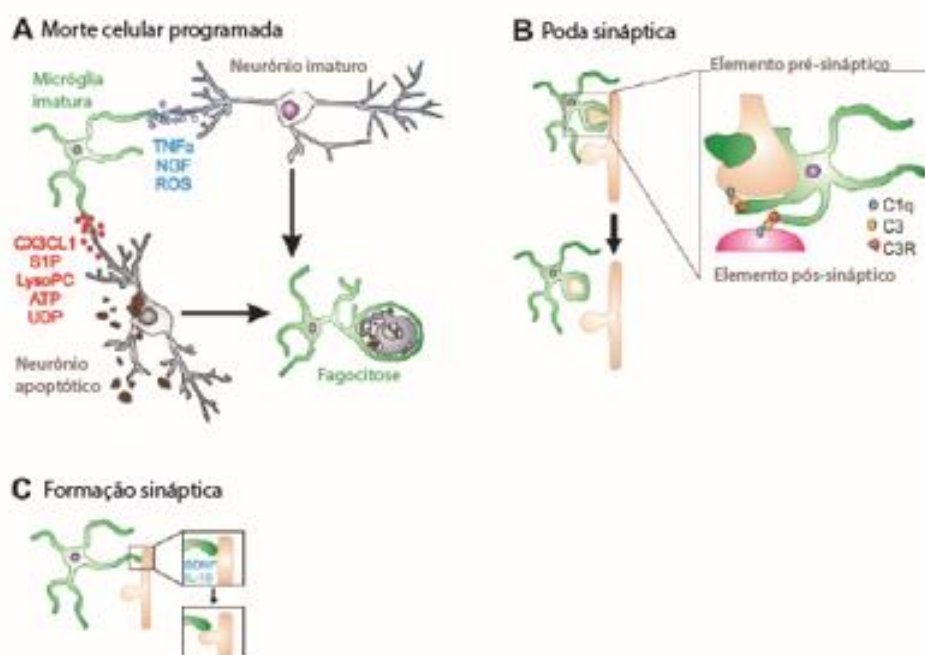
As micróglia são células do sistema imune residentes do cérebro. Ao contrário do que se pensava inicialmente, essas células não são derivadas de monócitos circulantes, tendo expressão proteica e marcadores celulares próprios (Butovsky *et al.*, 2014). Elas começam a diferenciação

ainda no saco vitelino e infiltram o cérebro no período embrionário – por volta da semana embrionária 4,5 e 5 em humanos e dos dias embrionários 8-10 em roedores (Ginhoux *et al.*, 2010; Mosser *et al.*, 2017).

As micróglias ganharam grande interesse por sua resposta inflamatória e sua participação em doenças neurodegenerativas, como na doença de Parkinson e Alzheimer (Yoon Seong and Tong H., 2006; Krasemann *et al.*, 2017). Ela também é essencial para o neurodesenvolvimento (figura 2). Durante o desenvolvimento pós-natal, células nervosas passam por um processo chamado de morte celular programada, em que grande parte dos neurônios sofre apoptose. As micróglias respondem a esse processo fagocitando células em processo de apoptose ou fragmentos celulares, e podem participar ativamente induzindo a morte celular através de mediadores solúveis ou contatos diretos (Ferrer *et al.*, 1990; Sierra *et al.*, 2010; Bilimoria and Stevens, 2015). Elas também estão envolvidas no controle da sobrevivência neuronal e proliferação de células precursoras (Antony *et al.*, 2011; Ueno *et al.*, 2013).

As micróglias apresentam um papel crucial na maturação sináptica dos neurônios. Sua atividade mais bem descrita é a participação na poda sináptica, fenômeno que ocorre no desenvolvimento pós-natal e é responsável pela eliminação de sinapses tanto de maneira espontânea quanto dirigida por experiência. Micróglias engolfam *inputs* pré-sinápticos das células ganglionares da retina no pico da poda sináptica (Schafer *et al.*, 2012), e estão envolvidas na poda sináptica do hipocampo de camundongos nas primeiras semanas pós-natais. A poda sináptica deficiente decorrente da deleção da proteína CX3CR1, majoritária de micróglias no sistema nervoso central, gera excesso de espinhas dendríticas e atraso da maturação de sinapses nessa região (Paolicelli *et al.*, 2011). As micróglias também participam do refinamento de circuitos neurais. Tremblay e colaboradores (2010) demonstraram que micróglias presentes no córtex visual contactam terminais sinápticos, fenda sináptica e espinhas dendríticas, principalmente as menores – as quais somem posteriormente ao contato (Tremblay, Lowery and Majewska, 2010). Lim e colaboradores viram que micróglias são capazes de promover sinapses em culturas de células hipocámpais (Lim *et al.*, 2013).

Desse modo, perturbações endógenas ou ambientais que modificam o funcionamento de micróglias no período pós-natal podem influenciar o desenvolvimento dos circuitos neurais, fazendo dessa célula um importante alvo de pesquisas no campo de transtornos neurodesenvolvimentais.



**Figura 2. Papel da micróglia no desenvolvimento do sistema nervoso central.** A. Ilustração da participação de micróglia na morte celular programada de neurônios imaturos e em apoptose, por meio de mediadores químicos, e fagocita corpos apoptóticos. B. Processo de poda sináptica pela micróglia. Ela reconhece elementos pré-sinápticos por meio do sistema complemento e engloba botões sinápticos, eliminando-os. C. Participação da micróglia na formação sináptica por mediadores químicos. Adaptado de Mosser et al. 2017

#### 1.4. Micróglia e transtornos neuropsiquiátricos

Na última década, as publicações que investigam o papel da micróglia em transtornos psiquiátricos cresceram cerca de 5 vezes (PubMed), ao passo que as evidências dessa relação se acumulam. Estudos com pacientes dentro do espectro autista mostraram que há aumento de densidade de micróglia em diferentes regiões corticais, além de modificações morfológicas compatíveis com uma maior ativação (Koyama and Ikegaya, 2015). Pacientes esquizofrênicos ou em grande risco para psicose também apresentam aumento de atividade dessas células. Interessantemente, a minociclina, um antibiótico capaz de inibir a ativação microglial, é capaz de atenuar sintomas negativos da esquizofrenia e promover neuroproteção em modelos animais adultos (Inta *et al.*, 2017). Pacientes com depressão apresentam aumento de micróglia sensibilizadas – ou *primed* - no córtex cingulado anterior (Torres-Platas *et al.*, 2014; Yirmiya, Rimmerman and Reshef, 2015). Estudos genéticos apontam genes presentes em micróglia como fator de risco para depressão e transtorno bipolar, como o gene P2RX7 (Barden *et al.*, 2006; Lucae *et al.*, 2006; Frost and Schafer, 2016). O transplante de micróglia de animais controle

melhora o *grooming* do camundongo mutante para Hoxb8, usado como modelo de desordem obsessiva compulsiva (Chen *et al.*, 2010).

A infecção materna no período pré-natal também está envolvida com o aumento do risco para o desenvolvimento de esquizofrenia e transtorno do espectro autista (Shi *et al.*, 2003; Atladóttir *et al.*, 2010; Brown, 2012; Knuesel *et al.*, 2014). Modelos animais de infecção materna são úteis para estabelecer uma relação causal entre esses achados epidemiológicos. Nesses modelos, fêmeas prenhes passam por um desafio imune através da exposição viral ou à fragmentos de bactérias (Paolicelli and Ferretti, 2017). A ativação imune sistêmica causada pela infecção é seguida pela ativação imune mediada por micróglia no cérebro. Tal ativação no sistema nervoso central também foi relatada nos filhotes, tanto no período do desafio imune quanto posteriormente: a prole adulta apresenta comportamento tipo ansioso, déficits cognitivos e diminuição do comportamento social, além de modificações em receptores NMDA (Hava *et al.*, 2006; Kirsten *et al.*, 2010; Paolicelli and Ferretti, 2017). O desafio imune materno também promove o *priming* de micróglia hipocámpica na prole, deixando-as mais reativas a um segundo estressor na idade adulta (Forrest *et al.*, 2012; Giovanoli *et al.*, 2016).

Outros estímulos ambientais também podem influenciar a resposta inflamatória sistêmica e cerebral, como o estresse. De fato, micróglia são capazes de responder diretamente ao estresse, uma vez que apresentam receptores para glicocorticoides e noradrenalina. A ativação da micróglia por agonistas adrenérgicos diminui a produção de citocinas inflamatórias, como IL-6 e TNF $\alpha$ , e suprime a sua proliferação (Pocock and Kettenmann, 2007). Níveis elevados de glicocorticoides também inibem a ativação pró-inflamatória da micróglia no hipocampo e hipotálamo e são importantes para o processo de *priming* da micróglia após um estresse agudo em ratos adultos (Ros-Bernal *et al.*, 2011; Frank *et al.*, 2012; Sugama *et al.*, 2013; Johnson and Kaffman, 2018). As micróglia também participam do controle da ativação do núcleo paraventricular do hipotálamo e dos níveis de ACTH e corticosterona circulantes em resposta ao estresse agudo (Winkler *et al.*, 2017). Já o estresse crônico imprevisível em roedores adultos machos está ligado ao aumento de densidade e modificações da morfologia de micróglia em diversas regiões, dentre elas hipocampo e CPF, além de aumento do comportamento tipo depressivo (Tynan *et al.*, 2010; Delpech *et al.*, 2015; Piirainen *et al.*, 2021).

Diferentes modelos de estresse perinatal modificam a atividade microglial de maneira aguda ou duradoura, ou seja, mesmo após a ausência do estressor. Por exemplo, camundongos adultos filhos de mães estressadas na gravidez apresentam alterações microgliais no hipocampo, como aumento de densidade, soma mais alargado, aumento de expressão de citocinas inflamatórias e resposta exacerbada a um desafio imunológico com LPS (Diz-Chaves *et al.*, 2012,

2013). Dessa forma, é possível que micróglia sejam uma peça-chave em transtornos decorrentes da exposição ao estresse.

O estresse pós-natal leva ao comportamento tipo depressivo em ratos e camundongos adultos concomitantemente com modificações nas células microgliais. A separação materna diminui a densidade e provoca atrofia de micróglia no giro dentado do hipocampo de ratos machos e fêmeas adultos (Gong *et al.*, 2018). Tal redução está ligada ao processo de apoptose microglial, induzido pela sua própria ativação. A inibição da micróglia nos primeiros dias de separação materna impede a perda de micróglia no hipocampo e o aparecimento do fenótipo tipo depressivo. Em contrapartida, foi observado aumento do número de micróglia no hipocampo total e na região CA3 em machos adultos estressados na infância (Banqueri *et al.*, 2019; Zhou *et al.*, 2020). A separação materna também aumenta o número de processos de células microgliais e sua mobilidade no córtex somatossensorial; e a atividade pró-inflamatória no estriado, núcleo acumbens e hipocampo dorsal de ratos e camundongos machos adultos (Takatsuru *et al.*, 2015; Banqueri *et al.*, 2019). É interessante investigar quais as consequências da micróglia também no hipocampo ventral, uma vez que essa região está mais relacionada ao controle emocional e do feedback negativo do eixo HPA, além de estar desregulada em transtornos psiquiátricos relacionados ao estresse crônico (Herman *et al.*, 2005).

As consequências do estresse no início da vida nas micróglia podem ser diferentes dependendo da janela desenvolvimental investigada. Logo após a separação materna, há aumento de densidade e ativação microglial em camundongos e ratos machos, com aumento da expressão de citosinas pró-inflamatórias no hipocampo e CPF (Delpech *et al.*, 2016; Roque, Ochoa-Zarzosa and Torner, 2016; Giridharan *et al.*, 2019). O aumento do comportamento tipo ansioso e tipo depressivo concomitante às modificações microgliais já pode ser visto na adolescência em camundongos machos e pode ser revertido com minociclina (Gracia-Rubio *et al.*, 2016; Han *et al.*, 2019). Durante a fase inicial (P28) e final (P56) da adolescência de camundongos machos foi vista alteração da transcrição gênica de imunorreguladores e da atividade fagocitária em micróglia, além do aumento da expressão de IBA 1 (marcador de micróglia) e diminuição de ramificações e tamanho dos processos dessas células no hipocampo, mas sem a alteração de densidade nos animais estressados (Delpech *et al.*, 2016; Gracia-Rubio *et al.*, 2016; Han *et al.*, 2019). Elucidar alterações microgliais em fases desenvolvimentais distintas é importante para compreendermos suas consequências em diferentes janelas de susceptibilidade. Enquanto o início da vida é marcado pela sinaptogênese, poda sináptica e organização funcional de circuitos neurais, a adolescência é marcada pela segunda onda de poda sináptica e remodelação desses circuitos.



O dimorfismo sexual também foi relatado em micróglia, mas as diferenças encontradas ainda são difusas e pouco estudadas (Kodama and Gan, 2019). A quantidade de micróglia no hipocampo de ratos na primeira semana de vida é diferente entre os sexos, mas esse número já foi descrito sendo maior tanto em machos quanto em fêmeas. Ainda na primeira semana, micróglia de ratas apresentam maior atividade fagocitária no hipocampo e diferem na expressão de quimiocinas (Schwarz, Sholar and Bilbo, 2012; Nelson, Warden and Lenz, 2017a). Já a densidade dessas células em camundongos é maior em machos no P21 e no P91 (Gunevkaya *et al.*, 2018). Diferenças expressivas no transcriptoma de micróglia de machos e fêmeas são mais evidentes na idade adulta, mas não há conclusão se essa diferença confere atividade mais inflamatória ou protetiva para algum dos sexos (Gunevkaya *et al.*, 2018; Kodama and Gan, 2019).

O dimorfismo sexual se reflete na resposta ao estresse no início da vida. Machos e fêmeas adolescentes e adultas que passaram pelo estresse por separação maternal apresentam comportamento tipo depressivo, mas apenas fêmeas adultas apresentam comportamento tipo ansioso. Tais comportamentos são acompanhados de aumento de IBA-1 apenas no PFC e hipocampo de fêmeas, mas aumentam a morfologia responsiva de micróglia em ambos os sexos (Gracia-Rubio *et al.*, 2016; Saavedra *et al.*, 2021). Ainda, o estresse na infância levou à maior resposta de medo em fêmeas adolescentes, corpos celulares maiores no CPF de fêmeas e redução de células gliais na substância negra e núcleo acumbens apenas de machos (Chocyk *et al.*, 2011; Gildawie *et al.*, 2020a; Zetter *et al.*, 2021). Entender a dinâmica desenvolvimental de micróglia também em fêmeas se torna interessante, assim como caracterizar como essas diferenças intrínsecas podem levar a respostas ao estresse distintas nas micróglia desses animais.

A maioria dos trabalhos explora as consequências do estresse infantil na vida adulta de animais machos, deixando uma lacuna no nosso conhecimento referente à resposta neuroimune e glial em estágios desenvolvimentais anteriores e em fêmeas. Preencher essa lacuna é essencial para desvendarmos a patogenia de transtornos neuropsiquiátricos relacionados ao estresse.

Nesse trabalho investigamos as consequências do estresse pós-natal na micróglia do hipocampo ventral de camundongos machos e fêmeas em duas importantes janelas desenvolvimentais - P15 e P30 -, reunindo em um único estudo as duas variáveis: período desenvolvimental e sexo. Nossa hipótese é a de que o estresse pós-natal modifica a densidade e morfologia de micróglia tanto no curto e no longo prazo, mas de maneiras diferentes em machos e fêmeas.

## 2. OBJETIVO

O objetivo deste trabalho foi investigar se o estresse pós-natal é capaz de modificar a densidade e morfologia de micróglias hipocampais de camundongos machos e fêmeas.

### 2.1. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Investigar diferenças etológicas entre os sexos na densidade e morfologia de micróglias em duas janelas desenvolvimentais distintas;
- Investigar se o protocolo de separação maternal é capaz de modificar a densidade e morfologia de micróglias hipocampais após o período de estresse;
- Investigar se o protocolo de separação maternal é capaz de modificar a densidade e morfologia de micróglias hipocampais no período do início da adolescência;
- Investigar se a densidade e morfologia de micróglias de machos e fêmeas é diferente em resposta ao estresse.

## 3. MATERIAL E MÉTODOS

### 3.1. Animais Experimentais

Camundongos fêmeas C57/BL6 wild type (WT) e machos da linhagem C57/BL6 CX3CR1:GFP+/+, com 12 a 24 semanas, foram utilizados como matrizes. Os animais foram mantidos em temperatura ambiente de  $22 \pm 1^\circ\text{C}$  e umidade 40-70%, em ciclo claro-escuro de 12/12 horas, com livre acesso à ração e água. Todos os experimentos foram feitos sob aprovação prévio do CEUA, protocolo n°260/2019.

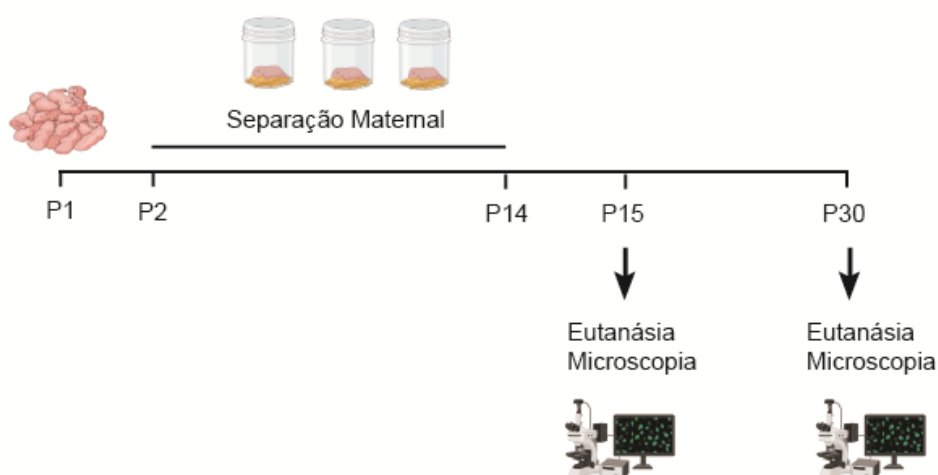
Os cruzamentos foram realizados na proporção de 2 fêmeas para 1 macho durante um período de 7 a 10 dias. Após esse período, as fêmeas foram separadas dos machos, sendo mantidas em caixas com 2 a 4 animais. No provável 19º dia de gestação as fêmeas foram transferidas para caixas individuais e acompanhadas até o dia de nascimento dos filhotes (P1). Todos os animais utilizados apresentaram genótipo heterozigoto (CX3CR1:GFP+/-), decorrente do cruzamento de animais homozigotos.

As ninhadas foram padronizadas contendo entre 5 a 8 filhotes, que foram mantidos com as respectivas mães até o 23º dia pós-natal (P23). No P23 as ninhadas foram separadas de acordo com o sexo e mantidas em caixas com 2 a 4 animais, nas condições descritas anteriormente.

### 3.2. Desenho experimental

As ninhadas foram divididas em dois grupos experimentais: um que não passou por nenhum tipo de estresse, sendo considerado o controle, denominado naive; e o grupo que passou pelo estresse de separação maternal (SM). As idades de 15 e 30 dias (P15 e P30) foram investigadas para o estudo dos efeitos SM um dia após o fim do protocolo (curto prazo) e duas semanas após o fim do protocolo (longo prazo) (figura 3).

O protocolo de estresse por separação maternal consistiu em separar os filhotes de sua mãe por 3 horas, durante 13 dias (P2-P14), em horários randomizados entre 8h-17h (ciclo claro). Durante o protocolo, os animais foram mantidos isolados em potes individuais, com maravalha limpa, aquecidos em banho maria à temperatura de 32°C +- 2°C.



**Figura 3: Desenho experimental.** Os animais passam pela separação maternal entre o P2 e P14. A eutanásia dos animais foi feita no P15 ou P30. Imagens: Biorender

A eutanásia ocorreu na parte da tarde para todos os animais. Os animais foram anestesiados com uma combinação de xilazina (10mg/Kg), cetamina (100mg/Kg) e salina por via intraperitoneal. Na indicação de perda total da sensibilidade, foi realizada perfusão cardíaca com 5ml de tampão fosfato salina [PBS: 0,1 M (0,387M NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>.H<sub>2</sub>O, 0,612 M Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O, 1,4 M NaCl); pH=7,4;] e 5ml de paraformaldeído 4% diluído em PBS para os animais P15 e 10ml para os animais P30. Os cérebros foram armazenados em PFA 4% por 3 horas e então transferidos para solução de sacarose 30%.

Os cérebros foram fatiados em criostato à -21°C, numa espessura de 60µm. As fatias que continham o hipocampo ventral foram armazenadas em solução crioprotetora (sacarose 30% m/v,

polivinilpirrolidona PVP 1% m/v, PBS 10% e etileno glicol 30% v/v), à -20°C, até a aquisição de imagens.

### 3.3. Marcações celulares

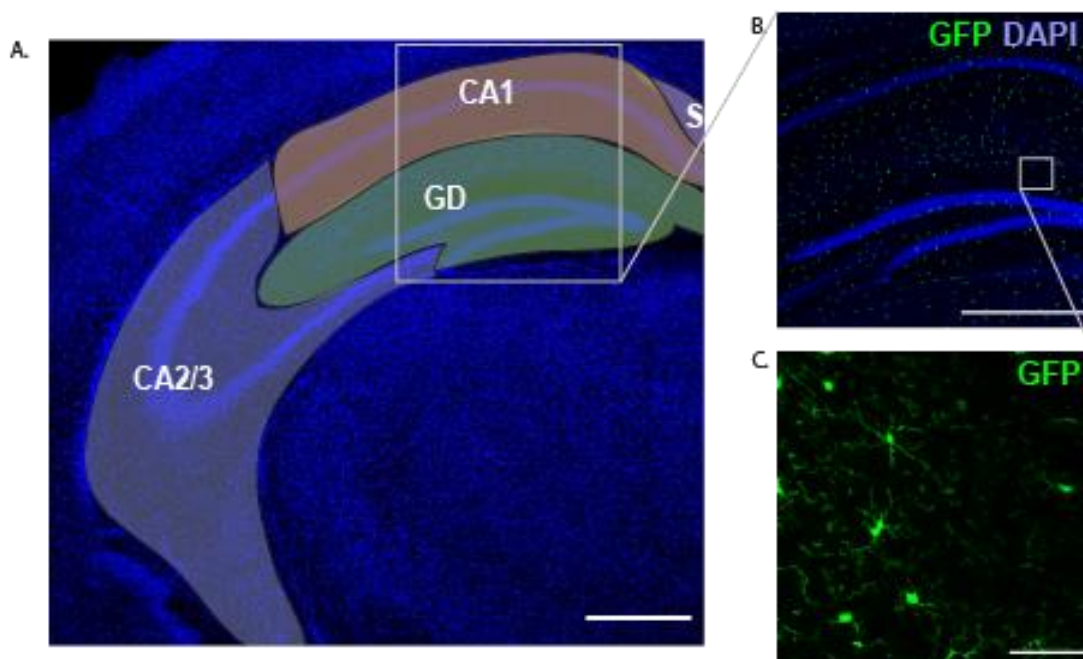
#### 3.3.1. Micróglias

O animal C57BL/6 CX3CR1:GFP +/- tem um locus do gene codificador do receptor CX3CR1 trocado por um gene para expressão de EGFP (Jung *et al.*, 2000). Esse receptor é expresso majoritariamente em micróglias no sistema nervoso (Wolf *et al.*, 2013), dessa maneira não foi preciso nenhuma marcação extra para esse tipo celular.

Esse modelo é amplamente usado nas pesquisas envolvendo micróglias e a função deste receptor, por permitir seu estudo *in vivo* e pela especificidade celular. O uso do animal heterozigoto é um excelente controle, pois não há diferença fenotípica significativa deste em comparação ao WT (Jung *et al.*, 2000; Wolf *et al.*, 2013), inclusive em testes comportamentais (Reshef *et al.*, 2014).

#### 3.3.2. Núcleo celular

Os núcleos celulares foram marcados com DAPI (1:10000 $\mu$ l) para permitir a posterior divisão das sub-regiões hipocampais, como ilustrado na figura 4A. As fatias ficaram imersas em 300 $\mu$ l de solução com DAPI por 10 minutos e em seguida lavadas com PBS 0,1M por 5 minutos.



**Figura 4. Fotomicrografias brutas.** (A.) Desenho ilustrativo das sub-regiões do hipocampo ventral em fotomicrografia corada com DAPI, 4x. Escala: 500 $\mu$ m (B.) Imagem representativa do giro denteado no

aumento de 10x. Escala:500 $\mu$ m (C.) Imagem representativa da reconstrução de 6 “stacks” em aumento de 60x. Escala: 50 $\mu$ m; S: Subículo, GD: Giro denteado.

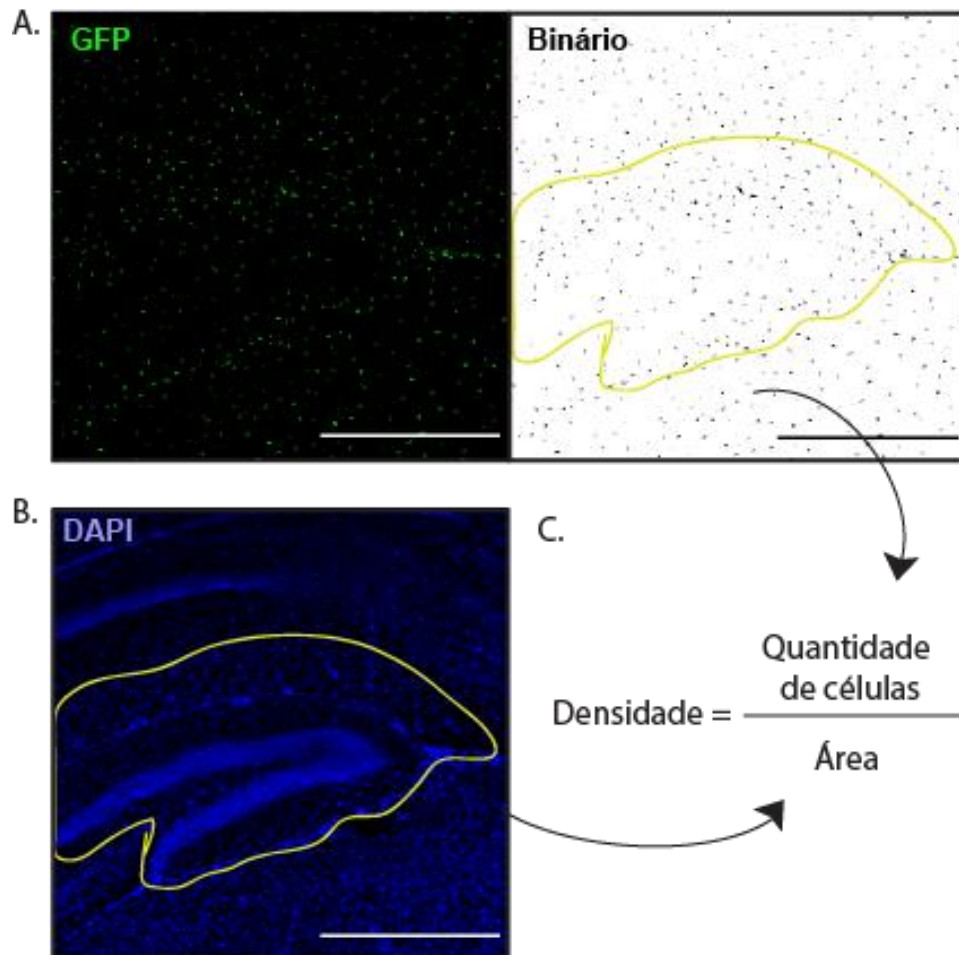
### **3.4. Aquisição e Análise de Imagens**

A aquisição das imagens foi feita com microscopia confocal, utilizando microscópio Nikon Eclipse Ti, em colaboração com o laboratório *Center of Gastrointestinal Biology* (ICB-UFMG). A região de interesse foi o hipocampo ventral e foram feitas imagens de fatias entre o bregma - 2,70mm e -2,80mm referentes ao mapeamento de Paxinus e Franklin, 2001. Fizemos fotomicrografias em menor aumento (objetiva de 4X), para ter uma foto panorâmica do hipocampo, e em maior aumento (objetivas de 10X e 60X; figura 4B-C), para as seguintes quantificações.

O software ImageJ/FIJI foi utilizado para todas as análises. Para um resumo dos parâmetros analisados, veja a tabela 2. Para a lista detalhada de comandos utilizados, veja o anexo 1.

#### **3.4.1. Análise de Densidade**

Para a análise de densidade de micróglias, foram utilizadas as fotografias no aumento de 10X (figura 5), em duplicata. Primeiramente, delimitamos as sub-regiões do hipocampo na imagem da marcação por DAPI e medimos a área da sub-região através da função de medição (*measure*) do ImageJ. Em seguida, passamos essa marcação para a imagem com GFP, já convertida em imagem binária. Para a conversão em imagem binária, utilizamos a função “*threshold*”, que permite separar a imagem do seu fundo. Utilizamos a função de análise de partículas (*Analyze Particles*) com delimitações 6 -  $\infty$   $\mu$ m para a contagem de células microgлияis. A densidade foi calculada dividindo o número de micróglias pela área da região correspondente.



**Figura 5. Análise de densidade.** (A) Fotomicrografia GFP 10x bruta e convertida em imagem binária. (B) Marcação da região de interesse na fotomicrografia com DAPI. (C) Conta da densidade. Escala: 500µm.

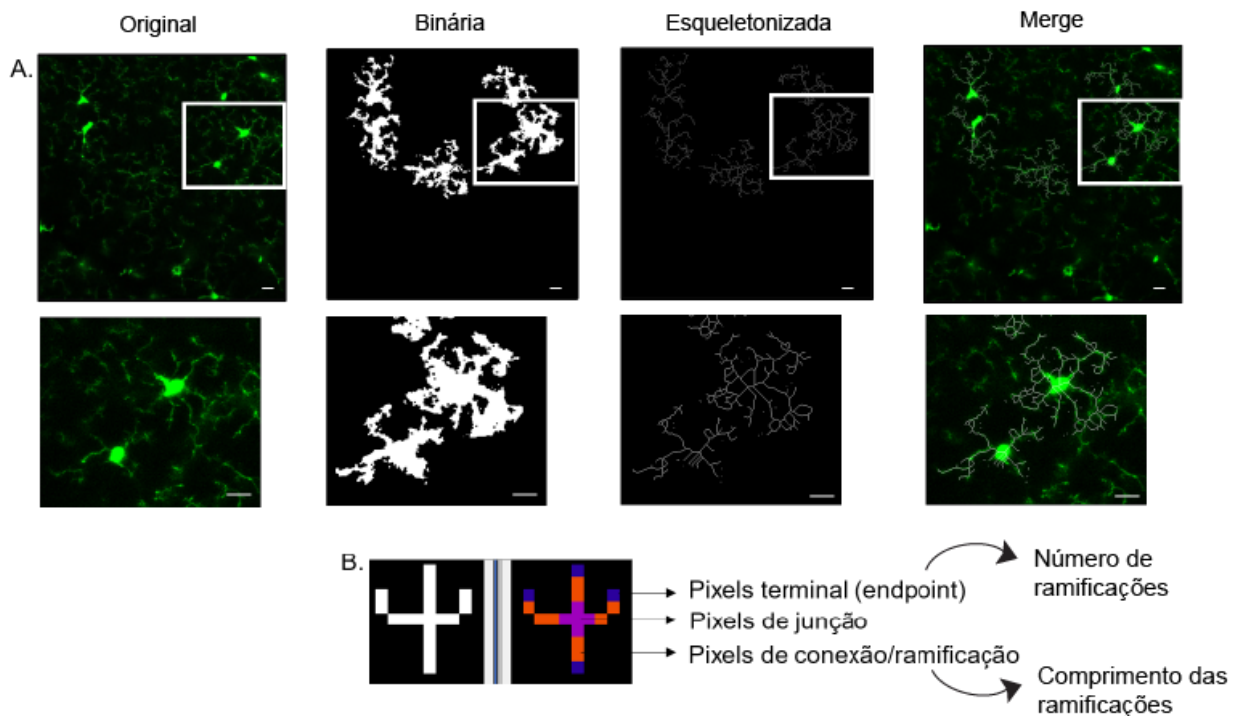
### 3.4.2. Análise de Ramificações

Micróglia são células extremamente plásticas. Elas são capazes de modificar sua morfologia em resposta a mudanças em seu microambiente, retraindo suas ramificações (Sominsky, Luca and Spencer, 2018). Dessa maneira, investigamos se o estresse crônico na infância provoca a modificações das ramificações microgliais a curto e longo prazo.

Existem diversas maneiras de analisar a morfologia das micróglia. Aqui, utilizamos a análise de ramificações através do protocolo de esqueletonização, segundo publicado por Young e Morrison (Young and Morrison, 2018), com pequenas modificações. Utilizamos as fotomicrografias de 60X, em série Z a cada micrômetro de profundidade. Fizemos a montagem da série Z contendo 6 “stacks”. O contraste foi ajustado de modo que os prolongamentos ficassem o mais evidentes possível. Apenas células em que o corpo celular estava contido na imagem foram

consideradas, as demais foram apagadas. O restante do procedimento de binarização e esqueletonização foi feito de acordo com o artigo citado. Para detalhes, veja o anexo 1.

O plugin de esqueletonização remove repetidamente os pixels externos de uma imagem binária até essa imagem ser reduzida a um formato de apenas 1 pixel (figura 6). Já o plugin de análise (*Analyze Skeleton Plugin*) reconhece todos os pixels/voxels de uma imagem esqueletonizada e diferencia os pixels de junções daqueles de ramificação, e mede seu comprimento médio e máximo. Ele também é capaz de reconhecer os pixels/voxels terminais das ramificações (*endpoints*) (figura 6). Neste trabalho nós somamos a quantidade de pixel/voxels terminais das ramificações e comprimento dos processos (extraídos automaticamente pelo plugin) e normalizamos pelo número de células contidas na imagem. Os parâmetros nos dão informação do número de ramificações (N° de ramificações/cel) e comprimento médio das ramificações (Comp. Ramificações/cel) de uma fotomicrografia, respectivamente (Tabela 2).



**Figura 6. Processo de esqueletonização.** (A) Primeiramente a imagem original é convertida para binária e então esqueletonizada. A última coluna mostra a sobreposição do esqueleto na imagem original. O zoom dos quadrados brancos é detalhado embaixo. Escala 10 $\mu$ m. (B) Ilustração da análise feita pelo plugin.

### 3.4.3. Análise de Fractal

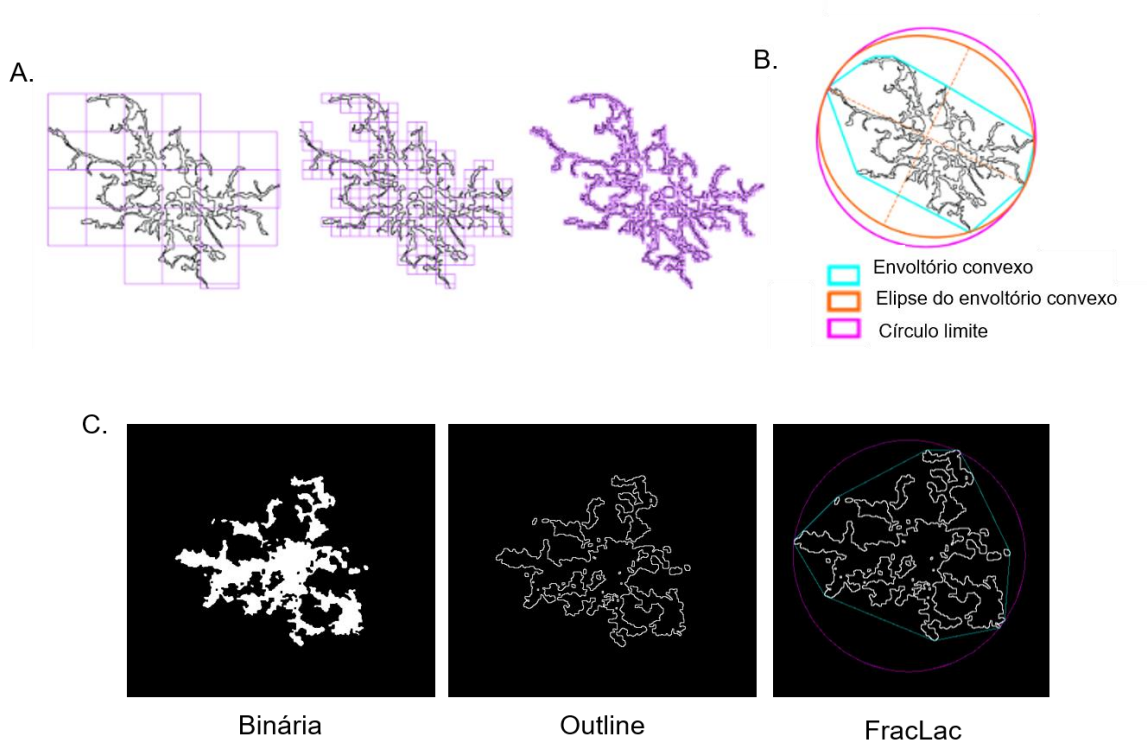
A análise de esqueletonização nos dá um panorama de como está o conjunto celular, mas é limitada à análise de ramificações. Para uma análise mais minuciosa da morfologia das micróglia, utilizamos o protocolo de análise de fractal, também descrito por Young e Morrison (2018), que conta com a utilização do plugin FracLac do ImageJ.

A análise de fractal é uma análise de complexidade. Usualmente esse termo é abstrato e de difícil medição, mas o plugin utiliza a definição de que complexidade é a mudança de detalhes à medida que se muda a escala. Ou seja, quanto mais complexo, mais detalhes uma imagem terá quando a escala for aumentada. Assim, é possível usar o padrão de fractal de Koch (ou curva de Koch) para calcular a complexidade de uma figura – ou de uma micróglia. Para fazer esse cálculo, o plugin FracLac calcula a dimensão de fractal ( $D_b$ ) para cada célula usando um protocolo de escaneamento em blocos que determina a quantidade de detalhes em pixel com o aumento da escala, onde  $N$  = número de pixels, ou “detalhe”, em uma determinada escala ( $\epsilon$ ); (para detalhes sobre o cálculo, visite <https://imagej.nih.gov/ij/plugins/fractalac/FLHelp/FractalDimension.htm#df>).

O plugin FracLac também analisa aspectos complementares da morfologia. Aqui nos interessa a proporção de amplitude (do inglês *span ratio*) e a densidade da célula. Essas medidas são geradas a partir de um envoltório convexo, que circunda a micróglia com um polígono e um círculo que limita o envoltório. A proporção de amplitude é a razão entre o maior comprimento e a maior largura da elipse do envoltório convexo (Figura 7.B). Ela nos dá a informação do formato celular, assim como de sua circularidade (quanto mais próximo de 1, mais circular). A densidade celular é o número de pixels contido dentro do contorno da célula dividido pela área do envoltório, também em pixel. Ela nos dá a informação do tamanho celular. Para evitar confusões com a análise de densidade feita anteriormente, chamaremos este parâmetro de “Tamanho Celular” daqui para frente.

Utilizamos as mesmas imagens binárias utilizadas para a esqueletonização e convertemos para o contorno da célula (*outline*; Figura 7.C). Os resultados são decorrentes da média de 3 células randomizadas de cada fotomicrografia. Para mais detalhes sobre a preparação das imagens, consulte o anexo 1.





**Figura 7: Análise fractal.** (A) Imagem do escaneamento em blocos em diferentes escalas. (B) Imagem da análise molecular complementar à análise Fractal. (C) Imagens representativas utilizadas neste trabalho. A-B. Adaptado de Young e Morrison (2018).

### 3.5. Análise estatística

A análise estatística do efeito do estresse e da idade nos animais foi feita pela ANOVA de duas vias (two-way ANOVA) com os dados brutos, seguida de teste Tukey como post-hoc. Para verificar a diferença sexual da resposta ao estresse, os grupos SM foram normalizados pelos respectivos Naive. Para verificar o dimorfismo sexual na dinâmica desenvolvimental (alterações ao longo da infância) dos animais, os grupos P30 foram normalizados pelos respectivos P15. Todas as análises de dimorfismo foram feitas com teste T (Student's t test) para dados paramétricos e Mann-Whitney Rank Sum Test para dados não paramétricos. O programa SigmaPlot 14 foi utilizado para as estatísticas e o programa GraphPad Prism 9 foi utilizado para a montagem dos gráficos. A significância considerada foi de 0.05 ( $p < 0.05$ ). Os gráficos estão apresentados com desvio padrão e média para dados paramétricos e mediana para não paramétricos. Detalhes das estatísticas estão descritos nas tabelas do Anexo 2.

Para visualizarmos a relação entre dos parâmetros morfológicos analisados, plotamos as médias dos grupos em um gráfico tridimensional (x/y/z), utilizando o site [www.geogebra.org](http://www.geogebra.org). Esse gráfico não tem valor estatístico e é utilizado para auxiliar na interpretação nos resultados. Utilizamos os parâmetros “comprimento de ramificação”, “Tamanho Celular” e “Proporção de

Amplitude” para formulação do gráfico, uma vez que cada um representa uma característica morfológica distinta e não correlacionada entre si (Morrison *et al.*, 2017).

	<b>Medida</b>	<b>Unidade</b>	<b>Escala</b>	<b>Interpretação</b>
Comprimento dos processos	Soma/Células	µm /célula	Fotomicrografia inteira	Ramificação celular (comp.)
“endpoints” das ramificações	Soma/Células	#/célula	Fotomicrografia inteira	Ramificação celular (N°)
Dimensão de fractal	<i>Inclinação de regressão</i> $\left[ \frac{\ln(N)}{\ln(\varepsilon)} \right]$	Db	Célula isolada	Complexidade
Proporção de amplitude	$\frac{\text{Maior comprimento da elipse}}{\text{Maior largura da elipse}}$	Razão	Célula isolada	Formato celular / circularidade
Tamanho celular	$\frac{\# \text{ pixels dentro do contorno}}{\text{Área do contorno convexo}}$	Pixel	Célula isolada	Tamanho celular

**Tabela 1: Resumo das análises de morfologia** ln. logaritmo natural; N. Número de pixels; ε. Escala; Db. Dimensão de Fractal.

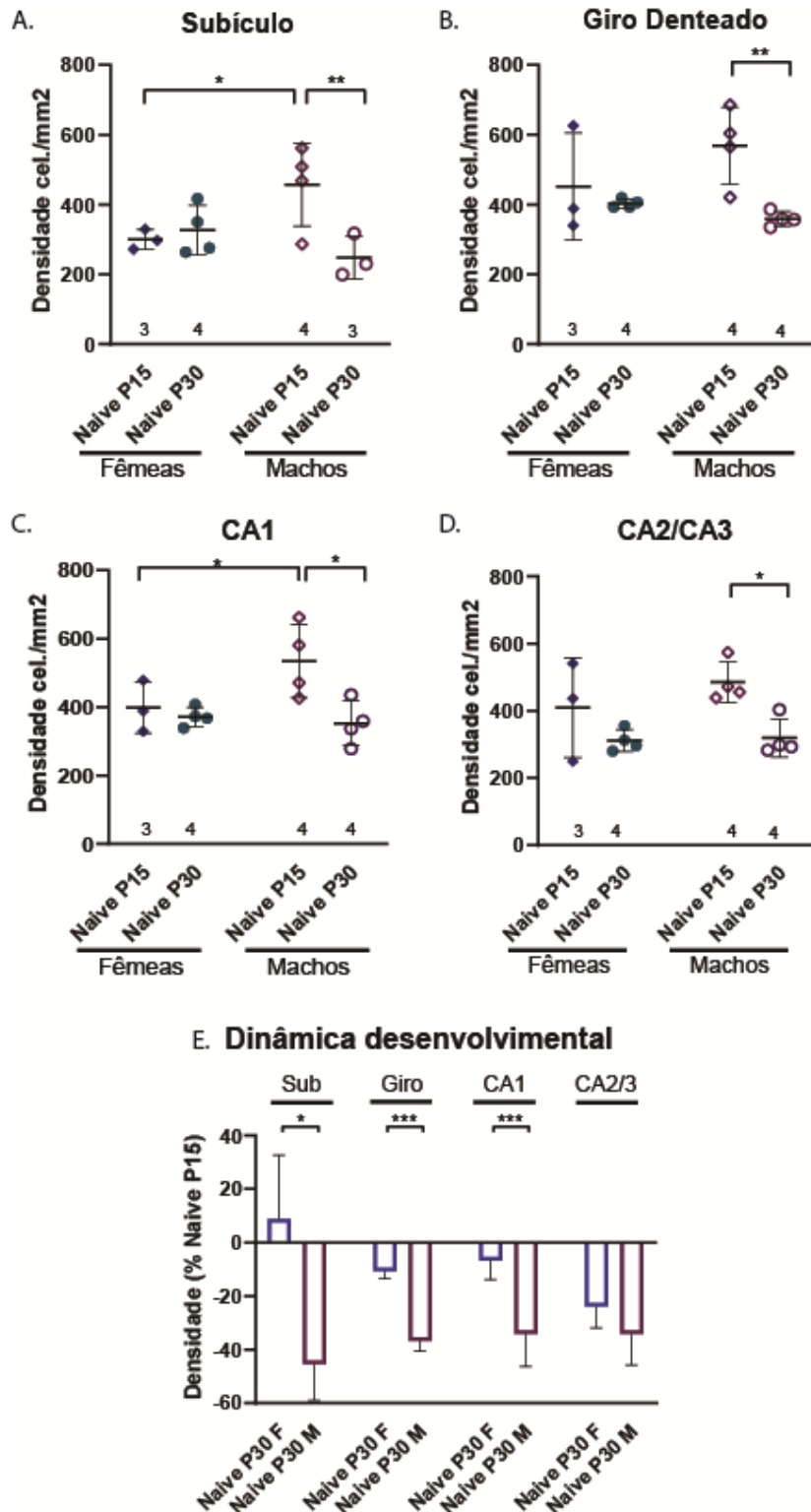
#### 4. RESULTADOS

##### 4.1. As micróglia de camundongos machos e fêmeas apresentam características etológicas distintas ao longo do desenvolvimento

###### 4.1.1. A densidade de micróglia hipocampais diminui com a idade apenas em camundongos machos

Durante o desenvolvimento, há intensa proliferação de micróglia a partir da última semana gestacional, com pico por volta do P14 de camundongos e posterior queda em sua densidade na terceira semana de vida (Nikodemova *et al.*, 2015). Observamos a mesma dinâmica na densidade de micróglia em todas as áreas do hipocampo em animais machos (sub: F= 4,182, p=0,008; giro: F=7,848, p=0,007; CA1: F=7,364, p=0,005; CA2-3: F=10,513 p=0,012; Figura 8A-D). Porém, fêmeas não apresentaram tal diminuição significativa na densidade de micróglia quando comparamos P15 e P30. Também vimos que na idade P15 a densidade de micróglia no subículo de machos é 52,3% maior que de fêmeas da mesma idade (F=0,800, p=0,031); e 25,5% maior em CA1 (F=2,295, p=0,035; Figura 8A e 8C). Por outro lado, não observamos diferença na densidade de micróglia hipocampais entre machos e fêmeas no P30.

Em seguida, analisamos possíveis diferenças na dinâmica desenvolvimental das micróglia nos nossos animais, em que vimos a modificação de densidade das micróglia no P30 em relação à densidade no P15. Para isso, os dados foram normalizados pelos animais P15 de cada grupo. Vimos uma diferença etológica na dinâmica desenvolvimental de micróglia entre os sexos. Machos e fêmeas apresentam diferença na densidade do subículo ( $t=3,515$ ;  $p=0,017$ ), giro denteado ( $t=11,241$ ;  $p<0,001$ ) e CA1 ( $t=3,897$ ;  $p=0,008$ ; Figura 8E).

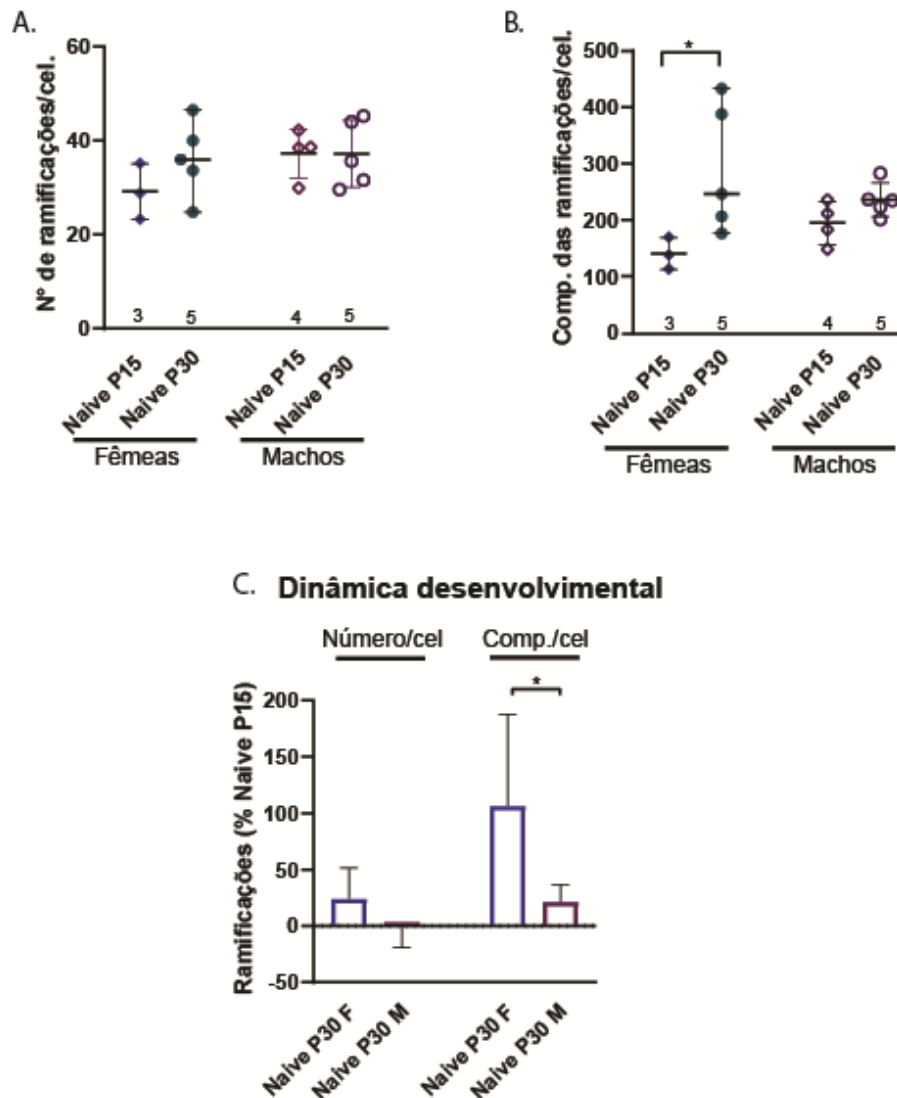


**Figura 8. Diferenças sexuais etológicas na densidade de micróglia.** Densidade de células (cel./mm<sup>2</sup>) em machos e fêmeas naive P15 e P30 no (A) subículo, (B) Giro Dentado, (C) CA1 e (D) CA2/CA3. E. Os dados dos grupos P30 foram normalizados pelos respectivos P15 para averiguar diferenças na dinâmica desenvolvimental entre animais machos e fêmeas. A-D. Two-Way ANOVA/ Tukey test; E. Teste T student; \*p<0,05; \*\*p<0,01; \*\*\*p<0,001.

#### 4.1.2. *A dinâmica desenvolvimental do comprimento das ramificações microgliais é sexualmente dimórfica*

Micróglia são células dinâmicas que respondem aos estímulos do microambiente neural, sendo uma dessas mudanças a expansão ou recolhimento de suas ramificações. As micróglia apresentam morfologia mais ramificada em seu estado de vigilância e recolhimento das ramificações em estados responsivos (Mosser *et al.*, 2017). Durante o processo desenvolvimental a morfologia dessas células também se modifica (Dalmau *et al.*, 1998), portanto, fizemos uma análise média das ramificações dos animais por meio do protocolo de esqueletonização das células.

Vimos aumento de 19,4% no comprimento das ramificações de micróglia apenas em fêmeas P30 em comparação às fêmeas P15 ( $F=7,845$ ;  $p=0,011$ ; Figura 9A-B). O dimorfismo sexual se torna mais evidente na análise da dinâmica desenvolvimental, em que machos e fêmeas diferem no parâmetro de comprimento das ramificações ( $t=3,10$ ;  $p=0,027$ ). Não houve diferenças no número médio de ramificações ao longo do desenvolvimento em ambos os sexos (Figura 9).

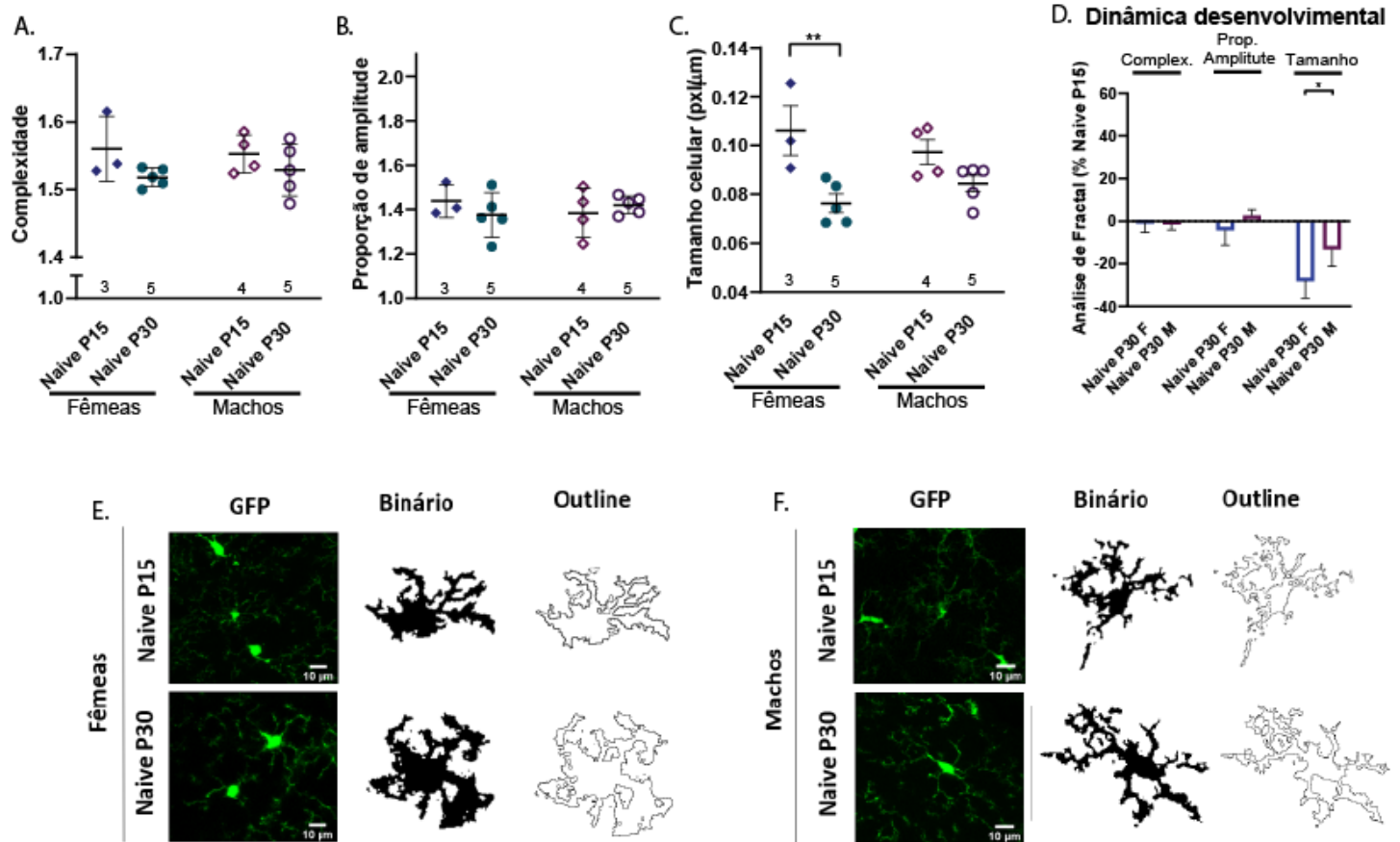


**Figura 9. Diferenças sexuais etológicas nas ramificações de micróglia.** (A) Número de ramificações/célula de machos e fêmeas naive P15 e P30; (B) Somatória do comprimento das ramificações/célula de machos e fêmeas naive P15 e P30; (C) Os dados dos grupos P30 foram normalizados pelos respectivos P15 para averiguar diferenças na dinâmica desenvolvimental entre animais machos e fêmeas. A-B. Two-Way ANOVA/ Tukey test; C. Teste T student; \* $p < 0,05$ .

#### 4.1.3. A dinâmica desenvolvimental do tamanho celular de microgliais é sexualmente dimórfica

Micróglia são células com morfologia altamente complexa. A fim de fazer uma análise mais acurada de sua morfologia celular, usamos o protocolo de análise fractal para quantificar a complexidade celular, ou seja, seu nível de detalhamento; a proporção de amplitude, que nos informa sobre o formato celular ou circularidade; e a densidade da célula, uma medida de tamanho celular.

Durante o desenvolvimento do animal, no P15 e P30, não vimos modificações na complexidade das micróglia nem em sua circularidade. Contudo, o tamanho celular das micróglia hipocampais de fêmeas no P30 é 28,02% menor que no P15 ( $F=16,257$ ;  $p=0,002$ ; Figura 10A-C), diminuição que foi mais intensa em fêmeas que em machos ( $t=-2,929$ ;  $p=0,019$ ; Figura 10D).



**Figura 10. Diferenças sexuais etológicas na morfologia de micróglia.** (A) Parâmetro de complexidade de machos e fêmeas naive P15 e P30; (B) Proporção de amplitude do círculo convexo que circunda a micróglia de machos e fêmeas naive P15 e P30; (C) Tamanho celular de machos e fêmeas naive P15 e P30, obtido através da densidade de pixel em cada célula. (D) Os dados dos grupos P30 foram normalizados pelos respectivos P15 para averiguar diferenças na dinâmica desenvolvimental entre animais machos e fêmeas. (E-F) Figuras representativas das micróglia dos grupos Naive. A-C. Two-Way ANOVA/Tukey test; D. Teste T student; \* $p<0,05$  \*\* \*\* $p<0,01$

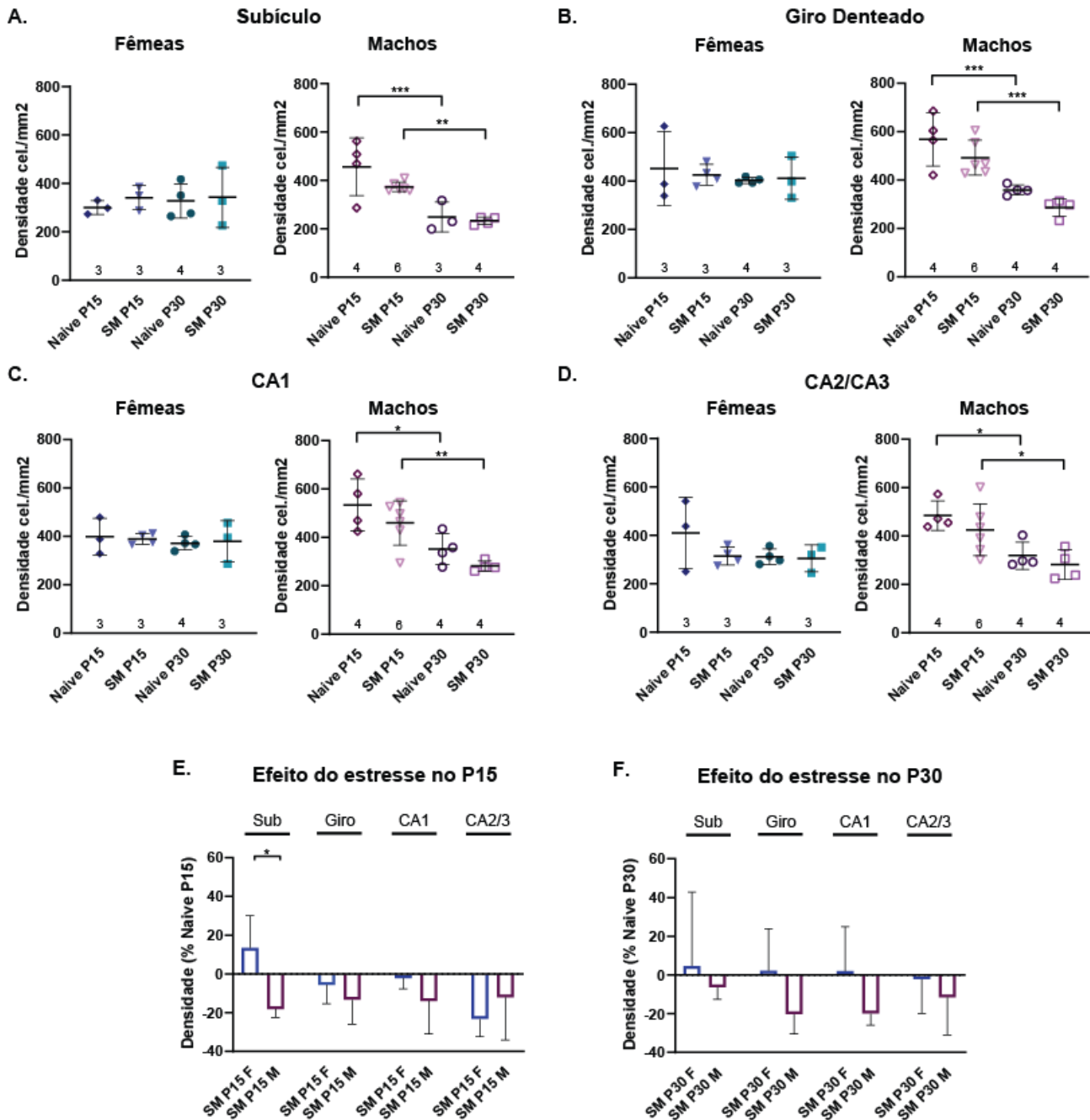
#### 4.2. O estresse por separação materna impacta a densidade e morfologia de micróglia à curto prazo, de maneira sexualmente dimórfica

##### 4.2.1. O estresse na infância influencia a densidade de micróglia no subículo de animais P15 de maneira sexualmente dimórfica

A ANOVA de duas vias do giro denteado de machos detectou uma diferença no fator estresse ( $F=4,997$ ;  $p=0,042$ ), sem interação entre fatores ( $F=0,0025$ ;  $p=0,960$ ). Contudo, não foi identificada nenhuma diferença entre os grupos Naive e Separação Maternal no post-hoc. Igualmente, o protocolo de separação maternal não foi capaz de modificar de maneira significativa a densidade das micróglia em nenhuma outra região, nem em P15 nem em P30 (Figura 11A-D). Machos estressados na infância também apresentam diminuição na densidade de micróglia no P30 em relação ao P15 em todas as regiões (sub:  $F=29,712$ ,  $p=0,005$ ; giro:  $F=38,810$   $p<0,001$ ; CA1:  $F=22,161$   $p=0,004$ ; CA2-3:  $F=16,459$   $p=0,015$ ; Figura 11A-D)

Nós normalizamos os animais dos grupos SM por seus respectivos controles (Naive) para investigar a diferença sexual no efeito da separação maternal sobre a densidade de micróglia dos animais. Essa análise nos permite investigar o dimorfismo sexual da resposta ao estresse independentemente de eventuais diferenças basais. Micróglia presentes no subículo do hipocampo de camundongos machos e fêmeas responderam de maneira diferente ao estresse na infância. Tal diferença foi detectada logo após o estresse crônico, no P15 ( $t=4,664$   $p=0,002$ ; Figura 11E), mas não perdurou até o início da adolescência, no P30 ( $t=0,592$   $p=0,580$ ; Figura 11F).



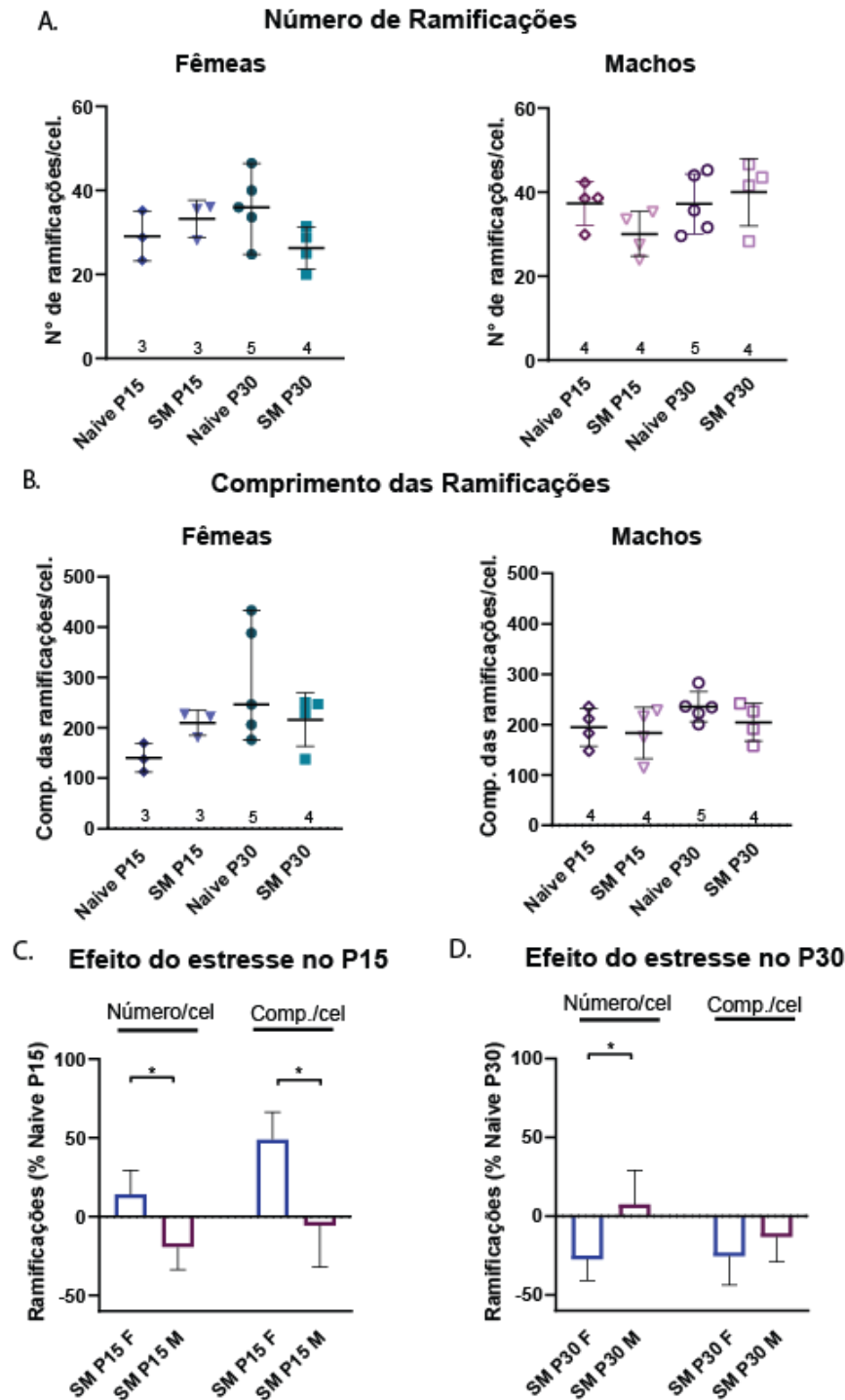


**Figura 11. Resposta da densidade microglial ao estresse por separação materna.** Densidade de células (cel./mm<sup>2</sup>) em machos e fêmeas naive e separados (SM) no (A) subículo, (B) Giro Denteado, (C) CA1 e (D) CA2/CA3. Os dados dos grupos SM foram normalizados pelos respectivos Naive para averiguar diferenças na resposta ao estresse entre animais machos e fêmeas. A-D. Two-Way ANOVA/ Tukey test; E-F. Teste T student; \* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$ ; \*\*\* $p < 0,001$ .

#### 4.2.2. *O estresse na infância influencia a ramificação de micróglia no hipocampo de maneira sexualmente dimórfica*

O protocolo de separação maternal não foi capaz de modificar significativamente os parâmetros de ramificação estudados (Figura 12A-B).

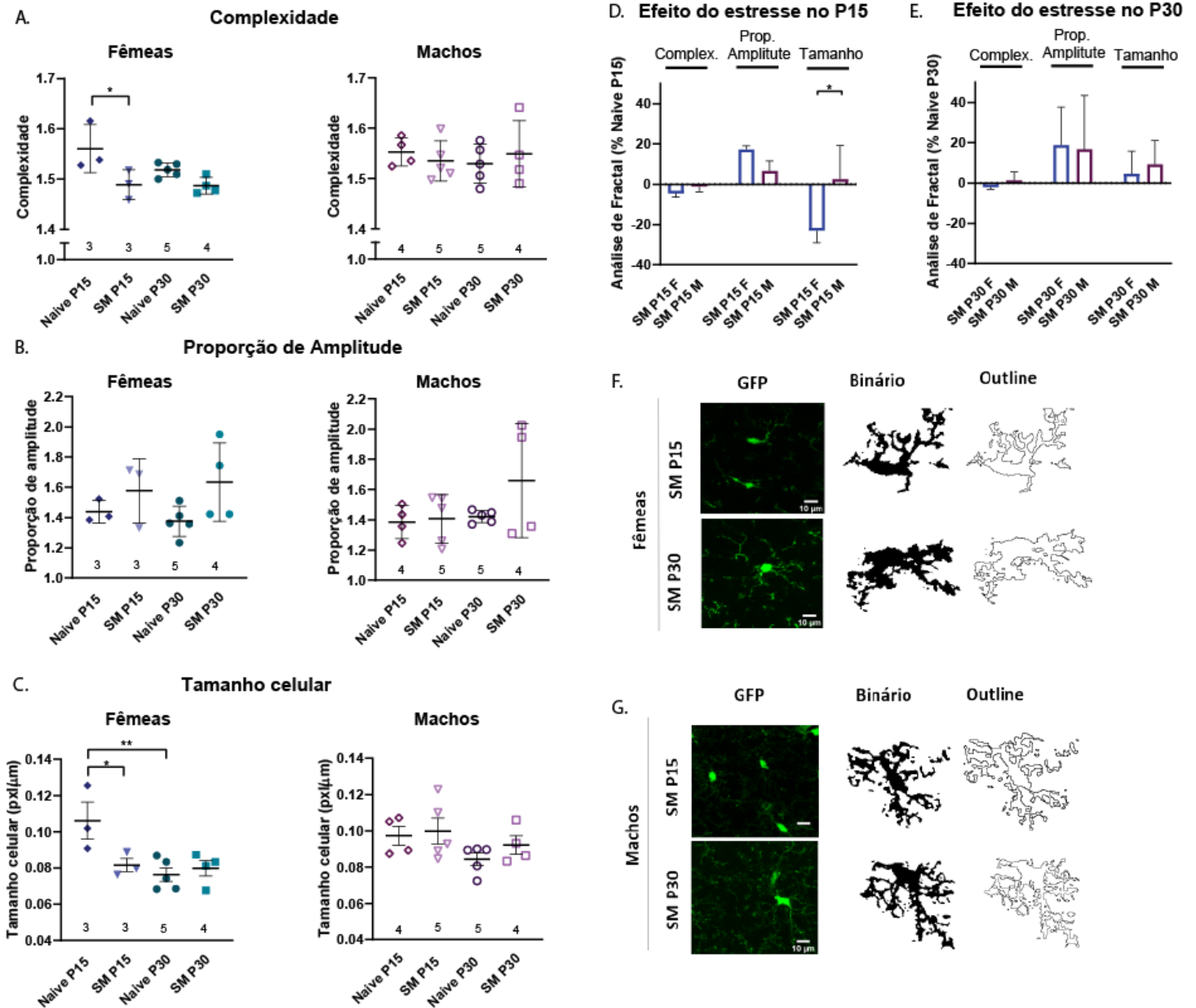
A modificação de ramificações em resposta ao estresse foi diferente em camundongos machos e fêmeas. A curto prazo, no P15, a quantidade de terminações e o comprimento das ramificações em resposta ao estresse foram diferentes entre machos e fêmeas ( $t=2,99$ ;  $p=0,03$  e  $t=3,1$ ;  $p=0,027$ , respectivamente; Figura 12C). A diferença na quantidade de terminação perdurou até o P30 ( $t=-2,711$ ;  $p=0,035$ , Figura 12D), em contraste com o seu comprimento.



**Figura 12. Modificações na ramificação microglial em resposta ao estresse por separação materna.** (A) Número de ramificações/célula de machos e fêmeas Naive e separados (SM) P15 e P30; (B) Somatória do comprimento das ramificações/célula de machos e fêmeas Naive e separados (SM) P15 e P30; (C-D) Os dados dos grupos SM foram normalizados pelos respectivos Naive para averiguar diferenças na resposta ao estresse entre animais machos e fêmeas A-B. Two-Way ANOVA/ Tukey test; C. Teste T student; \* $p < 0,05$ .

#### 4.2.3. *O estresse crônico na infância modifica a complexidade e tamanho celular de micróglia hipocámpica apenas em camundongos fêmeas*

Vimos uma diminuição de 4,5% da complexidade celular de fêmeas logo após a separação materna, no P15, levando a média do grupo estressado aos níveis da média dos animais P30 ( $F=2,461$ ;  $p=0,008$ ; Figura 13A). Esse efeito a curto prazo do estresse também é visto no tamanho celular, em que fêmeas SM P15 apresentam diminuição de 23% deste parâmetro em relação ao grupo naïve da mesma idade ( $F=3,516$ ,  $p=0,016$ ; Figura 13C). Machos não apresentam diferenças significativas nos parâmetros analisados (Figura 13A-C). A comparação da resposta ao estresse reflete a diferença vista entre os sexos: o tamanho celular das micróglia é modificado pela separação materna de maneira diferente entre machos e fêmeas, apenas no P15 ( $t=-2,51$ ;  $p=0,046$ ; Figura 13E-F).



**Figura 13. Modificações na morfologia microglial em resposta ao estresse por separação materna.**

(A) Parâmetro de complexidade de fêmeas e machos Naive e separados (SM) P15 e P30; (B) Proporção de amplitude do círculo convexo que circunda a micróglia de fêmeas e machos Naive e separados (SM) P15 e P30; (C) Tamanho celular de fêmeas e machos Naive e separados (SM) P15 e P30, obtido através da densidade de pixel em cada célula. (D-E) Os dados dos grupos SM foram normalizados pelos respectivos Naive para averiguar diferenças na resposta ao estresse entre animais fêmeas e machos. (F-G) Imagens representativas das micróglia do grupo SM. A-C. Two-Way ANOVA/ Tukey test; D-E. Teste T student; \* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$ .

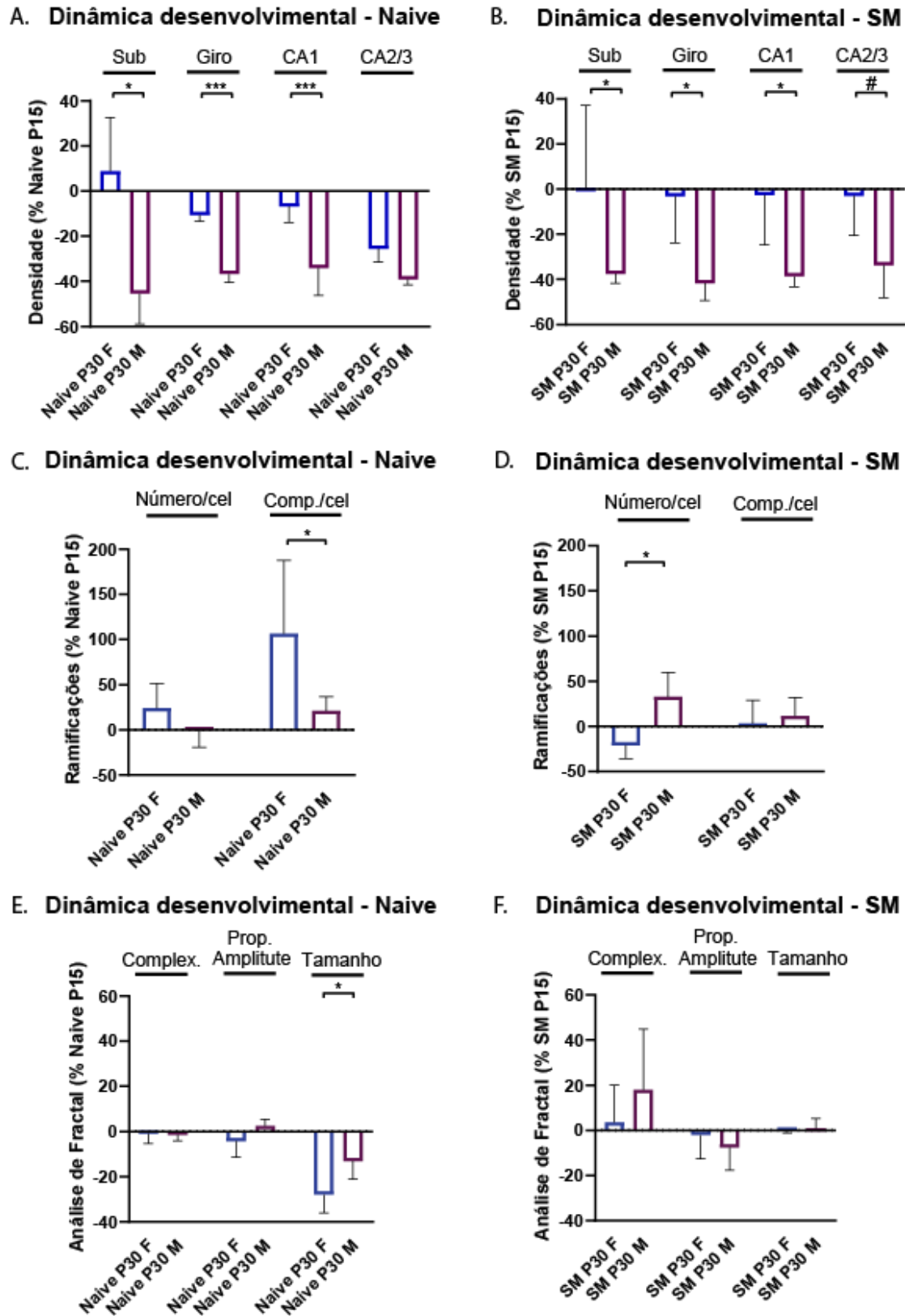
#### 4.2.4. *O estresse na infância altera diferenças sexuais etológicas presentes na densidade e morfologia das micróglia*

Por fim, fizemos a mesma análise de dinâmica desenvolvimental para animais previamente estressados, a fim de verificar se o estresse influencia o dimorfismo sexual observado anteriormente.

No que diz respeito à densidade celular, continuamos observando a diferença na dinâmica desenvolvimental entre machos e fêmeas, mas os animais que passaram pelo estresse crônico tiveram uma leve diferença na região do CA2/3 ( $t = 2,552$   $p=0,051$ ; Figura 14), não vista anteriormente em animais Naive.

Interessantemente, vimos uma inversão do dimorfismo sexual nos parâmetros de ramificação microglial. Machos naive P30 apresentaram diferença no comprimento de ramificações em relação às fêmeas naive da mesma idade ( $t=2,315$   $p=0,049$ ; Figura 14), enquanto não houve diferença significativa no número de ramificações por célula entre os sexos. Contudo, machos e fêmeas que passaram pelo estresse na infância apresentaram diferença na quantidade de terminações no P30 ( $t=-3,521$   $p=0,013$ ), mas perdem a diferença etológica no comprimento das ramificações (Figura 14).

Já na análise detalhada da morfologia celular, animais que foram previamente estressados na infância deixam de apresentar a diferença sexual etológica vista anteriormente no tamanho celular (Naive:  $t=-2,929$   $P=0,019$  x SM  $t=0,759$   $p=0,477$ ; Figura 14).

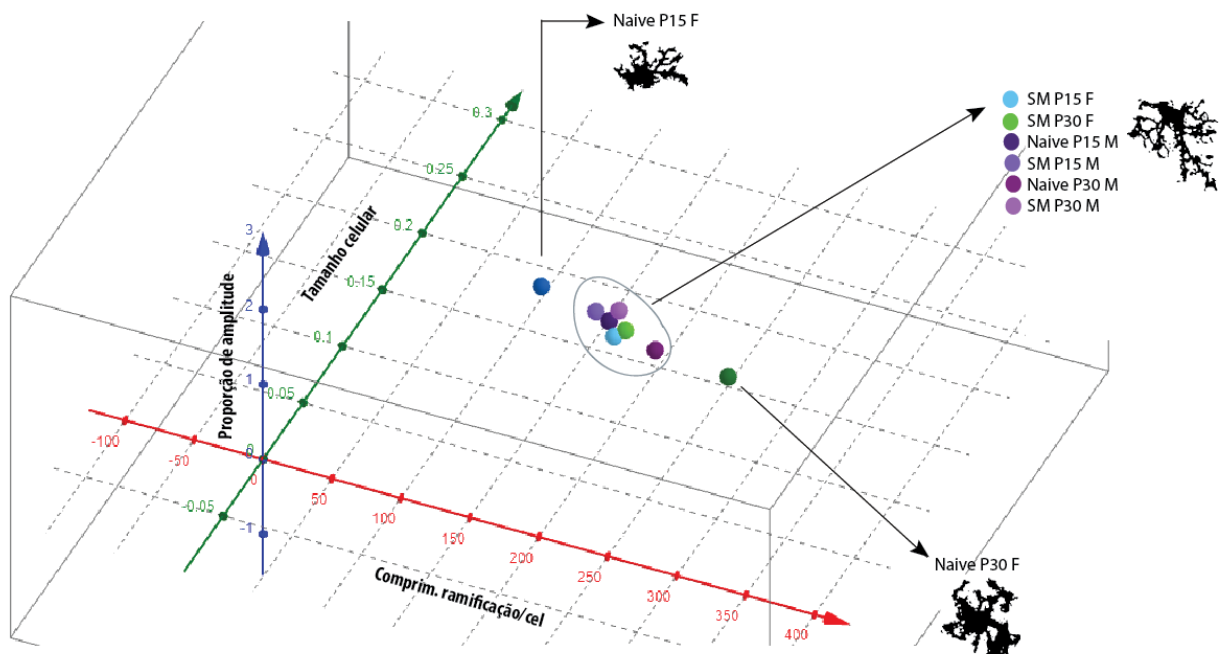


**Figura 14.** Efeito do estresse na infância no dimorfismo sexual etológico em micróglia de camundongos. Os dados dos grupos P30 foram normalizados pelos respectivos P15 para averiguar diferenças na dinâmica desenvolvimental entre animais machos e fêmeas na densidade de animais naive

(A) e separados (B); nas ramificações de animais naive (C) e separados (D); e na morfologia de animais naive (E) e separados (F). A-F. Teste T student; \* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$ ; \*\*\* $p < 0,001$ ; # $p = 0,051$ .

#### 4.2.5. *Micróglia de fêmeas responde à separação maternal de modo a se assemelhar com a morfologia vista em machos.*

Por fim, fizemos um gráfico de dispersão de 3 dimensões (x/y/z) com a média dos grupos a fim de auxiliar a interpretação das modificações morfológicas vistas. Podemos perceber que o grupo de fêmeas naive apresenta características morfológicas diferentes dos demais grupos. Fêmeas naive P15 apresentam um cluster próprio, com morfologia relacionada à descrita por Dalmau como “micróglia tipo reativa” (Dalmau *et al.*, 1998), que apresenta forma oval para arredondada, com ramificações largas e rechonchudas. Fêmeas naive P30 apresentaram aumento do comprimento de ramificações e diminuição do tamanho celular, condizente com uma morfologia de vigilância (Morrison *et al.*, 2017). Já fêmeas SM apresentaram morfologia próxima ao grupo de machos independentemente da idade, com menor complexidade. Essas micróglia apresentam forma de vara, podendo ser interpretadas como desramificada, um estado de transição entre a micróglia vigilante e ameboide (Morrison *et al.*, 2017; Gildawie *et al.*, 2020b).



**Figura 15: Fêmeas SM apresentam morfologia mais próxima de machos que de seus controles Naive.** Distribuição da média dos grupos de acordo com os parâmetros morfológicos. Eixo X: comprimento de ramificação/cel.; Eixo Y: proporção de amplitude; Eixo z tamanho celular.



## 5. DISCUSSÃO

Nesse trabalho mostramos que as micróglia de camundongos machos e fêmeas são sexualmente dimórficas ao longo do desenvolvimento, em que machos apresentam maior densidade de micróglia no hipocampo ventral no P15. A dinâmica desenvolvimental também difere entre os sexos: entre o P15 e P30 fêmeas apresentam modificação da morfologia na direção de micróglia com morfologia de vigília, enquanto machos não apresentam modificações relevantes nessa faixa desenvolvimental. Apenas micróglia de fêmeas responderam ao estresse por separação materna, modificando sua morfologia no P15 para uma morfologia de transição, mais próxima daquela observada em camundongos machos. Tais modificações persistem em fêmeas até o P30.

Devido às características altamente dinâmicas das micróglia, análises morfológicas estáticas nos dão informações limitadas sobre seu perfil inflamatório ou sua consequência no microambiente neural. Contudo, a interpretação e hipóteses levantadas a partir de análises morfológicas são ferramentas preciosas para direcionar futuros projetos e investimentos.

Vimos que machos P15 apresentam uma densidade maior de micróglia no subículo e CA1 quando comparados com fêmeas da mesma idade, mas não apresentam diferença significativa no início da adolescência. Gunekaya e colaboradores (2018) viram maior densidade de micróglia no hipocampo de camundongos fêmeas no P21 e no P91 (Guneykaya *et al.*, 2018). Em uma comparação mais detalhada, Schwarz e colaboradores (2012) viram maior número de micróglia com processos grossos no hipocampo de ratas no P30 e P60. A discrepância de resultados encontrados nos animais púberes pode ser devido à utilização de animais diferentes ou método de análise, uma vez que o último artigo utiliza ratos e subdivide as células em diferentes tipos de micróglia, no qual só um tipo apresenta diferença (Schwarz, Sholar and Bilbo, 2012).

Mais interessante que a diferença de densidade em si, é a diferença sexual na dinâmica desenvolvimental dos animais. Vimos que apenas machos apresentam redução da densidade microglial entre os 15 e 30 dias pós-natais. Estudos com animais machos mostram aumento da densidade de micróglia no hipocampo até a segunda semana desenvolvimental, com pico no P14 (Dalmau *et al.*, 1998; Kim *et al.*, 2015); contudo poucos estudos exploram a ontogenia de micróglia em fêmeas. É viável a hipótese de que o pico ou o decaimento de micróglia em fêmeas acontece em uma janela desenvolvimental anterior comparado aos machos. Esse dimorfismo sexual na maturação é visto em outros sistemas neurais, como no sistema dopaminérgico, que sofre um atraso da maturação em machos (Stewart, Kühnemann and Rajabi, 1991). Nelson e colaboradores viram que no P3 ratas apresentam maior número de micróglia fagocitárias no hipocampo e a administração de estradiol retorna seu nível para a média de machos (Nelson, Warden and Lenz, 2017b). Portanto, é possível que o pico de andrógenos que

ocorre nos primeiros dias pós-natais em roedores possa atrasar o pico de micróglia em machos em relação ao das fêmeas. Estudos desenvolvimentais com fêmeas em diferentes idades anteriores ao P15 são necessários para elucidar essa questão.

A morfologia de machos P30 não apresenta modificações significantes em relação ao P15. Micróglia com morfologia típica vigilante aparecem a partir do P15 e nessa idade desenvolvimental grande parte das células ainda se encontram em uma morfologia classificada como "micróglia tipo reativa" ou "micróglia primitiva ramificada" (Dalmau *et al.*, 1998). Vimos que em média as micróglia de machos apresentam morfologia alongada, típica de transição, em ambas as idades. É possível que as micróglia estejam fazendo essa transição de morfologia no período desenvolvimental em que as fotografamos. Esse resultado reitera a importância do início da adolescência para a maturação de diversos sistemas do cérebro, fazendo desta uma janela desenvolvimental de susceptibilidade a fatores externos, como estresse, traumas e infecções.

Em fêmeas naive P15, vimos uma morfologia parecida com a categorizada por Dalmau como "micróglia tipo reativa", que apresenta forma oval para arredondada, com ramificações largas e rechonchudas (Dalmau *et al.*, 1998). No P30 vimos um aumento do comprimento das ramificações juntamente com a diminuição do tamanho/densidade celular. Essa diminuição pode ser um reflexo da diminuição do soma ou do afinamento dos processos, gerando um formato mais próximo de micróglia vigilantes no P30. Schwarz e colaboradores descreveram a predominância de micróglia com processos longos e grossos no hipocampo de fêmeas nessa idade, que permanece até o início da vida adulta, enquanto Bollinger e colaboradores (2016) mostraram um maior número de micróglia ramificadas em fêmeas (Schwarz, Hutchinson and Bilbo, 2011; Bollinger, Bergeon Burns and Wellman, 2016).

Mais estudos precisam ser feitos para elucidar como essa diferença entre sexos implica no desenvolvimento fisiológico do sistema nervoso. Kopec e colaboradores (2018) mostraram que o amadurecimento do comportamento social em machos é dependente da poda de receptores dopaminérgicos por micróglia via sistema complemento no P30. Contudo, a queda dos receptores dopaminérgicos no núcleo acumbens ocorre antes em fêmeas e não depende desse sistema (Kopec *et al.*, 2018). Ainda, diferenças sexuais moleculares não refletem necessariamente funções contrárias, pois vias distintas podem convergir para funções semelhantes (De Vries, 2004). Desse modo, é possível que interferências externas na infância e adolescência modifiquem processos diferentes e específicos em machos e fêmeas, refletindo na susceptibilidade a transtornos de maneira sexo-específica.

Interessantemente, vemos diferença em idades em que os hormônios sexuais ainda não apresentam grande influência. Diferenças sexuais nessa faixa podem ser decorrentes da expressão de genes presentes nos cromossomos sexuais Y e X, uma vez que cerca de 15% dos

genes escapam à inativação do X. Ainda, programações epigenéticas no início da vida podem fazer com que haja diferença na expressão de genes comuns de maneira dimórfica (Kodama and Gan, 2019).

Em seguida, investigamos as consequências do estresse pós-natal nas micróglia de camundongos no início da adolescência. Escolhemos focar no hipocampo ventral pois essa parte está diretamente relacionada ao controle do eixo HPA e ao controle emocional, através de conexões com áreas límbicas como amígdala, córtex pré-frontal e núcleo acumbens (FANSELOW; DONG, 2010; LODGE; GRACE, 2011).

Vimos que a separação maternal não afeta a dinâmica desenvolvimental dos animais em relação à densidade, contudo fêmeas e machos apresentam respostas diferentes ao estresse quanto à densidade no subículo. É possível que essa diferença seja reflexo do ligeiro aumento na média dos machos SMP15, já que fêmeas apresentam médias muito próximas entre seus os grupos. O aumento do poder estatístico é necessário para elucidar se esse declive é significativo ou apenas um artefato. O aumento de apoptose de micróglia após a separação materna já foi relatado tanto no núcleo acumbens (Chocyk *et al.*, 2011) no P15 quanto no hipocampo em adultos (Gong *et al.*, 2018). O subículo do hipocampo faz conexões com estruturas límbicas, incluindo a amígdala e núcleo leito da estria terminal, além de ter projeções para núcleos hipotalâmicos (FANSELOW; DONG, 2010; HERMAN *et al.*, 2005). Diferenças na densidade, junto com a possível ativação desigual de micróglia, podem ter impacto importante na maturação de sinapses, modificando circuitos sinápticos envolvidos na resposta emocional e no feedback negativo do eixo HPA.

Micróglia de fêmeas e machos também respondem ao estresse na infância de maneira diferente em relação à média do número e comprimento de ramificação. No P15, animais previamente separados apresentam a média desses parâmetros muito parecida, então a forma como eles estão no basal, naive, é responsável pela diferença entre os sexos. É possível que a resposta imediata ao estresse não seja apenas no sentido de aumento ou diminuição de ramificação, mas sim uma mudança no desenvolvimento fisiológico da micróglia para uma morfologia específica, talvez mais responsiva. Isso parece ser particularmente verdade para fêmeas. Isso também explicaria a mudança no dimorfismo sexual em relação à dinâmica desenvolvimental etológica e após o estresse. A diferença etológica é a de fêmeas apresentarem aumento no comprimento das ramificações entre o P15 e o P30, mas nas fêmeas separadas esse aumento ocorreria precocemente.

Já no P30 as médias de número de ramificações dos grupos separados são bem distintas, enquanto o basal, naive, é parecido. Isso sugere que possivelmente a separação maternal gera uma modificação a longo prazo nesse parâmetro, especialmente em fêmeas P30, mas novamente

é preciso aumentar o poder de análise. Isso faz com que haja uma diferença na dinâmica desenvolvimental entre os sexos não vista anteriormente. Seria interessante investigar o perfil de citocinas dos animais para saber se estão em um estado mais pró-inflamatório ou mesmo se há mudança no padrão de citocinas em machos, em que vimos pouca diferença em relação aos parâmetros de ramificação

Para entendermos a resposta de micróglia ao estresse de maneira mais detalhada, fizemos a análise celular pelo plugin FracLac (ImageJ), em que obtivemos dados de complexidade celular, formato celular (proporção de amplitude) e densidade celular (tamanho celular). Nela, vimos que fêmeas P15 separadas diminuem sua complexidade e tamanho celular, compatível com uma morfologia mais responsiva, mas apresentam morfologia próxima de machos, desramificada, típica de transição. Isso pode ser explicado pois a micróglia tipo reativa descrita no desenvolvimento por Dalmau apresenta processos rechonchudos e largos (Dalmau *et al.*, 1998). Assim, é possível que a célula desramificada seja uma passagem dessa para uma mais ameboide. Interessante notar que a modificação nas fêmeas SM P15 continua até o P30. Micróglia de fêmeas naive diminuem seu tamanho entre o P15 e P30, mas a separação materna faz com que o tamanho celular já seja menor no P15, novamente refletindo na diferença etológica inicialmente encontrada.

Apenas com a interpretação dos parâmetros isolados, poderíamos propor que o estresse na infância adianta a maturação de micróglia hipocámpica de fêmeas. Contudo, a visualização da dispersão das médias dos animais quanto a seus parâmetros morfológicos mostra que, de fato, fêmeas P15 e P30 separadas na infância apresentam morfologia muito semelhante, mas ambas ainda apresentam morfologia diferente do grupo Naive P30. Isso indica que a separação materna na infância modifica a morfologia de micróglia de camundongos fêmeas no curto e longo prazo, diferenciando-as do seu trajeto desenvolvimental.

Esse trabalho foi feito com camundongos transgênicos CX3CR1:GFP heterozigotos. Apesar desse modelo ser bem consolidado, é importante ressaltar que essa molécula está presente em todos os monócitos, podendo marcar também monócitos infiltrados (Jung *et al.*, 2000; Wolf *et al.*, 2013). Em situações não-patológicas e com pouco ou nenhum dano à barreira hematoencefálica a grande maioria de monócitos no cérebro são células microgliciais, que mantêm sua população por replicação (Ginhoux *et al.*, 2010). Portanto, acreditamos que esse modelo é útil para o estudo de imagem de micróglia, refletindo majoritariamente esse grupo celular. Ainda, não vimos evidência de grandes infiltrados de monócitos, uma vez que vimos redução da densidade de micróglia em machos e não vimos nenhum impacto do estresse crônico nesse parâmetro.

Trabalhos anteriores mostraram que a separação materna na infância modifica o perfil de citocinas na idade adulta e promove o *priming* de micróglia (Delpech *et al.*, 2016; Han *et al.*,

2019; Catale *et al.*, 2020). Seria proveitoso investigar se as micróglia de machos e fêmeas estão mais sensibilizadas ao estresse ou a inflamações já no início da adolescência. Ademais, é imprescindível entender a relação entre a morfologia, o perfil de citocina e a atividade fagocitária das micróglia em ambos os sexos. Bollinger e colaboradores identificaram que tanto o estresse agudo quanto crônico diminui a quantidade de micróglia vigilantes de ratas mas também diminuem sua atividade e perfil pró-inflamatório (Bollinger, Bergeon Burns and Wellman, 2016). Ademais, estudos com transcriptoma de micróglia adultas descreveram um perfil de ativação mais relacionado à atividade anti-inflamatória em micróglia de fêmeas (Kodama and Gan, 2019). Esses resultados levantam questionamentos sobre o papel das micróglia no perfil de resiliência ou de maior resistência à diversos protocolos de estresse, inclusive o de separação maternal descrito em nosso laboratório (PEÑA; NESTLER; BAGOT, 2019, Reis *et al.*; Menezes *et al.*, em preparação).

Por fim, esse trabalho fortifica parte da hipótese original, uma vez que o estresse por separação maternal modifica a morfologia de micróglia apenas de fêmeas logo após o estresse crônico, possivelmente com modificações perdurando até o início da adolescência. Em contrapartida, ele rejeita parte da hipótese no que diz respeito às modificações de densidade de micróglia hipocampais em resposta ao estresse. Ainda, vimos um importante dimorfismo sexual não só na resposta ao estresse, mas também no próprio desenvolvimento fisiológico dos animais. Nosso trabalho realça a importância da inclusão de modelos fêmeas na investigação de processos fisiológicos e em estudos translacionais envolvendo micróglia e estresse. A partir de nossos resultados encorajamos futuros trabalhos com técnicas mais detalhadas pra investigar *se e como* as diferenças encontradas aqui influenciam a função e desenvolvimento do hipocampo ventral de camundongos e sua resposta ao estresse pós-natal.

## 6. CONCLUSÃO

O presente trabalho mostra que 1) micróglia do hipocampo ventral de machos e fêmeas apresentam dinâmica desenvolvimental distinta entre o P15 e o P30; e 2) apenas micróglia do hipocampo ventral de fêmeas são modificadas pelo estresse por separação maternal.

## 7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Aisa, B. *et al.* (2007) 'Cognitive impairment associated to HPA axis hyperactivity after maternal separation in rats', *Psychoneuroendocrinology*, 32(3), pp. 256–266. doi: 10.1016/j.psyneuen.2006.12.013.
- Aksić, M. *et al.* (2013) 'Long-term effects of the maternal deprivation on the volume and number of neurons in the rat neocortex and hippocampus', *Acta Neurobiologiae Experimentalis*, 73(3), pp. 394–403.
- Alfarez, D. N., Joëls, M. and Krugers, H. J. (2003) 'Chronic unpredictable stress impairs long-term potentiation in rat hippocampal CA1 area and dentate gyrus in vitro', *European Journal of Neuroscience*, 17(9), pp. 1928–1934. doi: 10.1046/j.1460-9568.2003.02622.x.
- Antony, J. M. *et al.* (2011) 'Endogenous microglia regulate development of embryonic cortical precursor cells', *Journal of Neuroscience Research*, 89(3), pp. 286–298. doi: 10.1002/jnr.22533.
- Atladóttir, H. Ó. *et al.* (2010) 'Maternal infection requiring hospitalization during pregnancy and autism spectrum disorders', *Journal of Autism and Developmental Disorders*, 40(12), pp. 1423–1430. doi: 10.1007/s10803-010-1006-y.
- Banqueri, M. *et al.* (2019) 'Early life stress by repeated maternal separation induces long-term neuroinflammatory response in glial cells of male rats', *Stress*. Taylor & Francis, 22(5), pp. 563–570. doi: 10.1080/10253890.2019.1604666.
- Barden, N. *et al.* (2006) 'Analysis of single nucleotide polymorphisms in genes in the chromosome 12Q24.31 region points to P2RX7 as a susceptibility gene to bipolar affective disorder', *American Journal of Medical Genetics, Part B: Neuropsychiatric Genetics*, 141(4), pp. 374–382. doi: 10.1002/ajmg.b.30303.
- Bilimoria, P. M. and Stevens, B. (2015) 'Microglia function during brain development: New insights from animal models', *Brain Research*. Elsevier, pp. 7–17. doi: 10.1016/j.brainres.2014.11.032.
- Bollinger, J. L., Bergeon Burns, C. M. and Wellman, C. L. (2016) 'Differential effects of stress on microglial cell activation in male and female medial prefrontal cortex', *Brain, Behavior, and Immunity*. Elsevier Inc., 52, pp. 88–97. doi: 10.1016/j.bbi.2015.10.003.
- Bondar, N. P., Lepeshko, A. A. and Reshetnikov, V. V. (2018) 'Effects of Early-Life Stress on Social and Anxiety-Like Behaviors in Adult Mice: Sex-Specific Effects', *Behavioural Neurology*. Hindawi, 2018, pp. 1–13. doi: 10.1155/2018/1538931.
- De Bosscher, K., Vanden Berghe, W. and Haegeman, G. (2003) 'The interplay between the glucocorticoid receptor and nuclear factor- $\kappa$ B or activator protein-1: Molecular mechanisms for gene repression', *Endocrine Reviews*, 24(4), pp. 488–522. doi: 10.1210/er.2002-0006.
- Bowman, R. E., Beck, K. D. and Luine, V. N. (2003) 'Chronic stress effects on memory: Sex differences in performance and monoaminergic activity', *Hormones and Behavior*, 43(1), pp. 48–

59. doi: 10.1016/S0018-506X(02)00022-3.

Brito, I. and Haddad, H. (2017) 'A formulação do conceito de homeostase por Walter Cannon', *Filosofia e História da Biologia*, 12(1), pp. 99–113.

Brown, A. S. (2012) 'Epidemiologic studies of exposure to prenatal infection and risk of schizophrenia and autism', *Developmental Neurobiology*, 72(10), pp. 1272–1276. doi: 10.1002/dneu.22024.

Butovsky, O. *et al.* (2014) 'Identification of a unique TGF- $\beta$ -dependent molecular and functional signature in microglia', *Nature Neuroscience*, 17(1), pp. 131–143. doi: 10.1038/nn.3599.

Carrion, V. G. *et al.* (2010) 'Reduced hippocampal activity in youth with posttraumatic stress symptoms: An fMRI study', *Journal of Pediatric Psychology*, 35(5), pp. 559–569. doi: 10.1093/jpepsy/jsp112.

Carrion, V. G., Weems, C. F. and Reiss, A. L. (2007) 'Stress predicts brain changes in children: A pilot longitudinal study on youth stress, posttraumatic stress disorder, and the hippocampus', *Pediatrics*, 119(3), pp. 509–516. doi: 10.1542/peds.2006-2028.

Catale, C. *et al.* (2020) 'Microglial Function in the Effects of Early-Life Stress on Brain and Behavioral Development', *Journal of Clinical Medicine*, 9(2), p. 468. doi: 10.3390/jcm9020468.

Chen, S. K. *et al.* (2010) 'Hematopoietic origin of pathological grooming in Hoxb8 mutant mice', *Cell*. Elsevier Ltd, 141(5), pp. 775–785. doi: 10.1016/j.cell.2010.03.055.

Chocyk, A. *et al.* (2011) 'Maternal separation affects the number, proliferation and apoptosis of glia cells in the substantia nigra and ventral tegmental area of juvenile rats', *Neuroscience*, 173, pp. 1–18. doi: 10.1016/j.neuroscience.2010.11.037.

Chrousos, G. P. and Gold, P. W. (1992) 'The Concepts of Stress and Stress System Disorders: Overview of Physical and Behavioral Homeostasis', *JAMA: The Journal of the American Medical Association*, 267(9), pp. 1244–1252. doi: 10.1001/jama.1992.03480090092034.

Dalmau, I. *et al.* (1998) 'Development of microglia in the postnatal rat hippocampus', *Hippocampus*, 8(5), pp. 458–474. doi: 10.1002/(SICI)1098-1063(1998)8:5<458::AID-HIPO6>3.0.CO;2-N.

Daviu, N. *et al.* (2019) 'Neurobiological links between stress and anxiety', *Neurobiology of Stress*. Elsevier, 11(August), p. 100191. doi: 10.1016/j.ynstr.2019.100191.

Delpech, J. C. *et al.* (2015) 'Microglia in neuronal plasticity: Influence of stress', *Neuropharmacology*, 96(PA), pp. 19–28. doi: 10.1016/j.neuropharm.2014.12.034.

Delpech, J. C. *et al.* (2016) 'Early life stress perturbs the maturation of microglia in the developing hippocampus', *Brain, Behavior, and Immunity*, 57, pp. 79–93. doi: 10.1016/j.bbi.2016.06.006.

Diorio, D., Viau, V. and Meaney, M. J. (1993) 'The role of the medial prefrontal cortex (cingulate gyrus) in the regulation of hypothalamic-pituitary-adrenal responses to stress', *Journal of*

*Neuroscience*, 13(9), pp. 3839–3847. doi: 10.1523/jneurosci.13-09-03839.1993.

Diz-Chaves, Y. *et al.* (2012) 'Prenatal stress causes alterations in the morphology of microglia and the inflammatory response of the hippocampus of adult female mice', *Journal of Neuroinflammation*, 9, pp. 1–10. doi: 10.1186/1742-2094-9-71.

Diz-Chaves, Y. *et al.* (2013) 'Prenatal stress increases the expression of proinflammatory cytokines and exacerbates the inflammatory response to LPS in the hippocampal formation of adult male mice', *Brain, Behavior, and Immunity*. Elsevier Inc., 28, pp. 196–206. doi: 10.1016/j.bbi.2012.11.013.

Fabricius, K., Wörtwein, G. and Pakkenberg, B. (2008) 'The impact of maternal separation on adult mouse behaviour and on the total neuron number in the mouse hippocampus', *Brain Structure and Function*, 212(5), pp. 403–416. doi: 10.1007/s00429-007-0169-6.

Favoretto, C. A. *et al.* (2020) 'Chronic social defeat stress: Impacts on ethanol-induced stimulation, corticosterone response, and brain monoamine levels', *Journal of Psychopharmacology*, 34(4), pp. 412–419. doi: 10.1177/0269881119900983.

Feldman, S. and Weidenfeld, J. (1998) 'The excitatory effects of the amygdala on hypothalamo-pituitary- adrenocortical responses are mediated by hypothalamic norepinephrine, serotonin, and CRF-41', *Brain Research Bulletin*, 45(4), pp. 389–393. doi: 10.1016/S0361-9230(97)00384-5.

Felitti, V. J. *et al.* (2019) 'Relationship of Childhood Abuse and Household Dysfunction to Many of the Leading Causes of Death in Adults: The Adverse Childhood Experiences (ACE)Study', *American Journal of Preventive Medicine*. Elsevier Inc., 56(6), pp. 774–786. doi: 10.1016/j.amepre.2019.04.001.

Ferrer, I. *et al.* (1990) 'Naturally occurring cell death in the cerebral cortex of the rat and removal of dead cells by transitory phagocytes', *Neuroscience*, 39(2), pp. 451–458. doi: 10.1016/0306-4522(90)90281-8.

Figueiredo, H. F. *et al.* (2003) 'Stress Integration after Acute and Chronic Predator Stress: Differential Activation of Central Stress Circuitry and Sensitization of the Hypothalamo-Pituitary-Adrenocortical Axis', *Endocrinology*, 144(12), pp. 5249–5258. doi: 10.1210/en.2003-0713.

Forrest, C. M. *et al.* (2012) 'Prenatal activation of Toll-like receptors-3 by administration of the viral mimetic poly(I:C) changes synaptic proteins, N-methyl-D-aspartate receptors and neurogenesis markers in offspring', *Molecular Brain*, 5(1), pp. 1–12. doi: 10.1186/1756-6606-5-22.

Frank, M. G. *et al.* (2012) 'Glucocorticoids mediate stress-induced priming of microglial pro-inflammatory responses', *Brain, Behavior, and Immunity*. Elsevier Inc., 26(2), pp. 337–345. doi: 10.1016/j.bbi.2011.10.005.

Frankola, K. A. *et al.* (2010) 'Neurobiology of Learning and Memory Effects of early rearing conditions on cognitive performance in prepubescent male and female rats', *Neurobiology of*



- Learning and Memory*. Elsevier Inc., 94(1), pp. 91–99. doi: 10.1016/j.nlm.2010.04.005.
- Frost, J. L. and Schafer, D. P. (2016) 'Microglia: Architects of the Developing Nervous System', *Trends in Cell Biology*. Elsevier Ltd, 26(8), pp. 587–597. doi: 10.1016/j.tcb.2016.02.006.
- Gallo, E. A. G. *et al.* (2017) 'Childhood maltreatment preceding depressive disorder at age 18 years: A prospective Brazilian birth cohort study', *Journal of Affective Disorders*. Elsevier B.V., 217(April), pp. 218–224. doi: 10.1016/j.jad.2017.03.065.
- Gamaro, G. D. *et al.* (2003) 'Effects of chronic variate stress on feeding behavior and on monoamine levels in different rat brain structures', *Neurochemistry International*, pp. 107–114. doi: 10.1016/S0197-0186(02)00080-3.
- Gildawie, K. R. *et al.* (2020a) 'Sex differences in prefrontal cortex microglia morphology: Impact of a two-hit model of adversity throughout development', *Neuroscience Letters*. Elsevier B.V., 738(August), p. 135381. doi: 10.1016/j.neulet.2020.135381.
- Gildawie, K. R. *et al.* (2020b) 'Sex differences in prefrontal cortex microglia morphology: Impact of a two-hit model of adversity throughout development', *Neuroscience Letters*. Elsevier B.V., 738(September), p. 135381. doi: 10.1016/j.neulet.2020.135381.
- Ginhoux, F. *et al.* (2010) 'Fate mapping analysis reveals that adult microglia derive from primitive macrophages', *Science*, 330(6005), pp. 841–845. doi: 10.1126/science.1194637.
- Giovanoli, S. *et al.* (2016) 'Prenatal immune activation causes hippocampal synaptic deficits in the absence of overt microglia anomalies', *Brain, Behavior, and Immunity*. Elsevier Inc., 55, pp. 25–38. doi: 10.1016/j.bbi.2015.09.015.
- Giridharan, V. V. *et al.* (2019) 'Maternal deprivation increases microglial activation and neuroinflammatory markers in the prefrontal cortex and hippocampus of infant rats', *Journal of Psychiatric Research*. Elsevier, 115(May), pp. 13–20. doi: 10.1016/j.jpsychires.2019.05.001.
- Gong, Y. *et al.* (2018) 'Dynamic changes in hippocampal microglia contribute to depressive-like behavior induced by early social isolation', *Neuropharmacology*, 135, pp. 223–233. doi: 10.1016/j.neuropharm.2018.03.023.
- Gracia-Rubio, I. *et al.* (2016) 'Maternal separation induces neuroinflammation and long-lasting emotional alterations in mice', *Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry*. Elsevier Inc., 65, pp. 104–117. doi: 10.1016/j.pnpbp.2015.09.003.
- Gray, J. D. *et al.* (2014) 'Hippocampal gene expression changes underlying stress sensitization and recovery', *Molecular Psychiatry*. Nature Publishing Group, 19(11), pp. 1171–1178. doi: 10.1038/mp.2013.175.
- Guma, E. *et al.* (2021) 'Early or Late Gestational Exposure to Maternal Immune Activation Alters Neurodevelopmental Trajectories in Mice: An Integrated Neuroimaging, Behavioral, and Transcriptional Study', *Biological Psychiatry*. Elsevier Inc, pp. 24–26. doi:

10.1016/j.biopsycho.2021.03.017.

Guneykaya, D. *et al.* (2018) 'Transcriptional and Translational Differences of Microglia from Male and Female Brains', *Cell Reports*, 24(10), pp. 2773-2783.e6. doi: 10.1016/j.celrep.2018.08.001.

Gunnar, M. R. and Cheatham, C. L. (2003) 'Brain and behavior interface: Stress and the developing brain', *Infant Mental Health Journal*, 24(3), pp. 195–211. doi: 10.1002/imhj.10052.

Han, Y. *et al.* (2019) 'Minocycline inhibits microglial activation and alleviates depressive-like behaviors in male adolescent mice subjected to maternal separation', *Psychoneuroendocrinology*. Elsevier, 107(December 2018), pp. 37–45. doi: 10.1016/j.psyneuen.2019.04.021.

Hart, H., Rubia, K. and Angiulli, A. D. (2012) 'Neuroimaging of child abuse : a critical review', *Frontiers in human neuroscience*, 6(March), pp. 1–24. doi: 10.3389/fnhum.2012.00052.

Hava, G. *et al.* (2006) 'Alterations in behavior in adult offspring mice following maternal inflammation during pregnancy', *Developmental Psychobiology*, 48(2), pp. 162–168. doi: 10.1002/dev.20116.

He, T. *et al.* (2020) 'Effect of early life stress on anxiety and depressive behaviors in adolescent mice', *Brain and Behavior*, 10(3), pp. 1–10. doi: 10.1002/brb3.1526.

Heine, V. M. *et al.* (2004) 'Suppressed proliferation and apoptotic changes in the rat dentate gyrus after acute and chronic stress are reversible', *European Journal of Neuroscience*, 19(1), pp. 131–144. doi: 10.1046/j.1460-9568.2003.03100.x.

Herman, J. P. *et al.* (2005) 'Limbic system mechanisms of stress regulation: Hypothalamo-pituitary-adrenocortical axis', *Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry*, 29(8), pp. 1201–1213. doi: 10.1016/j.pnpbp.2005.08.006.

Hu, P. *et al.* (2020) 'Chronic stress induces maladaptive behaviors by activating corticotropin-releasing hormone signaling in the mouse oval bed nucleus of the stria terminalis', *Journal of Neuroscience*, 40(12), pp. 2519–2537. doi: 10.1523/JNEUROSCI.2410-19.2020.

Huang, X. (2019) 'Silent synapse: A new player in visual cortex critical period plasticity', *Pharmacological Research*. Elsevier, 141(July 2018), pp. 586–590. doi: 10.1016/j.phrs.2019.01.031.

Inta, D. *et al.* (2017) 'Microglia activation and schizophrenia: Lessons from the effects of minocycline on postnatal neurogenesis, neuronal survival and synaptic pruning', *Schizophrenia Bulletin*, 43(3), pp. 493–496. doi: 10.1093/schbul/sbw088.

Jaaro-Peled, H. *et al.* (2009) 'Neurodevelopmental mechanisms of schizophrenia: understanding disturbed postnatal brain maturation through neuregulin-1-ErbB4 and DISC1', *Trends in Neurosciences*, 32(9), pp. 485–495. doi: 10.1016/j.tins.2009.05.007.

Jacobson, L. and Sapolsky, R. (1991) 'The role of the hippocampus in feedback regulation of the hypothalamic-pituitary-adrenocortical axis', *Endocrine Reviews*, 12(2), pp. 118–134. doi:

10.1210/edrv-12-2-118.

Johnson, F. K. and Kaffman, A. (2018) 'Early life stress perturbs the function of microglia in the developing rodent brain: New insights and future challenges', *Brain, Behavior, and Immunity*, 69, pp. 18–27. doi: 10.1016/j.bbi.2017.06.008.

Jung, S. *et al.* (2000) 'Analysis of Fractalkine Receptor CX 3 CR1 Function by Targeted Deletion and Green Fluorescent Protein Reporter Gene Insertion', *Molecular and Cellular Biology*, 20(11), pp. 4106–4114. doi: 10.1128/mcb.20.11.4106-4114.2000.

Karst, H. *et al.* (2005) 'Mineralocorticoid receptors are indispensable for nongenomic modulation of hippocampal glutamate transmission by corticosterone', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 102(52), pp. 19204–19207. doi: 10.1073/pnas.0507572102.

Kessler, R. C. *et al.* (2010) 'Childhood adversities and adult psychopathology in the WHO world mental health surveys', *British Journal of Psychiatry*, 197(5), pp. 378–385. doi: 10.1192/bjp.bp.110.080499.

Kim, I. *et al.* (2015) 'A postnatal peak in microglial development in the mouse hippocampus is correlated with heightened sensitivity to seizure triggers', *Brain and Behavior*, 5(12), pp. 1–4. doi: 10.1002/brb3.403.

Kirsten, T. B. *et al.* (2010) 'Prenatal lipopolysaccharide reduces social behavior in male offspring', *NeuroImmunoModulation*, 17(4), pp. 240–251. doi: 10.1159/000290040.

De Kloet, E. R., Joëls, M. and Holsboer, F. (2005) 'Stress and the brain: From adaptation to disease', *Nature Reviews Neuroscience*, 6(6), pp. 463–475. doi: 10.1038/nrn1683.

Knuesel, I. *et al.* (2014) 'Maternal immune activation and abnormal brain development across CNS disorders', *Nature Reviews Neurology*. Nature Publishing Group, 10(11), pp. 643–660. doi: 10.1038/nrneurol.2014.187.

Kodama, L. and Gan, L. (2019) 'Do Microglial Sex Differences Contribute to Sex Differences in Neurodegenerative Diseases?', *Trends in Molecular Medicine*. Elsevier Ltd, pp. 741–749. doi: 10.1016/j.molmed.2019.05.001.

Kopec, A. M. *et al.* (2018) 'Microglial dopamine receptor elimination defines sex-specific nucleus accumbens development and social behavior in adolescent rats', *Nature Communications*, 9(1). doi: 10.1038/s41467-018-06118-z.

Koyama, R. and Ikegaya, Y. (2015) 'Microglia in the pathogenesis of autism spectrum disorders', *Neuroscience Research*. Elsevier Ireland Ltd and Japan Neuroscience Society, pp. 1–5. doi: 10.1016/j.neures.2015.06.005.

Krasemann, S. *et al.* (2017) 'The TREM2-APOE Pathway Drives the Transcriptional Phenotype of Dysfunctional Microglia in Neurodegenerative Diseases', *Immunity*. Elsevier Inc., 47(3), pp. 566-

581.e9. doi: 10.1016/j.immuni.2017.08.008.

Kuhn, C. M. and Schanberg, S. M. (1998) 'Responses to maternal separation: Mechanisms and mediators', *International Journal of Developmental Neuroscience*, 16(3–4), pp. 261–270. doi: 10.1016/S0736-5748(98)00034-3.

Lemoult, J. *et al.* (2019) 'Meta-Analysis: Exposure to Early Life Stress and Risk for Depression in Childhood and Adolescence', *Journal of the American Academy of Child & Adolescent Psychiatry*. American Academy of Child & Adolescent Psychiatry. doi: 10.1016/j.jaac.2019.10.011.

Levine, S. (1994) 'The ontogeny of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis. The influence of maternal factors', *Annals of the New York Academy of Sciences*, 746, pp. 275–288. doi: 10.1111/j.1749-6632.1994.tb39245.x.

Lim, S. H. *et al.* (2013) 'Neuronal synapse formation induced by microglia and interleukin 10', *PLoS ONE*, 8(11), pp. 1–13. doi: 10.1371/journal.pone.0081218.

Lucae, S. *et al.* (2006) 'P2RX7, a gene coding for a purinergic ligand-gated ion channel, is associated with major depressive disorder', *Human Molecular Genetics*, 15(16), pp. 2438–2445. doi: 10.1093/hmg/ddl166.

Lupien, S. J. *et al.* (2009) 'Effects of stress throughout the lifespan on the brain, behaviour and cognition', *Nature Reviews Neuroscience*, 10(6), pp. 434–445. doi: 10.1038/nrn2639.

Magariños, A. M. and McEwen, B. S. (1995) 'Stress-induced atrophy of apical dendrites of hippocampal CA3c neurons: Comparison of stressors', *Neuroscience*, 69(1), pp. 83–88. doi: 10.1016/0306-4522(95)00256-l.

de Matos, L. O. *et al.* (2018) 'L-Dopa treatment during perinatal development leads to different behavioral alterations in female vs. male juvenile Swiss mice', *Pharmacology Biochemistry and Behavior*. Elsevier Inc, p. #pagerange#. doi: 10.1016/j.pbb.2018.08.002.

Matos, L. O. de *et al.* (2020) 'Early postnatal L-Dopa treatment causes behavioral alterations in female vs. male young adult Swiss mice', *Neuropharmacology*. Elsevier, 170(January), p. 108047. doi: 10.1016/j.neuropharm.2020.108047.

McEwen, B. S. *et al.* (2015) 'Mechanisms of stress in the brain', *Nature Neuroscience*, 18(10), pp. 1353–1363. doi: 10.1038/nn.4086.

Monroy, E., Hernández-Torres, E. and Flores, G. (2010) 'Maternal separation disrupts dendritic morphology of neurons in prefrontal cortex, hippocampus, and nucleus accumbens in male rat offspring', *Journal of Chemical Neuroanatomy*, 40(2), pp. 93–101. doi: 10.1016/j.jchemneu.2010.05.005.

Morrison, H. *et al.* (2017) 'Quantitative microglia analyses reveal diverse morphologic responses in the rat cortex after diffuse brain injury', *Scientific Reports*. Springer US, 7(1), pp. 1–12. doi: 10.1038/s41598-017-13581-z.

- Mosser, C. *et al.* (2017) 'Microglia in CNS development : Shaping the brain for the future', *Progress in Neurobiology*, 150, pp. 1–20. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.pneurobio.2017.01.00>.
- Nelson, L. H., Warden, S. and Lenz, K. M. (2017a) 'Sex differences in microglial phagocytosis in the neonatal hippocampus', *Brain, Behavior, and Immunity*. Elsevier Inc., 64, pp. 11–22. doi: 10.1016/j.bbi.2017.03.010.
- Nelson, L. H., Warden, S. and Lenz, K. M. (2017b) 'Sex differences in microglial phagocytosis in the neonatal hippocampus', *Brain, Behavior, and Immunity*. Elsevier Inc., 64, pp. 11–22. doi: 10.1016/j.bbi.2017.03.010.
- Nikkheslat, N. *et al.* (2020) 'Childhood trauma, HPA axis activity and antidepressant response in patients with depression', *Brain, Behavior, and Immunity*. Elsevier, 87(July 2019), pp. 229–237. doi: 10.1016/j.bbi.2019.11.024.
- Nikodemova, M. *et al.* (2015) 'Microglial numbers attain adult levels after undergoing a rapid decrease in cell number in the third postnatal week', *Journal of Neuroimmunology*. Elsevier B.V., 278, pp. 280–288. doi: 10.1016/j.jneuroim.2014.11.018.
- Nishi, M., Horii-Hayashi, N. and Sasagawa, T. (2014) 'Effects of early life adverse experiences on the brain: Implications from maternal separation models in rodents', *Frontiers in Neuroscience*, 8(8 JUN), pp. 1–6. doi: 10.3389/fnins.2014.00166.
- Pan, X. *et al.* (2018) 'Salivary cortisol in post-traumatic stress disorder: A systematic review and meta-analysis', *BMC Psychiatry*. BMC Psychiatry, 18(1), pp. 1–10. doi: 10.1186/s12888-018-1910-9.
- Paolicelli, R. C. *et al.* (2011) 'Synaptic Pruning by Microglia Is Necessary for Normal Brain Development', 333(September), pp. 1456–1459.
- Paolicelli, R. C. and Ferretti, M. T. (2017) 'Function and dysfunction of microglia during brain development: Consequences for synapses and neural circuits', *Frontiers in Synaptic Neuroscience*, 9(MAY), pp. 1–17. doi: 10.3389/fnsyn.2017.00009.
- Parker, K. J., Schatzberg, A. F. and Lyons, D. M. (2003) 'Neuroendocrine aspects of hypercortisolism in major depression', *Hormones and Behavior*, 43(1), pp. 60–66. doi: 10.1016/S0018-506X(02)00016-8.
- Peña, C. J., Nestler, E. J. and Bagot, R. C. (2019) 'Environmental programming of susceptibility and resilience to stress in adulthood in male mice', *Frontiers in Behavioral Neuroscience*, 13(March), pp. 1–13. doi: 10.3389/fnbeh.2019.00040.
- Piirainen, S. *et al.* (2021) 'Microglia contribute to social behavioral adaptation to chronic stress', *Glia*, (June), pp. 1–15. doi: 10.1002/glia.24053.
- Plotsky, P. M. and Meaney, M. J. (1993) 'Early, postnatal experience alters hypothalamic corticotropin-releasing factor (CRF) mRNA, median eminence CRF content and stress-induced

- release in adult rats', *Molecular Brain Research*, 18(3), pp. 195–200. doi: 10.1016/0169-328X(93)90189-V.
- Pocock, J. M. and Kettenmann, H. (2007) 'Neurotransmitter receptors on microglia', *Trends in Neurosciences*, 30(10), pp. 527–535. doi: 10.1016/j.tins.2007.07.007.
- Reiser, S. J. *et al.* (2014) 'Adverse childhood experiences and health anxiety in adulthood', *Child Abuse and Neglect*. Elsevier Ltd, 38(3), pp. 407–413. doi: 10.1016/j.chiabu.2013.08.007.
- Reshef, R. *et al.* (2014) 'Microglia and their CX3CR1 signaling are involved in hippocampal- but not olfactory bulb-related memory and neurogenesis', *Brain Behavior and Immunity*. Elsevier Inc., 41, pp. 239–250. doi: 10.1016/j.bbi.2014.04.009.
- Riem, M. M. E. *et al.* (2015) '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*, 27(2), pp. 507–520. doi: 10.1017/S0954579415000127.
- Rohde, P. *et al.* (2013) 'Key characteristics of major depressive disorder occurring in childhood, adolescence, emerging adulthood, and adulthood', *Clinical Psychological Science*, 1(1), pp. 41–53. doi: 10.1177/2167702612457599.
- Roque, A., Ochoa-Zarzosa, A. and Torner, L. (2016) 'Maternal separation activates microglial cells and induces an inflammatory response in the hippocampus of male rat pups, independently of hypothalamic and peripheral cytokine levels', *Brain, Behavior, and Immunity*, 55, pp. 39–48. doi: 10.1016/j.bbi.2015.09.017.
- Ros-Bernal, F. *et al.* (2011) 'Microglial glucocorticoid receptors play a pivotal role in regulating dopaminergic neurodegeneration in parkinsonism', *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 108(16), pp. 6632–6637. doi: 10.1073/pnas.1017820108.
- Russell, G. and Lightman, S. (2019) 'The human stress response', *Nature Reviews Endocrinology*. Springer US, 15(9), pp. 525–534. doi: 10.1038/s41574-019-0228-0.
- Saavedra, L. M. *et al.* (2021) 'Long-term activation of hippocampal glial cells and altered emotional behavior in male and female adult rats after different neonatal stressors', *Psychoneuroendocrinology*, 126(February). doi: 10.1016/j.psyneuen.2021.105164.
- Sapolsky, R. M. and Meaney, M. J. (1986) 'Maturation of the adrenocortical stress response: neuroendocrine control mechanisms and the stress hyporesponsive period.', *Brain research*, 396(1), pp. 64–76. doi: 10.1016/s0006-8993(86)80190-1.
- Schafer, D. P. *et al.* (2012) 'Microglia Sculpt Postnatal Neural Circuits in an Activity and Complement-Dependent Manner', *Neuron*. Elsevier Inc., 74(4), pp. 691–705. doi: 10.1016/j.neuron.2012.03.026.
- Schwarz, J. M., Hutchinson, M. R. and Bilbo, S. D. (2011) 'Early-life experience decreases drug-

induced reinstatement of morphine CPP in adulthood via microglial-specific epigenetic programming of anti-inflammatory IL-10 expression', *Journal of Neuroscience*, 31(49), pp. 17835–17847. doi: 10.1523/JNEUROSCI.3297-11.2011.

Schwarz, J. M., Sholar, P. W. and Bilbo, S. D. (2012) 'Sex differences in microglial colonization of the developing rat brain', *Journal of Neurochemistry*, 120(6), pp. 948–963. doi: 10.1111/j.1471-4159.2011.07630.x.

Selye, H. (1936) 'A Syndrome produced by Diverse Nocuous Agents', *Nature*, 1936(I), p. 32.

Shi, L. *et al.* (2003) 'Maternal influenza infection causes marked behavioral and pharmacological changes in the offspring', *Journal of Neuroscience*, 23(1), pp. 297–302. doi: 10.1523/jneurosci.23-01-00297.2003.

Shin, S. Y. *et al.* (2016) '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*. IBRO, 316, pp. 221–231. doi: 10.1016/j.neuroscience.2015.12.041.

Sierra, A. *et al.* (2010) 'Microglia shape adult hippocampal neurogenesis through apoptosis-coupled phagocytosis', *Cell Stem Cell*. Elsevier Inc., 7(4), pp. 483–495. doi: 10.1016/j.stem.2010.08.014.

Sominsky, L., Luca, S. De and Spencer, S. J. (2018) 'Microglia : Key players in neurodevelopment and neuronal plasticity', *International Journal of Biochemistry and Cell Biology*, 94(December 2017), pp. 56–60.

Souza, B. R., Romano-Silva, M. A. and Tropepe, V. (2011) 'Dopamine D2 Receptor Activity Modulates Akt Signaling and Alters GABAergic Neuron Development and Motor Behavior in Zebrafish Larvae', *Journal of Neuroscience*, 31(14), pp. 5512–5525. doi: 10.1523/JNEUROSCI.5548-10.2011.

Stewart, J., Kühnemann, S. and Rajabi, H. (1991) 'Neonatal Exposure to Gonadal Hormones Affects the Development of Monoamine Systems in Rat Cortex', *Journal of Neuroendocrinology*, 3(1), pp. 85–93. doi: 10.1111/j.1365-2826.1991.tb00244.x.

Sugama, S. *et al.* (2013) 'Corticosteroids limit microglial activation occurring during acute stress', *Neuroscience*, 232, pp. 13–20. doi: 10.1016/j.neuroscience.2012.12.012.

Sugama, S. and Kakinuma, Y. (2021) 'Noradrenaline as a key neurotransmitter in modulating microglial activation in stress response', *Neurochemistry International*. Elsevier Ltd, 143(August 2020), p. 104943. doi: 10.1016/j.neuint.2020.104943.

Sullivan, R. M. and Gratton, A. (1999) 'Lateralized effects of medial prefrontal cortex lesions on neuroendocrine and autonomic stress responses in rats', *Journal of Neuroscience*, 19(7), pp. 2834–2840. doi: 10.1523/jneurosci.19-07-02834.1999.

- Takatsuru, Y. *et al.* (2015) 'Early-life stress increases the motility of microglia in adulthood', *Journal of Physiological Sciences*, 65(2), pp. 187–194. doi: 10.1007/s12576-015-0361-z.
- Torres-Platas, S. G. *et al.* (2014) 'Evidence for increased microglial priming and macrophage recruitment in the dorsal anterior cingulate white matter of depressed suicides', *Brain, Behavior, and Immunity*. Elsevier Inc., 42, pp. 50–59. doi: 10.1016/j.bbi.2014.05.007.
- Tractenberg, S. G. *et al.* (2016) 'An overview of maternal separation effects on behavioural outcomes in mice: Evidence from a four-stage methodological systematic review', *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*. Elsevier Ltd, 68, pp. 489–503. doi: 10.1016/j.neubiorev.2016.06.021.
- Tremblay, M. Ě., Lowery, R. L. and Majewska, A. K. (2010) 'Microglial interactions with synapses are modulated by visual experience', *PLoS Biology*, 8(11). doi: 10.1371/journal.pbio.1000527.
- Tynan, R. J. *et al.* (2010) 'Chronic stress alters the density and morphology of microglia in a subset of stress-responsive brain regions', *Brain Behavior and Immunity*. Elsevier Inc., 24(7), pp. 1058–1068. doi: 10.1016/j.bbi.2010.02.001.
- Ueno, M. *et al.* (2013) 'Layer v cortical neurons require microglial support for survival during postnatal development', *Nature Neuroscience*. Nature Publishing Group, 16(5), pp. 543–551. doi: 10.1038/nn.3358.
- De Vries, G. J. (2004) 'Minireview: Sex Differences in Adult and Developing Brains: Compensation, Compensation, Compensation', *Endocrinology*, 145(3), pp. 1063–1068. doi: 10.1210/en.2003-1504.
- Winkler, Z. *et al.* (2017) 'Impaired microglia fractalkine signaling affects stress reaction and coping style in mice', *Behavioural Brain Research*. Elsevier, 334(March), pp. 119–128. doi: 10.1016/j.bbr.2017.07.023.
- Wolf, Y. *et al.* (2013) 'Microglia, seen from the CX3CR1 angle', *Frontiers in Cellular Neuroscience*, 7(March), pp. 1–9. doi: 10.3389/fncel.2013.00026.
- Yirmiya, R., Rimmerman, N. and Reshef, R. (2015) 'Depression as a Microglial Disease', *Trends in Neurosciences*. Elsevier Ltd, 38(10), pp. 637–658. doi: 10.1016/j.tins.2015.08.001.
- Yoon Seong, K. and Tong H., J. (2006) 'Microglia, major player in the brain inflammation: Their roles in the pathogenesis of Parkinson's disease', *Experimental and Molecular Medicine*, 38(4), pp. 333–347. Available at:  
<https://doi.org/10.1038/emm.2006.40>  
<http://10.0.4.14/emm.2006.40>  
[http://www.embase.com/search/results?subaction=viewrecord&from=export&id=L44351428%5Cnhttp://www.e-emm.org/article/article\\_files/\(333-347\)EMM064-review.pdf](http://www.embase.com/search/results?subaction=viewrecord&from=export&id=L44351428%5Cnhttp://www.e-emm.org/article/article_files/(333-347)EMM064-review.pdf).
- Young, K. and Morrison, H. (2018) 'Quantifying microglia morphology from photomicrographs of immunohistochemistry prepared tissue using imagej', *Journal of Visualized Experiments*, 2018(136), pp. 1–9. doi: 10.3791/57648.



Zetter, M. A. *et al.* (2021) 'Microglial synaptic pruning on axon initial segment spines of dentate granule cells: Sexually dimorphic effects of early-life stress and consequences for adult fear response', *Journal of Neuroendocrinology*, 33(7), pp. 1–17. doi: 10.1111/jne.12969.

Zhou, L. *et al.* (2020) 'Long-term maternal separation potentiates depressive-like behaviours and neuroinflammation in adult male C57/BL6J mice', *Pharmacology Biochemistry and Behavior*. Elsevier, 196(May), p. 172953. doi: 10.1016/j.pbb.2020.172953.

## ANEXO 1: Lista de comandos do Image J para análise de imagens.

### Análise de Densidade

- Para binarizar a imagem marcada com GFP: *Image > Adjust > Threshold > Default* (mais informações: <https://imagej.net/plugins/auto-threshold> ) e em seguida *Process > Binary > Convert to Mask* (mais informações: <https://imagej.nih.gov/ij/docs/guide/146-29.html>);
- Na imagem de DAPI, utilize a ferramenta “*freehand selection*” para delimitar a sub-região desejada.
- Para personalizar a análise da região: *Analyze > Set Measurements*. Marque “Area”.
- Para medir a área: *Analyze > Measure*. Passe o resultado para uma planilha.
- Para passar a delimitação de subárea para a imagem com GFP binarizada: *Edit > Selection > Restore Selection*
- Para quantificar as micróglias presentes na área delimitada: *Analyze > Analyze particles > tamanho: 6 -  $\infty$   $\mu$ m; circularidade: 0-1*. Passe o resultado para uma planilha.

### Análise de Ramificações - Esqueletonização

- Para sobrepor diferentes imagens de série Z: *Image > Stacks > X Project > Maximum Intensity Projection*. Utilizamos 6 “stacks”.
- Para ajustar o brilho e contraste, de modo a deixar as ramificações em evidência: *Image>Adjust>Brightness/contrast*;
- Apague as ramificações das células que não apresentam o soma na imagem com a borracha;
- Use o filtro “Unsharp Mask” para aumentar ainda mais o contraste: *Process>Filters>Unsharp Mask > raio do pixel: 1; peso da máscara 0,6*;
- Para retirar o ruído feito pelo filtro, use: *Process > Noise > Despeckle*;
- Para converter a imagem para binária: *Image>adjust>threshold*;
- Se ainda tiverem pixels soltos ao fundo, use: *Process > noise > Despeckle*; *Process > binary*; e *Process > noise > remove outliers* (raio 2; threshold 50). Salve a imagem para a análise seguinte.
- Para esqueletonizar a imagem: *Process > binary > Skeletonize* (<https://imagej.net/plugins/analyze-skeleton/>);
- Para analisar: *Plugins > Skeleton > Analyze Skeleton*; copie os resultados e informações de ramificação para uma planilha.
- Faça uma triagem dos dados para eliminar possíveis fragmentos soltos que restaram. Meça vários fragmentos e faça a média deles. Ordene a planilha de resultados pela coluna de “maximum branch length” e apague aqueles abaixo da média de fragmentos. Ordene a

planilha de informações de ramificação por “branch length” e apague aqueles abaixo da média de fragmentos.

### **Análise de Fractal**

- Pegue a imagem salva no passo anterior à esqueletonização ou repita o protocolo até o passo de remover os outliers;
- Selecione uma micróglia com a ferramenta de retângulo. Atenção: o retângulo precisa ter as mesmas dimensões para todos os animais. Anote as dimensões ou fixe o retângulo na imagem com Analyze > Tools > ROI Manager > Add;
- Abra o plugin FracLac; (mais informações: <https://imagej.nih.gov/ij/plugins/fraclac/FLHelp/StartUpScreen.htm>)
- Ajuste BC > num. G: 4 e marque “hull and circle”;
- Para analisar: Scan. Salve a tabela de resultados e de “Hull and Circle” em uma planilha.

## ANEXO 2 – TABELAS ESTATÍSTICAS

TABELA 2

<i>Densidade</i>									
Sexo	Grupo	<i>Subículo</i>				<i>Giro denteado</i>			
		<i>n</i>	<i>Média</i>	<i>Mediana</i>	<i>SD</i>	<i>n</i>	<i>Média</i>	<i>Mediana</i>	<i>SD</i>
<i>Fêmeas</i>	<i>Naive P15</i>	3	300,09	297,94	28,73	3	451,36	388,02	153,75
	<i>SM P15</i>	3	340,59	349,61	49,73	4	425,58	421,39	43,35
	<i>Naive P30</i>	4	326,75	312,92	71,17	4	402,98	399,94	12,56
	<i>SM P30</i>	3	342,31	328,52	124,35	3	411,75	399,15	87,64
<i>Machos</i>	<i>Naive P15</i>	4	456,91	489,22	119,44	4	568,51	584,43	110,79
	<i>SM P15</i>	6	373,94	364,79	19,97	6	492,32	465,21	71,68
	<i>Naive P30</i>	3	249,15	230,12	61,53	4	359,2	357,64	21,14
	<i>SM P30</i>	4	233,37	235,25	15,52	4	286,38	299,79	36,54
Sexo	Grupo	<i>CA1</i>				<i>CA2/3</i>			
		<i>n</i>	<i>Média</i>	<i>Mediana</i>	<i>SD</i>	<i>n</i>	<i>Média</i>	<i>Mediana</i>	<i>SD</i>
<i>Fêmeas</i>	<i>Naive P15</i>	3	398,81	388,82	75,36	3	409,26	436,94	147,41
	<i>SM P15</i>	4	389,9	390,17	22,1	4	313,95	310,15	37,25
	<i>Naive P30</i>	4	371,72	369,99	28,10	4	311,32	304,52	32,42
	<i>SM P30</i>	3	379,21	394,56	85,73	3	304,53	319,41	55
<i>Machos</i>	<i>Naive P15</i>	4	568,51	584,43	106,90	4	485,16	463,88	60,57
	<i>SM P15</i>	6	492,32	465,21	91,10	6	426,16	414,17	106,68
	<i>Naive P30</i>	4	359,2	357,64	64,93	4	319,39	295,48	56,41
	<i>SM P30</i>	4	286,38	299,79	21,04	4	282,51	273,42	61,61

**Tabela 2: Dados estatísticos da análise de densidade.** Dados utilizados para as análises de densidade expostas nas figuras 8A-D e 11A-D. Em todos os casos foi utilizado o teste Two-Way ANOVA/Tukey.

TABELA 3

<b>Dinâmica desenvolvimental - densidade</b>													
Sexo	Grupo	Normalizado por	<b>Subículo</b>					<b>Giro Denteado</b>					
			Média	Mediana	SD	t	p	Média	Mediana	SD	t	p	
F	Naive P30	Naive P15	8,884	4,28	23,716								
M	Naive P30	Naive P15	-45,47	-49,635	13,466	3,515	0,017	-36,818	-37,091	3,718	11,241	<0,001	
F	SM P30	SM P15	0,501	-3,546	36,508								
M	SM P30	SM P15	-37,592	-37,089	4,149	3,283	0,022	-41,832	-39,107	7,422	3,548	0,016	

Sexo	Grupo	Normalizado por	<b>CA1</b>					<b>CA2/3</b>					
			Média	Mediana	SD	t	p	Média	Mediana	SD	t	P	
F	Naive P30	Naive P15	-6,79	-7,225	7,045								
M	Naive P30	Naive P15	-34,131	-34,969	12,133	3,897	0,008	-23,931	-25,594	7,921	23 <sup>i</sup>	0,2 <sup>i</sup>	
F	SM P30	SM P15	-2,742	1,196	21,989								
M	SM P30	SM P15	-6,79	-7,225	7,045	3,283	0,022	-3,002	1,737	17,518	2,552	0,051	

**Tabela 3: Dados estatísticos da análise do dimorfismo sexual da dinâmica desenvolvimental - densidade.** Dados utilizados para as análises de densidade expostas nas figuras 8E e 14A-B. Todos os grupos apresentam distribuição paramétrica e resultados do teste T Student, salvo CA2/3 Macho Naive P30. <sup>i</sup>resultados do Mann-Whitney Rank Sum Test.

TABELA 4

<b>Resposta ao estresse - densidade</b>													
Sexo	Grupo	Normalizado por	<b>Subículo</b>					<b>Giro Denteado</b>					
			Média	Mediana	SD	t	p	Média	Mediana	SD	t	p	
F	SM P15	Naive P15	13,498	16,504	16,574								
M	SM P15	Naive P15	-18,159	-20,162	4,371	4,664	0,002	-13,401	-18,17	12,609	1,029	0,333	
F	SM P30	Naive P30	4,761	0,541	38,056								
M	SMP30	Naive P30	-6,334	-5,58	6,227	0,592	0,58	-20,273	-1654%	10,173	1,854	0,123	

Sexo	Grupo	Normalizado por	<b>CA1</b>					<b>CA2/3</b>					
			Média	Mediana	SD	t	p	Média	Mediana	SD	t	p	
F	SM P15	Naive P15	-2,233	-2,167	5,542								
M	SM P15	Naive P15	-13,98	-9,93	17,024	1,311	0,226	-12,162	-14,633	21,988	-0,944	0,373	
F	SM P30	Naive P30	2,015	6,146	23,064								
M	SMP30	Naive P30	-19,974	-21,326	5,97	1,881	0,119	-11,549	-14,394	19,291	0,657	0,54	

**Tabela 4: Dados estatísticos da análise do dimorfismo sexual em resposta ao estresse - densidade.** Dados utilizados para as análises de densidade expostas nas figuras 11E-F. Todos os grupos apresentam distribuição paramétrica e resultados do teste T Student.

TABELA 5

<b>Ramificações</b>		<b>N° Ramificações/Cel</b>				<b>Comprimento Ramificações/Cel</b>			
Sexo	Grupo	<i>n</i>	<i>Média</i>	<i>Mediana</i>	<i>SD</i>	<i>n</i>	<i>Média</i>	<i>Mediana</i>	<i>SD</i>
Fêmeas	Naive P15	3	29,16	28,88	5,91	3	140,48	138,28	28,37
	SM P15	3	33,28	35,57	4,44	3	210,40	222,19	25,16
	Naive P30	5	36,19	36,00	8,02	5	290,17	246,39	113,89
	SM P30	4	26,35	26,94	5,00	4	216,55	238,62	53,37
Machos	Naive P15	4	37,32	38,55	5,23	4	194,63	197,49	37,72
	SM P15	4	30,07	30,55	5,32	4	183,71	195,99	51,14
	Naive P30	5	37,22	35,67	7,12	5	235,76	234,78	29,99
	SM P30	4	40,00	42,50	8,01	4	204,94	209,46	37,48

**Tabela 5: Dados estatísticos da análise de ramificações.** Dados utilizados para as análises de

ramificação expostas nas figuras 9A-B e 12A-B. Em todos os casos foi utilizado o teste Two-Way ANOVA/Tukey.

TABELA 6

<b>Dinâmica desenvolvimental - Ramificações</b>												
Sexo	Grupo	Normalizado por	<b>N° Ramificações/Cel</b>				<b>Comprimento Ramificações/Cel</b>					
			<i>Média</i>	<i>Mediana</i>	<i>SD</i>	<i>t</i>	<i>p</i>	<i>Média</i>	<i>Mediana</i>	<i>SD</i>	<i>t</i>	<i>p</i>
F	Naive P30	Naive P15	24,12	23,46	27,49	1,63	0,14	106,56	75,40	81,08	2,32	0,05
M	Naive P30	Naive P15	-0,25	-4,42	19,07			21,13	20,63	15,41		
F	SM P30	SM P15	-20,85	-19,06	15,03	-3,52	0,01	3,46	14,01	25,50	-0,50	0,64
M	SM P30	SM P15	33,01	41,33	26,65			11,56	14,01	20,40		

**Tabela 6: Dados estatísticos da análise do dimorfismo sexual da dinâmica desenvolvimental-ramificações.** Dados utilizados para as análises de ramificações expostas nas figuras 9C e 14C-D. Todos os grupos apresentam distribuição paramétrica e resultados do teste T Student.

TABELA 7

Resposta ao estresse - Ramificações												
Sexo	Grupo	Normalizado por	N° Ramificações/Cel					Comprimento Ramificações/Cel				
			Média	Mediana	SD	t	p	Média	Mediana	SD	t	p
F	SM P15	Naive P15	14,14	21,982	15,214	2,999	0,03	48,999	58,17	17,152		
M	SM P15	Naive P15	-19,414	-18,135	14,258			-5,609	0,696	26,274	3,1	0,027
F	SM P30	Naive P30	-27,212	-25,568	13,821	-2,711	0,035	-25,37	-17,765	18,392		
M	SMP30	Naive P30	7,458	14,174	21,526			-13,07	-11,156	15,897	1,012	0,351

**Tabela 7: Dados estatísticos da análise do dimorfismo sexual em resposta ao estresse – ramificações.** Dados utilizados para as análises de densidade expostas na figura 12C. Todos os grupos apresentam distribuição paramétrica e resultados do teste T Student.

TABELA 8

Morfologia (FracLac)													
Sexo	Grupo	n	Complexidade			Proporção de Amplitude				Tamanho			
			Média	Mediana	SD	n	Média	Mediana	SD	n	Média	Mediana	SD
Fêmeas	Naive P15	3	1,56	1,54	0,048	3	1,44	1,41	0,075	3	0,106	0,102	0,018
	SM P15	3	1,49	1,49	0,030	3	1,58	1,69	0,214	3	0,082	0,080	0,006
	Naive P30	5	1,52	1,52	0,014	5	1,38	1,36	0,101	5	0,076	0,074	0,008
	SM P30	4	1,49	1,48	0,017	4	1,64	1,58	0,260	4	0,080	0,082	0,009
Machos	Naive P15	4	1,55	1,55	0,028	4	1,39	1,40	0,111	4	0,097	0,097	0,010
	SM P15	5	1,54	1,52	0,040	5	1,41	1,48	0,162	5	0,100	0,093	0,016
	Naive P30	5	1,53	1,53	0,039	5	1,42	1,43	0,040	5	0,084	0,089	0,008
	SM P30	4	1,55	1,53	0,066	4	1,66	1,65	0,378	4	0,092	0,090	0,010

**Tabela 8: Dados estatísticos da análise de morfologia.** Dados utilizados para as análises morfológicas expostas nas figuras 10A-C e 13A-C. Em todos os casos foi utilizado o teste Two-Way ANOVA/Tukey

TABELA 9

<b>Dinâmica Desenvolvimental - Morfologia</b>												
Sexo	Grupo	Normalizado por	Complexidade					Proporção de Amplitude				
			Média	Mediana	SD	t	p	Média	Mediana	SD	t	p
F	Naive P30	Naive P15	-1,044	-2,69	4,314	0,214	0,836	-4,398	-5,249	6,991	-2,058	0,074
M	Naive P30	Naive P15	-1,52	-1,55	2,482			2,571	3,29	2,911		
F	SM P30	SM P15	-0,142	-0,44	1,106	0,484	0,646	3,646	0,37	16,466	-0,91	0,398
M	SM P30	SM P15	0,93	-0,157	4,29			18,009	17,44	26,914		

Sexo	Grupo	Normalizado por	Tamanho				
			Média	Mediana	SD	t	p
F	Naive P30	Naive P15	-28,04	-29,918	8,005	-2,929	0,019
M	Naive P30	Naive P15	-13,221	-8,08	7,995		
F	SM P30	SM P15	-2,15	0,783	10,428	0,759	0,477
M	SM P30	SM P15	-7,652	-10,11	10,084		

**Tabela 9: Dados estatísticos da análise do dimorfismo sexual da dinâmica desenvolvimental - Morfologia.** Dados utilizados para as análises morfológicas expostas nas figuras 10D e 14E-F. Todos os grupos apresentam distribuição paramétrica e resultados do teste T Student

TABELA 10

<b>Resposta ao estresse - Morfologia</b>												
Sexo	Grupo	Normalizado por	Complexidade					Proporção de Amplitude				
			Média	Mediana	SD	t	p	Média	Mediana	SD	t	p
F	SM P15	Naive P15	-4,579	-4,479	1,89	-1,968	0,097	-23,025	-24,859	6,072	-2,514	0,046
M	SM P15	Naive P15	-1,173	-2,066	2,576			2,654	-469%	16,586		
F	SM P30	Naive P30	-2,059	-2,35	1,085	-1,506	0,183	4,671	7,804	11,15	-0,56	0,596
M	SMP30	Naive P30	1,285	0,194	4,305			9,24	6,339	11,93		

Sexo	Grupo	Normalizado por	Tamanho				
			Média	Mediana	SD	t	p
F	SM P15	Naive P15	9,658	17,338	14,844	18 <sup>i</sup>	0,25 <sup>i</sup>
M	SM P15	Naive P15	1,542	6,70	11,677		
F	SM P30	Naive P30	18,885	15,129	18,887	0,126	0,904
M	SMP30	Naive P30	16,826	16,26	26,644		



**Tabela 10: Dados estatísticos da análise do dimorfismo sexual em resposta ao estresse - Morfologia.**

Dados utilizados para as análises morfológicas expostas na figura 13D. Todos os grupos apresentam distribuição paramétrica e resultados do teste T Student, salvo SP15. <sup>i</sup>resultados do Mann-Whitney Rank Sum Test