

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

Instituto de Ciências Biológicas

Departamento de Fisiologia e Farmacologia

ANA LUIZA DE ARAUJO LIMA REIS

**AVALIAÇÃO DOS EFEITOS MORFOFISIOLÓGICOS E COMPORTAMENTAIS
EM CAMUNDONGOS JOVENS SUBMETIDOS AO ESTRESSE POR SEPARAÇÃO
MATERNAL EM CONJUNTO COM ADMINISTRAÇÃO DE L-DOPA**

Belo Horizonte, MG

2021

Ana Luiza de Araujo Lima Reis

**AVALIAÇÃO DOS EFEITOS MORFOFISIOLÓGICOS E COMPORTAMENTAIS
EM CAMUNDONGOS JOVENS SUBMETIDOS AO ESTRESSE POR SEPARAÇÃO
MATERNAL EM CONJUNTO COM ADMINISTRAÇÃO DE L-DOPA**

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

Orientador: Prof. Dr. Bruno Rezende de Souza

Belo Horizonte, MG

2021

043

Reis, Ana Luiza de Araujo Lima.

Avaliação dos efeitos morfofisiológicos e comportamentais em camundongos jovens submetidos ao estresse por separação maternal em conjunto com administração de L-Dopa [manuscrito] / Ana Luiza de Araujo Lima Reis. - 2021.

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

Orientador: Prof. Dr. Bruno Resende de Souza.

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

1. Fisiologia. 2. Estresse. 3. Dopamina. 4. Transtornos do Neurodesenvolvimento. I. Souza, Bruno de Rezende de. II. Universidade Federal de Minas Gerais. Instituto de Ciências Biológicas. III. 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 TESE N° 346 DE ANA LUIZA DE ARAÚJO LIMA REIS

"Avaliação dos Efeitos Morfofisiológicos e Comportamentais em Camundongos Jovens Submetidos ao Estresse por Separação Maternal em Conjunto com Administração de L-dopa"

ANA LUIZA DE ARAÚJO LIMA REIS

Tese de Doutorado defendida e aprovada, no dia **31 de agosto de 2021**, pela Banca Examinadora constituída pelos seguintes professores:

Prof. Dr. Fabrício de Araújo Moreira, ICB/UFMG
Prof. Dr. Victor Rodrigues Santos, ICB/UFMG
Prof. Dr. Rodrigo Grassi Oliveira, Aarhus University - Dinamarca
Prof. Dr. Pablo Pandolfo, UFF
Prof. Dr. Bruno Rezende de Souza, ICB/UFMG - Orientador

Belo Horizonte, 31 de agosto de 2021.

Assinatura dos membros da banca examinadora:



Documento assinado eletronicamente por **Fabrício de Araújo Moreira, Professor do Magistério Superior**, em 05/09/2021, às 23:56, 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 **Victor Rodrigues Santos, Professor do Magistério Superior**, em 09/09/2021, às 14:59, 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 11/10/2021, às 13:18, 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 **Rodrigo Grassi de Oliveira, Usuário Externo**, em 21/10/2021, às 18:28, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do Decreto nº

AGRADECIMENTOS

O tão sonhado final do doutorado chegou e eu não sei se fico feliz com essa conquista ou se fico triste pela sensação de estar acabando. Vivi uma relação de amor e ódio com a vida acadêmica durante esses anos e vou contar um pouco do meu caminho até aqui.

Com 8 anos eu decidi que iria ser bióloga e cientista. Falei iria porque nessa idade eu não sabia, mas sou cientista desde que nasci! Sempre muito questionadora, buscava respostas para as minhas perguntas, elaborava minhas “hipóteses” e assim eu fui crescendo como a criança difícil e de personalidade forte que na verdade era só uma cientista em formação que não aceitava uma resposta padrão como resposta.

Os anos foram passando e chegou a época do vestibular. Meu sonho profissional ainda continuava o mesmo e entrei na tão sonhada universidade federal. Era exatamente a que eu queria? Não! Eu queria UFMG, mas na época passei primeiro na UFOP e, ainda bem, meus pais me convenceram a fazer a matrícula. Hoje sou extremamente grata à UFOP, aos professores e aos amigos que fiz em Ouro Preto. Agradeço muito ao professor Breno, que foi meu orientador durante meus 3 anos de iniciação científica, e aos meus amigos da Bio 10.2 e do Laboratório de Biologia e Tecnologia de Microrganismos, eles estavam ao meu lado no início da minha jornada acadêmica.

Ao terminar minha graduação e depois de muito pesquisar, decidi que iria fazer meu mestrado em Neurociências na UFMG. Fui atrás de possíveis orientadores e encontrei o professor Bruno. Mande um e-mail, ele me respondeu e no mês seguinte já estava me mudando para Belo Horizonte.

Passar pela pós-graduação não é um processo fácil para ninguém, mas para mim foi extremamente desafiador. O início do meu mestrado foi uma das fases mais difíceis que passei, tive que aprender a lidar com a frustração dos experimentos que deram errados, me adaptar a um lugar e a uma demanda nova que me exigia habilidades emocionais que eu não tinha. Quis jogar tudo para o alto e desistir, mas fui persistente.

Troquei a neurociência pela fisiologia, eu precisava entender a interação dos outros sistemas fisiológicos com o sistema nervoso. Apesar de estar satisfeita com a fisiologia, ainda sentia falta de algo que realmente me motivasse a continuar ali. Até que o Bruno me chamou para uma conversa e pude ser franca: não gostava do projeto, não estava satisfeita e não sabia lidar com o fato de nada ter dado certo e eu já tinha 1 ano de mestrado. Ali ele me deu uma oportunidade que creio que nenhum outro professor me daria, ele disse: Tira férias, pensa em

outro projeto, volta e me convence que vale a pena fazer! E assim eu fiz, voltei querendo estudar estresse e ele embarcou na minha ideia.

Se eu achei o mestrado desafiador, era porque eu não conhecia o doutorado que estava por vir. Os desafios do doutorado foram outros, tive que aprender a lidar com a incerteza do futuro, com questionamentos internos das minhas escolhas profissionais e com grandes problemas pessoais.

No meu primeiro ano de doutorado, minha tia/irmã que tem síndrome de down foi diagnosticada com câncer no endométrio, parei por um tempo meus experimentos para acompanhar todo o tratamento. No segundo ano, foi a vez da minha mãe receber o diagnóstico de câncer de mama e, mais uma vez precisei parar por um tempo meus experimentos para estar disponível para acompanhá-la nas diversas consultas, cirurgias e nas sessões de radioterapia. Nos meus últimos anos do doutorado, o mundo parou devido à pandemia do coronavírus e com meu doutorado não seria diferente. O que para mim iria durar alguns poucos meses, já se completam quase 1 ano e meio. Além da pandemia, ainda tive que lidar com mais um tratamento oncológico, dessa vez o do meu pai, que infelizmente faleceu há mais ou menos quatro meses. Agora lido com a frustração de não ter finalizado meu doutorado como eu gostaria, mas também sou grata por ter conseguido fazer o que foi possível em meio a tantos desafios e ainda manter o mínimo de saúde física e mental.

Manter a saúde mental não seria possível se eu não tivesse o orientador que eu tenho. Bruno sempre foi muito compreensivo, me apoiou em todas as minhas decisões, me permitiu viver experiências únicas como por exemplo a de participar do Programa de Incentivo à Formação de Docentes, que me fez enxergar o tanto que eu amo ensinar fisiologia, estive ao meu lado quando decidi seguir outros caminhos profissionais dentro da ciência e precisei abrir mão da minha bolsa e da nossa taxa de bancada. Bruno foi a peça fundamental para manter minha homeostase durante a pós-graduação. Aprendi muita ciência, fisiologia e neurociência com ele, mas também aprendi sobre cinema, política, filosofia, história, cultura, direitos humanos, respeito, empatia, liderança...

O Bruno é daqueles orientadores que eu gostaria que todos os alunos pudessem ter. Em uma de nossas discussões filosóficas durante as noites de experimentos no laboratório, estávamos discutindo o conceito de felicidade e ele falou que buscava a felicidade no momento presente e que no futuro, quando já estivesse aposentado, ficaria feliz ao ouvir as pessoas falarem: Foi do caralho conviver com o Bruno! Acho que ele não precisa esperar a aposentadoria para ficar feliz com isso, porque hoje eu falo: Foi do caralho conviver com você todos esses anos Bruno!

Sou muito grata a todos os alunos e alunas que conviveram comigo durante esses anos. Laura, Luciana, Caio, Ana Flavia, Laila, Bia, Bruna, Muiara, Bruno, Alcione, Paula, Taciane... todas essas pessoas foram fundamentais, compartilharam comigo o dia a dia do trabalho, viram minhas crises de desespero quando tudo dava errado, passavam os dias e as noites no laboratório me apoiando e tornando o ambiente mais agradável. Compartilhamos momentos incríveis de risadas, fofocas e choros, a salinha da microscopia que o que o diga!

Agradeço a Pós-Graduação em Fisiologia e Farmacologia e ao departamento de Fisiologia da UFMG, e esse agradecimento se estende aos funcionários da secretaria, aos técnicos, principalmente Silvio e Samir que cuidaram tão bem dos meus animais, e também aos professores pela dedicação, discussões de artigos e por todo o conhecimento compartilhado. Aprendi muito mais do que fisiologia nesses 7 anos de UFMG!

Agradeço também as agências: CNPq, FAPEMIG, CAPES, ISN e PRPq que financiaram esse projeto de pesquisa.

Por fim, sou muito grata pelo apoio que sempre tive da minha família desde quando eu decidi sair de casa com 18 anos para estudar biologia na UFOP. Minha mãe, minha irmã e minha tia foram uma válvula de escape para os momentos mais difíceis e apesar de nunca entenderem bem exatamente o que eu faço, sempre me apoiaram e torceram por mim. E meu pai, a pessoa que mais me incentivou, apoiou e torceu pela minha vida profissional, tinha sonhos para mim muito maiores do que os meus. Se estivesse aqui, com certeza iria ser a pessoa mais feliz e por mais que eu não gostasse, ele fazia questão de contar para todas as pessoas que a filha dele iria ser doutora. Eu sinto muito pai, por você não estar aqui hoje para vivenciar mais essa conquista minha que eu dedico especialmente a você!

RESUMO

O estresse crônico no início da vida pode levar a alterações comportamentais geralmente associadas a muitos dos transtornos neuropsiquiátricos, incluindo transtorno de ansiedade e depressão. Vários destes transtornos surgem durante a adolescência, quando ocorre o remodelamento do cérebro. Esta é uma das razões pelas quais a prática de psiquiatria infantil / adolescente e abordagens preventivas ainda são um desafio. Por isso, investigamos os efeitos do estresse por separação maternal (MS) no comportamento de camundongos pré-púberes. Um dos desafios nos estudos de psiquiatria é o viés sexual na prevalência de alguns distúrbios mentais. Para abordar esta questão, utilizamos camundongos machos e fêmeas C57 / BL6. Com 4 semanas de idade, analisamos o comportamento dos animais através dos testes da caixa de atividade locomotora, teste de campo aberto, caixa claro/escuro, labirinto em cruz elevado, teste da alimentação suprimida pela novidade e teste de nado forçado. Vimos que o estresse pós-natal levou a um aumento do comportamento exploratório e locomotor de fêmeas e um aumento do comportamento tipo-ansioso e tipo-depressivo em machos. Além de diversos genes dopaminérgicos estarem associados à transtornos neuropsiquiátricos e do sistema dopaminérgico ser alvo de muitos dos tratamentos farmacológicos, sabe-se que o estresse crônico gera desequilíbrios na sinalização dopaminérgica. Então, investigamos se o aumento do tônus dopaminérgico através da administração de L-Dopa, em conjunto com o estresse por MS, amplifica ou reduz as consequências comportamentais em camundongos pré-púberes. Nós dividimos os camundongos em quatro grupos experimentais: tratados com solução salina (SAL); Grupo tratado com L-Dopa / Benserazida (DOPA); MS tratados diariamente com Salina (MS+SAL); e grupo tratado com L-Dopa / Benserazida durante a MS (MS+DOPA). Vimos que a administração de L-Dopa proporcionou uma menor aversão a ambientes mais aversivos em fêmeas e um aumento do comportamento de medo em machos. Também vimos que o aumento do tônus dopaminérgico durante o estresse pós-natal foi capaz de alterar os efeitos comportamentais do estresse e nossos resultados sugerem um dimorfismo sexual em resposta ao tratamento com L-Dopa durante o protocolo de separação maternal.

Palavras chave: Estresse, dopamina e neurodesenvolvimento.

ABSTRACT

Early life stress can lead to behavioral changes commonly associated with many of the neuropsychiatric disorders, including anxiety and depression. Several of these disorders appear during adolescence, when brain remodeling takes place. This is one of the reasons why the practice of child/adolescent psychiatry and preventive approaches is still a challenge. Therefore, we investigated the effects of maternal separation (MS) stress on the behavior of prepubertal mice. One of the challenges in psychiatry studies is the sexual bias in the prevalence of some mental disorders. To address this issue, we used C57 / BL6 male and female mice. At 4 weeks of age, we analyzed the behavior of the animals through locomotor activity box tests, open field test, light/dark box, elevated plus maze, novelty suppressed feeding test and forced swimming test. We have seen that postnatal stress led to an increase in exploratory and locomotor behavior in females and an increase in anxious-like and depressive-like behavior in males. In addition to the fact that several dopaminergic genes are associated with neuropsychiatric disorders and the dopaminergic system is the target of many pharmacological treatments, it is known that chronic stress generates imbalances in dopaminergic signaling. We then investigated whether increased dopaminergic tone through L-Dopa administration, in conjunction with MS stress, amplifies or reduces behavioral consequences in prepubertal mice. We divided the mice into four experimental groups: treated with saline solution (SAL); Group treated with L-Dopa / Benserazide (DOPA); MS treated daily with Saline (MS+SAL); and group treated with L-Dopa / Benserazide during MS (MS+DOPA). We saw that L-Dopa administration provided less aversion to more aversive environments in females and an increase in fearful behavior in males. We also saw that increased dopaminergic tone during postnatal stress was able to alter the behavioral effects of stress and our results suggest a sexual dimorphism in response to L-Dopa treatment during the maternal separation protocol.

Key words: Stress, dopamine and neurodevelopment.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: O eixo Hipotálamo-Hipófise-Adrenal, o sistema do estresse.....	19
Figura 2: Neurodesenvolvimento.....	23
Figura 3: Procedimento experimental 1.....	28
Figura 4: Fêmeas que passaram pelo protocolo de estresse crônico pós-natal mostram um aumento do comportamento locomotor e exploratório.....	30
Figura 5: Fêmeas e machos que passaram pelo protocolo de estresse crônico pós-natal diferem no número de rearings no teste da caixa de atividade locomotora.....	30
Figura 6: O estresse por separação maternal aumenta o comportamento exploratório de machos e fêmeas jovens.....	32
Figura 7: O estresse por separação maternal não altera o comportamento locomotor e exploratório de machos e fêmeas jovens no teste do campo aberto de forma sexualmente dimórfica.....	33
Figura 8: O estresse por separação maternal aumenta o comportamento tipo ansioso de machos jovens.....	34
Figura 9: Fêmeas e machos que passaram pelo protocolo de estresse crônico pós natal diferem no número de transições no teste da caixa claro/escuro.....	35
Figura 10: Machos MS apresentaram um aumento do comportamento tipo-ansioso no teste do labirinto em cruz elevado.....	37

Figura 11: Fêmeas e machos respondem ao estresse por MS de forma diferente no teste de labirinto em cruz elevado.....	38
Figura 12: Efeito do estresse por separação maternal no teste de alimentação suprimida pela novidade.....	39
Figura 13: Fêmeas e machos jovens não diferem no teste da alimentação suprimida pela novidade após a MS.....	40
Figura 14: O estresse crônico por MS aumentou o comportamento tipo-depressivo de animais machos mas não de fêmeas.....	41
Figura 15: Fêmeas e machos MS respondem de maneiras distintas ao estresse por MS no teste de nado forçado.....	42
Figura 16: Síntese de dopamina.....	51
Figura 17: Vias dopaminérgicas no cérebro humano	52
Figura 18: Cascata de sinalização dopaminérgica	54
Figura 19: Protocolo experimental 2.....	60
Figura 20: Fêmeas MS + DOPA apresentaram um aumento do comportamento locomotor.....	62
Figura 21: Efeito do estresse pós-natal juntamente com a administração de L-Dopa no teste do campo aberto.....	64
Figura 22: Efeito do estresse pós-natal juntamente com a administração de L-Dopa no comportamento tipo-ansioso.....	66
Figura 23: O estresse pós-natal juntamente com a administração de L-Dopa não mostrou alterações no teste do labirinto em cruz elevado em fêmeas.....	68

Figura 24: Efeitos do estresse pós-natal juntamente com a administração de L-Dopa de machos jovens no labirinto em cruz elevado.....	70
Figura 25: Efeito do estresse pós-natal juntamente com a administração de L-Dopa no comportamento tipo-impulsivo.....	72

LISTA DE ABREVIATURAS

Ac - Adenilato ciclase

ACTH - Corticotropina

AKT - Proteína Kinase B

BLA – Amígdala basolateral

cAMP - Adenosina monofosfato cíclica

CRH - Hormônio liberador de corticotropina

CRH 1 - Receptor 1 do hormônio liberador de corticotropina

DARPP-32 - Fosfoproteína Regulada por Dopamina de 32 kD

GR - Receptores de glicocorticoides

GSK3- β - Glicogênio Kinase Sintase 3 β

HPA - Eixo Hipotálamo – hipófise – adrenal

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

MR - Receptores de mineralocorticoides

MS – Separação maternal

MS + Dopa – Grupo separação maternal mais L-Dopa

MS + SAL – Grupo separação maternal mais salina

OMS – Organização Mundial da Saúde

PKA - Proteína kinase A

POMC - pró- opiomelanocortina

PP-1 - Proteína fosfatase 1

PVN - Núcleo Paraventricular

SAL – Grupo salina

VTA - Área Tegmental Ventral

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO	17
1. CAPÍTULO 1: CAMUNDONGOS JOVENS, FÊMEAS E MACHOS, SUBMETIDOS AO PROTOCOLO DE ESTRESSE POR SEPARAÇÃO MATERNAL APRESENTAM DIFERENTES ALTERAÇÕES COMPORTAMENTAIS.....	19
1.1.1 Estresse	19
1.1.2 Efeitos morfofisiológicos e comportamentais do estresse	22
1.1.3 Estresse durante o neurodesenvolvimento	23
1.2 JUSTIFICATIVA E HIPÓTESE.....	25
1.3 OBJETIVOS	26
1.3.1 Objetivo geral	26
1.3.2 Objetivos específicos	26
1.4 MATERIAIS E MÉTODOS.....	26
1.4.1 Animais experimentais.....	26
1.4.2 Protocolo de separação maternal.....	27
1.4.3 Testes de comportamento	27
1.4.3.1 Caixa de Atividade Locomotora	27
1.4.3.2 Campo Aberto	27
1.4.3.3 Caixa Claro-Escuro	28
1.4.3.4 Labirinto em Cruz Elevado	28
1.4.3.5 Alimentação suprimida pela novidade.....	28
1.4.3.6 Teste de Nado Forçado	29

1.4.4	Análise estatística	29
1.5	RESULTADOS.....	31
1.5.1	O estresse por MS aumenta a atividade exploratória e locomotora de fêmeas jovens, mas não de machos	31
1.5.2	O estresse crônico por MS gerou um aumento do número de rearings em animais fêmeas e machos jovens no teste de campo aberto	33
1.5.3	O estresse crônico pós-natal aumentou o comportamento tipo-ansioso de machos jovens no teste da caixa claro/escuro	35
1.5.4	Machos MS tiveram um aumento do comportamento tipo-ansioso no teste de labirinto em cruz elevado.....	37
1.5.5	Machos e fêmeas MS não tiveram alterações comportamentais no teste da alimentação suprimida pela novidade	40
1.5.6	Machos MS apresentam um aumento do comportamento tipo-depressivo no teste do nado forçado.....	42
1.6	DISCUSSÃO	45
1.7	CONCLUSÃO	50
2.	CAPÍTULO 2: O AUMENTO DO TÔNUS DOPAMINÉRGICO DURANTE O ESTRESSE PÓS-NATAL INTERFERIU NOS EFEITOS COMPORTAMENTAIS DO ESTRESSE	52
2.1.1	Estresse e neurotransmissores.....	52
2.1.2	Sistema dopaminérgico	52
2.1.3	Dopamina e neurodesenvolvimento	56
2.2	JUSTIFICATIVA E HIPÓTESE.....	59

2.3	OBJETIVOS	60
2.3.1	Geral	60
2.3.2	Específicos	60
2.4	MATERIAIS E MÉTODOS	60
2.4.1	Animais	60
2.4.2	Grupos experimentais e protocolo de separação maternal	61
2.4.3	Testes de comportamento	61
2.4.4	Análise estatística	61
2.5	RESULTADOS	63
2.5.1	O estresse por separação maternal juntamente com a administração de L-Dopa aumentou o comportamento locomotor de fêmeas, mas não de machos jovens	63
2.5.2	O estresse por separação maternal juntamente com a administração de L-Dopa aumentou o comportamento locomotor de fêmeas em ambientes menos aversivos 65	
2.5.3	Caixa claro/escuro	66
2.5.4	Labirinto em cruz elevado	69
2.5.5	Alimentação suprimida pela novidade	72
2.6	DISCUSSÃO	74
2.7	CONCLUSÃO	79
	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	81
	ANEXOS	98

INTRODUÇÃO

Os transtornos psiquiátricos têm sido intensamente discutidos nos últimos anos. Segundo a Organização Mundial da Saúde, em uma pesquisa realizada em 2017, 322 milhões de pessoas no mundo sofrem de depressão, o que corresponde a 4,4% da população mundial (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2017). No Brasil, a OMS estima que 5,8% da população é afetada pela depressão (ORGANIZAÇÃO PAN-AMERICANA DA SAÚDE, 2017). Ainda de acordo com a OMS, a depressão é a doença que mais gera incapacidade e afastamento do trabalho no mundo, sendo também a maior causa das mortes por suicídio, 800 mil casos por ano (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2017). Outra doença psiquiátrica que tem afetado grande parte da população mundial é o transtorno de ansiedade. Aproximadamente 264 milhões de pessoas no mundo sofrem com a doença, sendo o Brasil líder mundial nos casos, onde 9,3% da população brasileira é afetada pelo transtorno de ansiedade (ORGANIZAÇÃO PAN-AMERICANA DA SAÚDE, 2017). Muitas vezes, os primeiros sintomas de ansiedade começam a surgir ainda na infância, mas se tornam mais evidentes durante a adolescência, uma fase em que ocorre remodelação do cérebro e o neurodesenvolvimento ainda não está completo. Devido a essas questões, a prática psiquiátrica da criança e do adolescente ainda é um desafio. Além dos males para a saúde, a vida profissional e social dos doentes, os transtornos psiquiátricos geram grandes perdas para a economia mundial. Estima-se que, a cada ano, as consequências dos transtornos neuropsiquiátricos, tais como ansiedade e depressão, geram uma perda econômica de 1 trilhão de dólares para o mundo (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2016).

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

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

Porém, apesar de 90% da população sofrer com estresse crônico, aproximadamente 30% desta desenvolve algum transtorno mental ao longo da vida (STEEL et al., 2014). Desta forma, é fundamental compreender quais são os fatores envolvidos na predisposição ou na proteção dos indivíduos ao estresse crônico. Diversas evidências genéticas, farmacológicas e bioquímicas sustentam a hipótese do envolvimento de distúrbios da sinalização dopaminérgica em muitos dos transtornos neuropsiquiátricos (MONEY; STANWOOD, 2013; SOUZA et al., 2006; SOUZA; TROPEPE, 2011). Portanto, é possível que variações na funcionalidade do sistema dopaminérgico estejam envolvidas na susceptibilidade do indivíduo às consequências do estresse crônico. Neste estudo, investigamos os efeitos do aumento do tônus dopaminérgico durante o estresse por separação maternal, em camundongos fêmeas e machos pré-púberes.

1. CAPÍTULO 1: CAMUNDONGOS JOVENS, FÊMEAS E MACHOS, SUBMETIDOS AO PROTOCOLO DE ESTRESSE POR SEPARAÇÃO MATERNAL APRESENTAM DIFERENTES ALTERAÇÕES COMPORTAMENTAIS

1.1.1 Estresse

O estresse, como um fenômeno biológico, foi primeiramente descrito pelo endocrinologista canadense Hans Selye (1907 – 1982). Ele percebeu que muitos de seus pacientes apresentavam sintomas comuns como perda de peso, falta de apetite e diminuição da força muscular. A partir de então, como uma forma de entender melhor o que estava acontecendo com seus pacientes, Hans Selye submeteu animais experimentais à uma situação aversiva. Ele observou que organismos diferentes apresentam o mesmo padrão de resposta fisiológica para determinadas experiências sensoriais ou psicológicas que podem gerar efeitos nocivos em órgãos, tecidos ou processos metabólicos ou são percebidas como nocivas. Assim, Hans Selye definiu estresse como uma síndrome que se desenvolve a partir da adaptação do organismo a algum evento estressor (SELYE, 1936), ou seja, qualquer adaptação requerida ao organismo. Ainda segundo Hans Selye, a reação fisiológica em resposta à estímulos nocivos é dividida em três fases: uma fase inicial de alarme, na qual o organismo responde ao estímulo estressor; um período subsequente de resistência, onde o organismo se adapta às novas condições nas quais ele se encontra; uma fase final de exaustão, que ocorre quando há persistência do estressor, exaurindo a capacidade do organismo de responder a esse estímulo (SELYE, 1936). As alterações fisiológicas geradas em resposta ao estímulo estressor foram mais tarde ligadas à ativação do sistema nervoso autônomo e ao Eixo Hipotálamo-Hipófise-Adrenal (HPA) que serão discutidos mais adiante.

Hoje, estresse é definido como uma interrupção real ou prevista da homeostase do corpo provocado por fatores psicológicos, ambientais ou fisiológicos. O conceito de Hans Selye já era baseado no conceito de homeostase, ou seja, na ideia de que os seres vivos precisam manter os parâmetros de seu meio interno dentro de faixas preestabelecidas. Para responder aos estímulos externos, os organismos precisam variar seus parâmetros internos de forma a atender às demandas que lhes são postas. Este fenômeno de ajuste dos parâmetros internos é conhecido como alostase. A alostase, portanto, é o processo ativo de adaptação aos eventos estressores por meio de mediadores como o cortisol e os sistemas nervoso autônomo, metabólico e imunológico

que atuam em conjunto de forma não linear para manter a homeostase (STERLING; REASON, 1988; MCEWEN et al., 2015).

A resposta a um estímulo estressor ocorre mediante a ativação do sistema nervoso simpático e do eixo HPA, que alteram os níveis de diversos parâmetros fisiológicos de forma a permitir que o organismo lide com esse estímulo. Os principais efeitos imediatos da resposta fisiológica ao estímulo estressor são o aumento dos ritmos cardiovascular e respiratório e do metabolismo basal, combinados com a inibição da digestão, do crescimento, do sistema reprodutor e do sistema imunológico.

A ativação do sistema nervoso autônomo, conhecida como reação de luta ou fuga, descrita por Walter Cannon, provoca rápidas respostas nos seus órgãos alvo através de uma via direta, onde os neurônios liberam adrenalina e noradrenalina diretamente nos órgãos alvo, ou através de uma via indireta, onde ocorre o estímulo da região medular da glândula adrenal para produzir e liberar adrenalina na circulação sanguínea.

A ativação do eixo HPA, um eixo neuroendócrino, resulta em elevação dos glicocorticoides circulantes (Fig. 1). Ela acontece através da produção do hormônio liberador de corticotropina (CRH) e vasopressina pelas células parvocelulares do núcleo paraventricular hipotalâmico (PVN) em resposta ao estímulo estressor. Esses hormônios são secretados, no sistema porta hipotalâmico-hipofisário, culminando na produção de pró-opiomelanocortina (POMC) pela hipófise anterior. O POMC por sua vez é clivado, originando a corticotropina (ACTH) e outros hormônios. O ACTH cai na circulação sanguínea e atua no córtex da glândula adrenal, promovendo a produção de cortisol em humanos e corticoesterona em roedores (DE KLOET; JOËLS; HOLSBOER, 2005; LUPIEN et al., 2009). Os glicocorticoides se ligam tanto em receptores de glicocorticoides (GR) quanto em receptores mineralocorticoides (MR). Através da sua ligação covalente ao GR, ocorre uma mudança conformacional no complexo glicocorticoide-receptor possibilitando a sua translocação e ligação a regiões específicas da molécula de DNA, chamadas de Elementos da Resposta de Glicocorticoides, que regulam a expressão de diversos genes. Assim, os glicocorticoides promovem uma cascata de ações catabólicas nos tecidos periféricos, proporcionando uma resposta adequada ao evento estressor. Por fim, os glicocorticoides são responsáveis pelo controle da duração e magnitude da resposta ao estresse, fornecendo o feedback negativo no eixo HPA para retornar a um estado homeostático (BALE; EPPERSON, 2015).

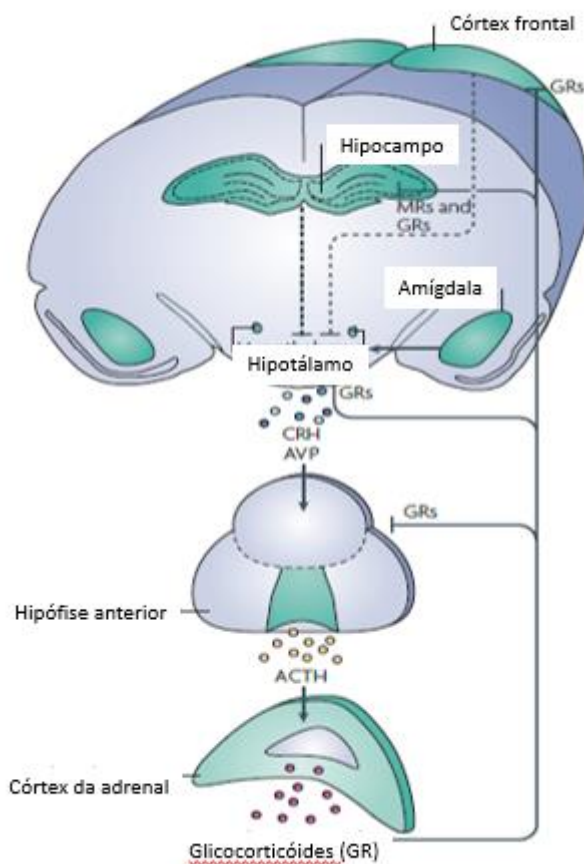


Figura 1: O eixo Hipotálamo-Hipófise-Adrenal, o sistema do estresse. Em resposta a um evento estressor, neurônios do hipotálamo liberam o hormônio CRH que age estimulando corticotrofos da adenohipófise a liberar ACTH. O ACTH por sua vez, cai na corrente sanguínea e age no córtex da glândula adrenal aumentando a liberação de glicocorticóides. 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 e o córtex pré-frontal, que regulam negativamente o eixo HPA, em contrapartida, a amígdala estimula esse eixo (Adaptado de LUPIEN et al., 2009).

Embora Hans Selye tenha sido o pioneiro no estudo das respostas fisiológicas a um estímulo estressor, sendo o precursor dos estudos de estresse biológico, ele não chegou a considerar as diferenças individuais dos organismos e nem considerou respostas diferentes aos diversos tipos de estímulos. Tanto o eixo HPA quanto o SNA parecem apresentar diferenças de resposta para duas grandes classes de estressores (SAWCHENKO; LI; ERICSSON, 2000): os estressores fisiológicos, entendidos como alterações do meio interno que ameaçam a sobrevivência do animal, como hipoxia ou infecções (MUELLER et al., 2004; TURRIN; RIVEST, 2004); e estressores psicológicos, ou seja, estímulos ambientais possivelmente nocivos (HERMAN et al., 1995; KNIGHT, 1996; PHILLIPS; LEDOUX, 1992). Animais

machos e fêmeas também não respondem da mesma forma a estímulos estressores. Estresse de curta duração, por exemplo, melhora o desempenho de camundongos machos em tarefas de condicionamento clássico, mas pioram o desempenho de camundongos fêmeas (WOOD; BEYLIN; SHORS, 2001). Esses efeitos parecem ser devido a interações entre o eixo HPA e os hormônios gonadais (SHORS; MIESEGAES, 2002).

1.1.2 Efeitos morfofisiológicos e comportamentais do estresse

Quando a resposta ao estímulo estressor é apropriada a demanda ambiental, ela é adaptativa (STERLING; REASON, 1988). Há situações, porém, nas quais as respostas desencadeadas não conseguem lidar de forma adequada com essa demanda (SAPOLSKY; ROMERO; MUNCK, 2000). Essas situações, ou eventos estressores crônicos, geram uma sobrecarga no organismo que resulta em efeitos deletérios não adaptativos (MCEWEN, 2006), como redução da imunidade, aumento da pressão sanguínea, desmineralização de ossos e alterações plásticas em diversas regiões do Sistema Nervoso Central, levando a alterações comportamentais (DU; MCEWEN; MANJI, 2009; MCEWEN, 1995).

Uma das maneiras pelas quais os hormônios do estresse podem modular o comportamento é através da sua atuação nos neurônios hipocâmpais. O hipocampo é uma estrutura presente no lobo temporal envolvida no processo da memória. Em roedores, ele é separado em dorsal e sub-regiões ventrais. O hipocampo dorsal, análogo ao hipocampo posterior em primatas, é responsável por funções cognitivas, enquanto que as regiões ventrais (anterior em primatas) são as porções límbicas do hipocampo, que regulam as emoções (FANSELOW; DONG, 2010). Alterações no hipocampo ventral estão associadas com distúrbios psiquiátricos incluindo a esquizofrenia (HECKERS; KONRADI, 2002; NELSON et al., 2011). Além disso, o hipocampo ventral está associado ao controle negativo do eixo HPA em resposta ao estresse (Figura 1) (HERMAN et al., 1995). Portanto, o hipocampo ventral representa um importante local de convergência pelo qual o estresse pode modular as emoções, contribuindo assim para os sintomas associados às doenças neuropsiquiátricas. Em resposta ao estresse, o hipocampo sofre uma série de alterações adaptativas. O estresse pode inibir a neurogênese ou a sobrevivência celular no hipocampo, principalmente na região do giro dentado e CA3 (MCEWEN, 2006).

Além de alterações no hipocampo, o estresse pode provocar alterações em neurônios do córtex pré-frontal e da amígdala, uma região do cérebro envolvida em circuitos de medo, ansiedade e agressividade. Assim, a capacidade de aprendizado, a memória e a capacidade de

tomar decisões podem ser comprometidas pelo estresse, podendo ser acompanhada de níveis elevados de ansiedade e agressão (MCEWEN, 2006).

1.1.3 Estresse durante o neurodesenvolvimento

Os primeiros anos de vida compõem uma fase importante do desenvolvimento (Figura 2), e eventos estressores nessa fase podem ser responsáveis por alterações desenvolvimentais. Crianças estressadas podem apresentar dificuldade de concentração e aprendizado, além de atrasos cognitivos (RAMOS, 2015). Um desequilíbrio fisiológico durante a fase de desenvolvimento pode ser responsável por gerar alterações permanentes no cérebro (KUNDAKOVIC; CHAMPAGNE, 2015). Portanto, estresse sofrido durante o neurodesenvolvimento pode gerar mudanças a níveis estruturais e funcionais no cérebro (HART; RUBIA, 2012), além de alterações comportamentais que persistem na vida adulta (BIFULCO; BROWN; ADLER, 1991).

O eixo HPA evoluiu de forma que, no início do desenvolvimento, ele permanece hiporresponsivo. Em humanos esse período corresponde aos primeiros anos de vida e em roedores corresponde às duas primeiras semanas pós-natal. O equilíbrio fisiológico do eixo HPA nessa fase do desenvolvimento, assim como outros fatores, tais como liberação do hormônio do crescimento e frequência cardíaca, parece ser mantido pela presença materna (LEVINE, 1994; LUPIEN et al., 2009). A estimulação tátil parece inibir a maioria das alterações cerebrais e o leite materno é essencial para reduzir a sensibilidade da glândula adrenal ao ACTH (LEVINE, 2001, 2002). Porém, na ausência do cuidado materno, ocorre a desinibição do eixo, deixando o indivíduo vulnerável aos efeitos do estresse. Desta forma, estudos têm demonstrado que crianças negligenciadas ou que sofreram algum tipo de abuso possuem maiores probabilidades de desenvolver depressão quando adultas (BIFULCO; BROWN; ADLER, 1991; SCHEDULE, 2007). Além de aumentar as chances do indivíduo se tornar depressivo, o histórico de abuso durante a infância é responsável por maiores índices de suicídio entre adolescentes e adultos jovens (BROWN et al., 1999; SCOTT et al., 2012).

Outros transtornos psiquiátricos que podem surgir como consequência da exposição a fatores estressantes durante o desenvolvimento são os transtornos de ansiedade, tais como transtorno obsessivo compulsivo e a síndrome do pânico (FERGUSSON; HORWOOD; LYNSKEY, 1996). Em suma, eventos estressantes durante a infância são fatores de risco para o desenvolvimento de transtornos psiquiátricos durante a vida adulta, tais como transtorno de ansiedade, depressão, déficit de atenção e hiperatividade, transtorno do estresse pós-traumático,

transtorno do uso de substâncias, dentre outros (ACKERMAN et al., 1998; FERGUSSON; HORWOOD; LYNSKEY, 1996; KENDLER et al., 2000; KESSLER et al., 2010; SCOTT; SMITH; ELLIS, 2010).

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

O modelo experimental mais utilizado para estudar o estresse pós-natal é a Separação Maternal (MS) em roedores. Esse protocolo foi inicialmente proposto por Meaney e Plotsky, em 1993, como o procedimento de separar animais da mãe por tempos superiores a 180 min, do segundo ao décimo quarto dia pós-natal, mantendo os animais da mesma ninhada juntos (PLOTSKY; MEANEY, 1993). A MS por mais de 180 minutos durante os primeiros dias de vida aumenta a atividade do PVN (SMITH et al., 1997) e gera uma elevação nos níveis de corticosteroides dos filhotes durante o tempo da separação (STANTON; GUTIERREZ; LEVINE, 1988). Além disso, um estudo mostrou que esse tipo de estresse pós-natal gera uma resposta prolongada de CRF e glicocorticoides em resposta a estressores nesses animais quando adultos (BIAGINI et al., 1998), o que parece ser devido a uma diminuição nos níveis de receptores GR no hipocampo, afetando o feedback negativo do eixo HPA (CAJERO et al., 2012). O protocolo de MS, portanto, parece reproduzir os efeitos que experiências pós-natais adversas apresentam em humanos.

Muitos trabalhos têm mostrado que a MS aumenta o comportamento tipo-ansioso, gera aumento no comportamento agressivo e tipo-depressivo, assim como déficits sociais e de memória (AISA et al., 2007; BRUNTON; RUSSELL, 2010; CAJERO et al., 2012; LEHMANN et al., 1999; SANDSTROM; HART, 2005). No hipocampo de adultos, a MS diminuiu os níveis de GR e gerou uma perda de espinhas e ramificações dendríticas, além de uma redução da neurogênese (AISA et al., 2007; CAJERO et al., 2012; MEANEY; SZYF, 2005). Porém, pouco se sabe sobre os efeitos da MS em animais jovens, uma fase crítica do neurodesenvolvimento, na qual pode-se observar os primeiros sintomas de transtornos neuropsiquiátricos.

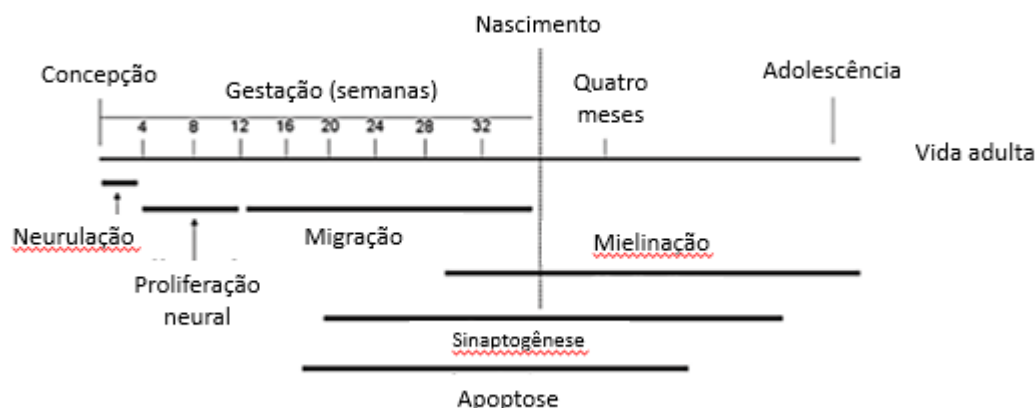


Figura 2: Neurodesenvolvimento em humanos. O desenvolvimento do cérebro envolve diferentes processos, tais como neurulação, proliferação, migração, sinaptogênese e poda neural, que ocorrem desde o início período embrionário e vão até o final da adolescência. A figura mostra esses diferentes processos e as principais fases do desenvolvimento onde estão presentes. (Adaptado de MARSH; GERBER, 2008).

1.2 JUSTIFICATIVA E HIPÓTESE

O estresse durante o desenvolvimento é um dos principais fatores que culminam em alterações comportamentais, morfológicas e estruturais no cérebro, podendo aumentar a probabilidade do indivíduo desenvolver alguns distúrbios neuropsiquiátricos. Diversos estudos mostraram que adultos que sofreram algum tipo de estresse durante os primeiros anos de vida apresentavam déficit cognitivo e maiores probabilidades de desenvolverem transtorno de ansiedade e depressão. Além disso, estudos de neuroimagem estrutural mostraram alterações em diversas áreas no cérebro de pessoas que passaram por estresse crônico durante a infância. Estes resultados indicam que o estresse sofrido durante o neurodesenvolvimento tem efeitos duradouros que se estendem para a idade adulta. Porém, a psiquiatria infantil e juvenil sofre com os desafios na identificação e no tratamento dos pacientes antes da idade adulta. Com isso, torna-se essencial entender melhor os efeitos do estresse crônico no início da vida no neurodesenvolvimento e suas consequências na adolescência, visto que é uma época em que ainda está ocorrendo uma remodelação do cérebro, além de ser a fase em que os primeiros sintomas de transtornos psiquiátricos são percebidos. Entender esses efeitos é fundamental para o desenvolvimento de novas abordagens terapêuticas e de medidas preventivas.

Resolvemos então investigar quais são os efeitos do estresse crônico pós-natal em roedores machos e fêmeas jovens. Nossa hipótese é de que o estresse por separação maternal

aumenta o comportamento tipo-ansioso e tipo-depressivo nos animais e que a resposta comportamental ao estresse é diferente entre os sexos.

1.3 OBJETIVOS

1.3.1 Objetivo geral

Avaliar os efeitos bioquímicos e comportamentais em camundongos fêmeas e machos gerados pelo estresse crônico por separação maternal

1.3.2 Objetivos específicos

- (I) Investigar os efeitos do estresse pós-natal sobre o comportamento tipo-ansioso e tipo-depressivo em camundongos C57/BL6.
- (II) Avaliar se existe diferença na resposta ao estresse por separação maternal entre machos e fêmeas jovens.
- (III) Analisar os níveis de receptores de glicocorticoides no hipocampo e amígdala de camundongos C57/BL6 submetidos ao protocolo de estresse crônico pós-natal através das técnicas de western blot e imunohistoquímica.

1.4 MATERIAIS E MÉTODOS

1.4.1 Animais experimentais

Foram utilizados camundongos fêmeas e machos da espécie C57/BL6, com idade entre 8 e 10 semanas. As fêmeas foram mantidas em gaiolas dentro de estantes ventiladas com temperatura de $22 \pm 1^\circ\text{C}$ e umidade 40-70%, em ciclo claro-escuro de 12/12 horas, e tiveram livre acesso à ração e água. Os machos foram mantidos separadamente das fêmeas, nas mesmas condições ambientais, e foram utilizados como matrizes para os cruzamentos. Todos os protocolos foram aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA: 86/2016 e 201/2019)

1.4.2 Protocolo de separação maternal

Macho e fêmeas (proporção 1:2) foram alocados em caixas conjuntamente por sete dias. Após este período os animais foram novamente separados e a gestação das fêmeas foi acompanhada até o nascimento dos filhotes. As fêmeas matrizes foram utilizadas apenas uma única vez, já os machos foram reutilizados por em média 5 cruzamentos. No provável 19º dia de gestação as fêmeas foram mantidas em caixas isoladas para evitar que as demais fêmeas da caixa matassem os filhotes após o nascimento.

As ninhadas foram padronizadas com uma média de 5 a 6 filhotes e tentamos deixar sempre que possível 3 machos e 3 fêmeas em cada uma delas. O dia do parto foi considerado o dia pós-natal 1 ou P1, do dia P2 ao dia P14 os filhotes foram separados diariamente de sua mãe por 180 minutos, durante esse tempo, eles foram mantidos isolados dos irmãos de ninhada e aquecidos a uma temperatura de $32^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$. No dia P23 foi feito o desmame e a sexagem e os animais foram mantidos em grupos de até quatro animais por gaiola seguindo as mesmas condições citadas anteriormente (Figura 3).

1.4.3 Testes de comportamento

Ao completarem quatro semanas os animais foram submetidos a testes comportamentais com o objetivo de avaliar alterações comportamentais em decorrência do estresse de separação maternal.

1.4.3.1 Caixa de Atividade Locomotora

O sistema automatizado (Actitrack v2.7.13.) foi utilizado para mensurar a atividade locomotora e exploratória dos animais. O aparato consiste em uma arena em acrílico que é acoplada a um sistema externo de infravermelho (25x25cm). Este sistema permite monitorar a distância total percorrida horizontalmente pelo animal e sua exploração vertical (número de rearings). O animal foi colocado no centro da caixa e permaneceu na arena por 10 minutos em livre exploração (BRANCHI; ALLEVA; COSTA, 2002). Após cada teste a caixa era higienizada com álcool 70%.

1.4.3.2 Campo Aberto

O aparato consiste em uma caixa com dimensões 50 x 50 cm, confeccionada em acrílico transparente, onde o chão e as paredes são pretos e é dividido em quadrantes menores. No início do teste os animais foram colocados individualmente no centro da arena e tiveram a atividade

exploratória mensurada durante 5 minutos. Os parâmetros tempo no centro, número de rearings, cruzamentos na periferia e no centro foram mensurados. Após cada teste a caixa era higienizada com álcool 70%.

1.4.3.3 Caixa Claro-Escuro

Trata-se de uma caixa contendo dois compartimentos, um escuro (1/3 da caixa) e um claro (2/3 da caixa), interligados por uma abertura divisória. As paredes do compartimento claro são brancas, a iluminação do ambiente também é bastante intensa, aproximadamente 500 lux. Os animais foram colocados individualmente na parte clara da caixa com a cabeça voltada para o lado escuro. A duração do teste foi de 5 minutos e após a primeira entrada do animal no compartimento escuro, foram registrados os seguintes parâmetros: tempo total de permanência em cada compartimento e número de transições entre os compartimentos (HASCOËT; BOURIN, 1998). A premissa deste teste consiste em quanto menor o tempo de latência e o tempo no claro, maior o comportamento tipo-ansioso dos animais. Além disso, o número de transições pode ser avaliado para analisar o comportamento locomotor dos animais durante o teste.

1.4.3.4 Labirinto em Cruz Elevado

O Labirinto em Cruz Elevado é um método comumente utilizado para avaliar o comportamento do tipo-ansiedade em roedores. O aparato utilizado para a realização do teste consiste em um labirinto de acrílico em forma de cruz, elevado a 30cm do solo, sendo dois braços abertos (30cm comprimento) e dois fechados (30cm de comprimento e altura de 50cm). A premissa do teste é a que animais que exibem o comportamento tipo-ansioso tendem a permanecer por menos tempo nos braços abertos do labirinto. Durante 5 minutos os animais exploraram livremente o labirinto e os seguintes parâmetros foram mensurados: tempo de permanência nos braços abertos, número de rearings (comportamento em que o animal se apoia nas patas traseiras para explorar o ambiente verticalmente), dippings (quando o animal explora o ambiente colocando a cabeça para fora dos braços abertos), tempo nas extremidades dos braços abertos e a porcentagem de entradas no braço aberto (LISTER, 1987; PELLOW et al., 1985)

1.4.3.5 Alimentação suprimida pela novidade

O teste de alimentação suprimida pela novidade utiliza-se do conflito entre a fome e o ambiente novo e aversivo para avaliar o comportamento tipo-impulsivo dos animais. Os animais foram pesados e toda a comida foi removida de sua caixa. 18 horas após a remoção da comida, os animais foram transferidos para o aparato do teste que consistia em uma caixa bem

iluminada (500lux) com dimensões 50 x50cm, onde um pélete de ração foi colocado no centro da caixa. Cada indivíduo foi colocado no canto da caixa e o tempo até o primeiro episódio de alimentação foi registrado. Após a latência para o primeiro episódio de alimentação, a quantidade de alimento consumida em 10 minutos foi medida. Além disso, avaliamos a perda de peso dos animais durante as 18 horas de jejum (SHEPHARD; BROADHURST, 1982).

1.4.3.6 Teste de Nado Forçado

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

1.4.4 Análise estatística

Os resultados serão demonstrados através da média, para dados paramétricos, ou mediana, para dados não paramétricos, \pm erro padrão da média/mediana. Para analisar os efeitos do estresse pós-natal utilizamos ANOVA de duas vias seguida pelo Tukey Test e para avaliar se existem diferenças nas respostas comportamentais ao estresse por MS entre machos e fêmeas, os animais MS tiveram seus dados normalizados pelos dados dos animais Naive e foi feito um Test t. Grau de significância ($p < 0,05$).

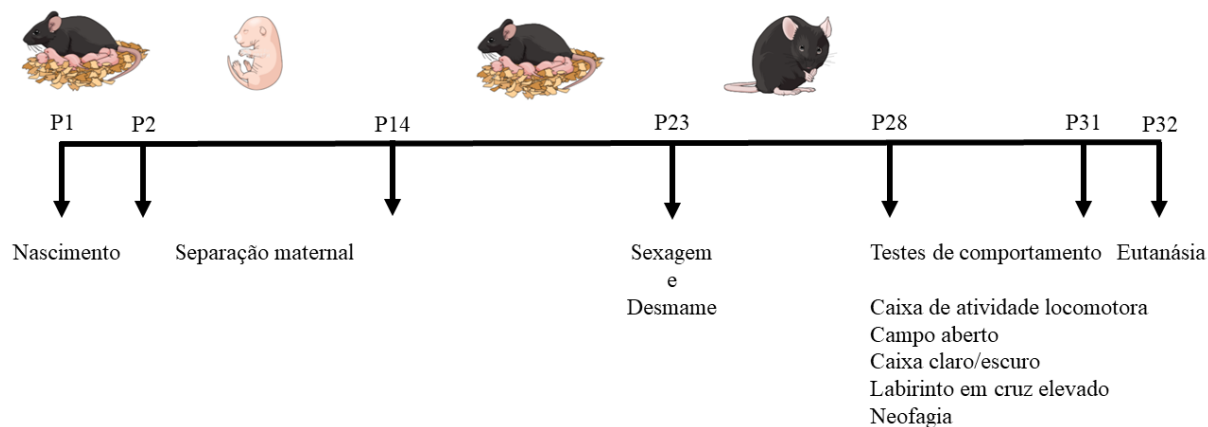


Figura 3: Procedimento experimental 1. Os animais passaram pelo protocolo de separação maternal do P2 ao P14 que consistia em separá-los da mãe e deixá-los isolados dos irmãos durante 180 minutos diariamente. No P23 foi feita a sexagem e o desmame dos animais e do P28 ao P31 os animais foram submetidos aos testes comportamentais. 24 horas após o último teste de comportamento os animais foram eutanasiados e os tecidos armazenados para posteriores análises.

1.5 RESULTADOS

1.5.1 O estresse por MS aumenta a atividade exploratória e locomotora de fêmeas jovens, mas não de machos

Analizamos os efeitos do estresse por MS no comportamento locomotor e exploratório de machos e fêmeas jovens no teste da caixa de atividade locomotora. Os animais foram colocados para livre exploração no aparato durante 10 minutos e os parâmetros distância total percorrida e número de rearings foram analisados.

Observamos no parâmetro distância total percorrida, através da análise de variância de duas vias, que existe uma diferença entre os grupos levando em consideração o fator sexo ($p = 0,019$) e uma diferença fraca em relação ao fator estresse ($p = 0,071$) mas que não existe uma interação entre esses fatores ($p = 0,273$) (Figura 4A).

Na análise de múltiplas comparações (Tukey Test), vimos que as fêmeas MS tiveram um aumento na distância total percorrida em relação às fêmeas Naive ($p = 0,032$) e não observamos diferenças entre os machos ($p = 0,623$) (Figura 4A). Porém, ao analisarmos se existe diferenças significativas entre os sexos, vimos que machos Naive exibem maior comportamento exploratório em relação às fêmeas Naive ($p = 0,019$) (Figura 4A).

Um outro parâmetro analisado no teste da caixa de atividade locomotora é o número de rearings. Vimos que existe uma diferença tanto no fator sexo ($p = 0,005$) quanto no fator MS ($p = 0,049$) mas que não existe uma interação entre os fatores ($p = 0,288$) (Figura 4B).

Na análise de múltiplas comparações vimos que as fêmeas MS fizeram mais rearings em comparação com as fêmeas Naive ($p = 0,025$) e não observamos diferenças significativas entre os machos ($p = 0,527$) (Figura 4B). Ao compararmos os sexos, vimos mais uma vez que os machos Naive exploram mais o ambiente, com um aumento do número de rearings em relação às fêmeas Naive ($p = 0,005$) (Figura 4B).

Para analisar se existe diferenças entre machos e fêmeas, normalizamos os animais MS pela média do grupo Naive e vimos que machos e fêmeas diferem no número de rearings no teste da caixa de atividade locomotora ($p = 0,043$), vimos que os machos MS fazem menos rearings do que as fêmeas (Figura 5B).

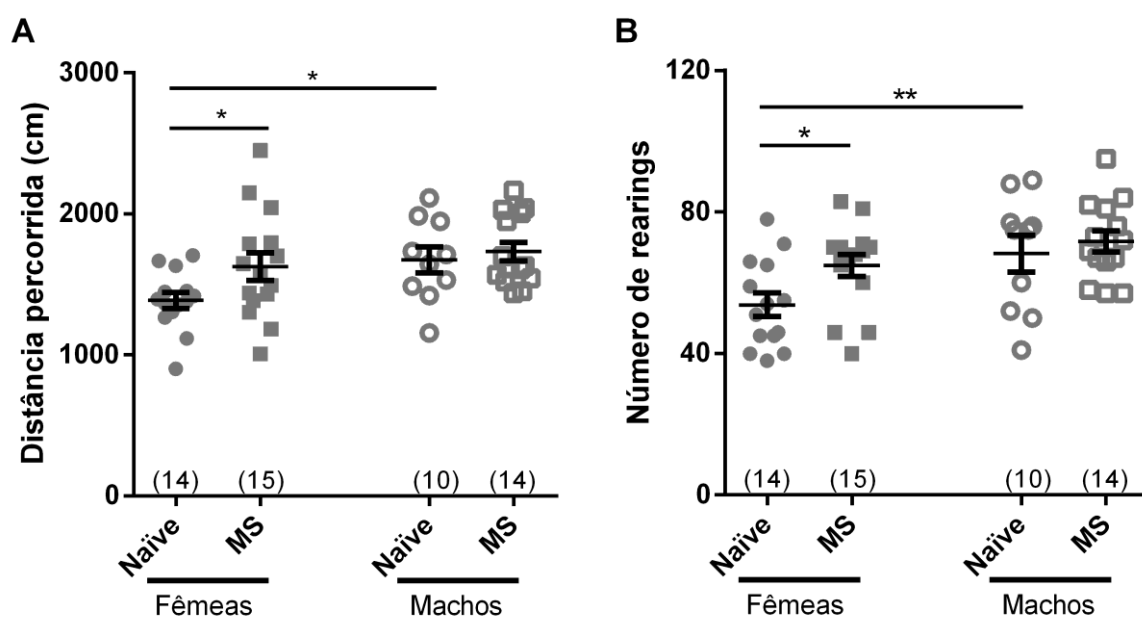


Figura 4: Fêmeas que passaram pelo protocolo de estresse crônico pós-natal mostram um aumento do comportamento locomotor e exploratório. Animais machos e fêmeas jovens que passaram pelo protocolo de MS foram submetidos ao teste da caixa de atividade locomotora. Os parâmetros distância total percorrida (A) e número de rearings (B) foram analisados. Número de animais entre parênteses. Média \pm SEM; Two Way ANOVA seguida do Teste de Tukey * = $p < 0,05$ ** = $p < 0,01$.

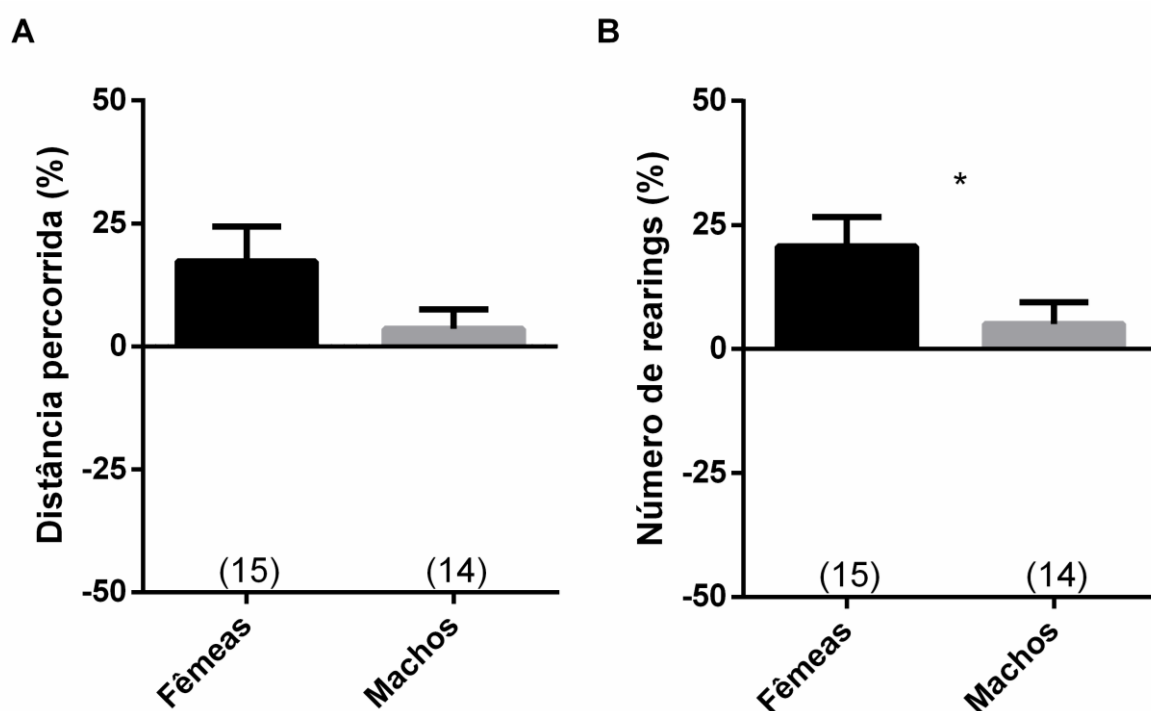


Figura 5: Fêmeas e machos que passaram pelo protocolo de estresse crônico pós-natal diferem no número de rearings no teste da caixa de atividade locomotora. Normalizamos os dados dos animais MS pela média do grupo controle para avaliarmos se a resposta comportamental ao estresse por MS difere entre os sexos. Os parâmetros distância total percorrida (A) e número de rearings (B) foram analisados. Número de animais entre parênteses. Média \pm SEM; Test t * = $p < 0,05$.

1.5.2 O estresse crônico por MS gerou um aumento do número de rearings em animais fêmeas e machos jovens no teste de campo aberto

Investigamos os efeitos da MS no comportamento locomotor e exploratório no teste de campo aberto. Para isso, os animais ficaram na caixa para livre exploração durante 5 minutos e os parâmetros cruzamentos na periferia, cruzamentos no centro, tempo no centro e número de rearings foram analisados.

Ao avaliarmos o parâmetro cruzamentos na periferia não observamos diferenças significativas no fator sexo, porém vimos uma leve tendência ($p = 0,098$), já no fator MS vimos que existe uma diferença ($p = 0,041$) e não foram observadas interações entre os fatores sexo e MS ($p = 0,715$) (Figura 6A). Na análise de múltiplas comparações (Tukey Test) vimos apenas uma diferença fraca no aumento dos cruzamentos na periferia de fêmeas MS em relação às fêmeas Naive ($p = 0,071$) e não houve diferenças entre os machos ($p = 0,250$) (Figura 6C).

No parâmetro tempo no centro, não houve diferenças entre os grupos em relação ao fator sexo ($p = 0,668$) e em relação ao fator MS ($p = 0,409$) (Figura 6A), assim como também não observamos diferenças significativas no parâmetro cruzamentos no centro em relação ao fator sexo ($p = 0,359$), ao fator MS ($p = 0,611$) e não houveram interações entre esses fatores ($p = 0,733$) (Figura 6D).

Em relação ao número de rearings no teste de campo aberto, não vimos diferenças significativas em relação ao fator sexo ($p = 0,851$) (Figura 6B), também não vimos uma interação entre os fatores sexo e MS, porém, observamos uma diferença em relação ao fator MS ($p < 0,001$). Na análise de múltiplas comparações (Tukey Test) tanto machos ($p = 0,033$) quanto fêmeas ($p = 0,004$) apresentaram um aumento do número de rearings (Figura 6B).

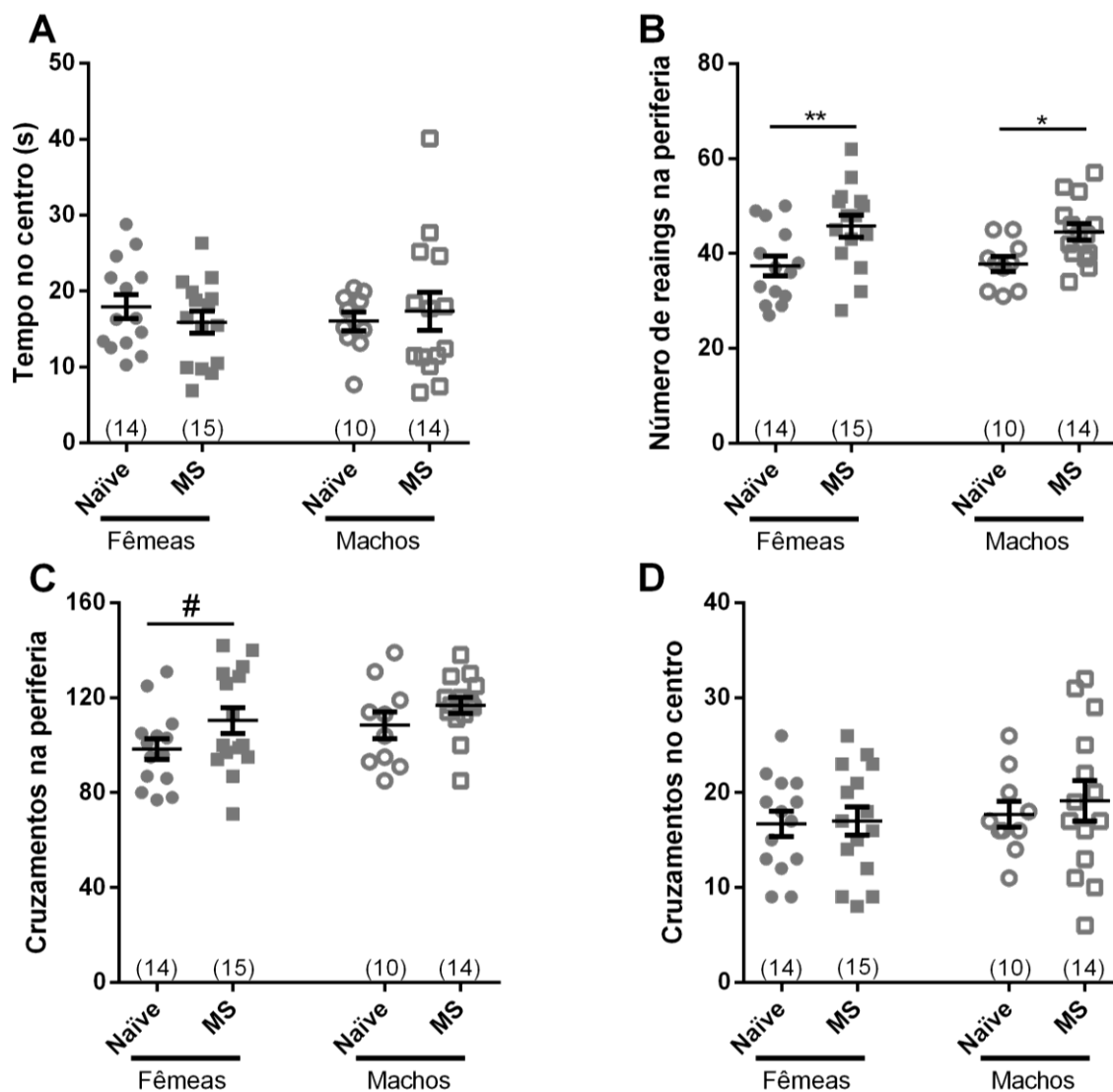


Figura 6: O estresse por separação materna aumenta o comportamento exploratório de machos e fêmeas jovens. Animais jovens foram submetidos ao teste de campo aberto onde puderam explorar livremente o aparato durante 5 minutos. Os seguintes parâmetros foram avaliados: cruzamentos na periferia (A), tempo no centro (B), número de rearings na periferia (C) e cruzamentos no centro (D). Número de animais entre parênteses. Média \pm SEM; Two Way ANOVA seguida do Teste de Tukey * = $p < 0,05$ ** = $p < 0,01$, # = $p < 0,09$.

Com o Teste-t vimos que machos e fêmeas não diferem no comportamento exploratório e locomotor no teste de campo aberto (Figura 7).

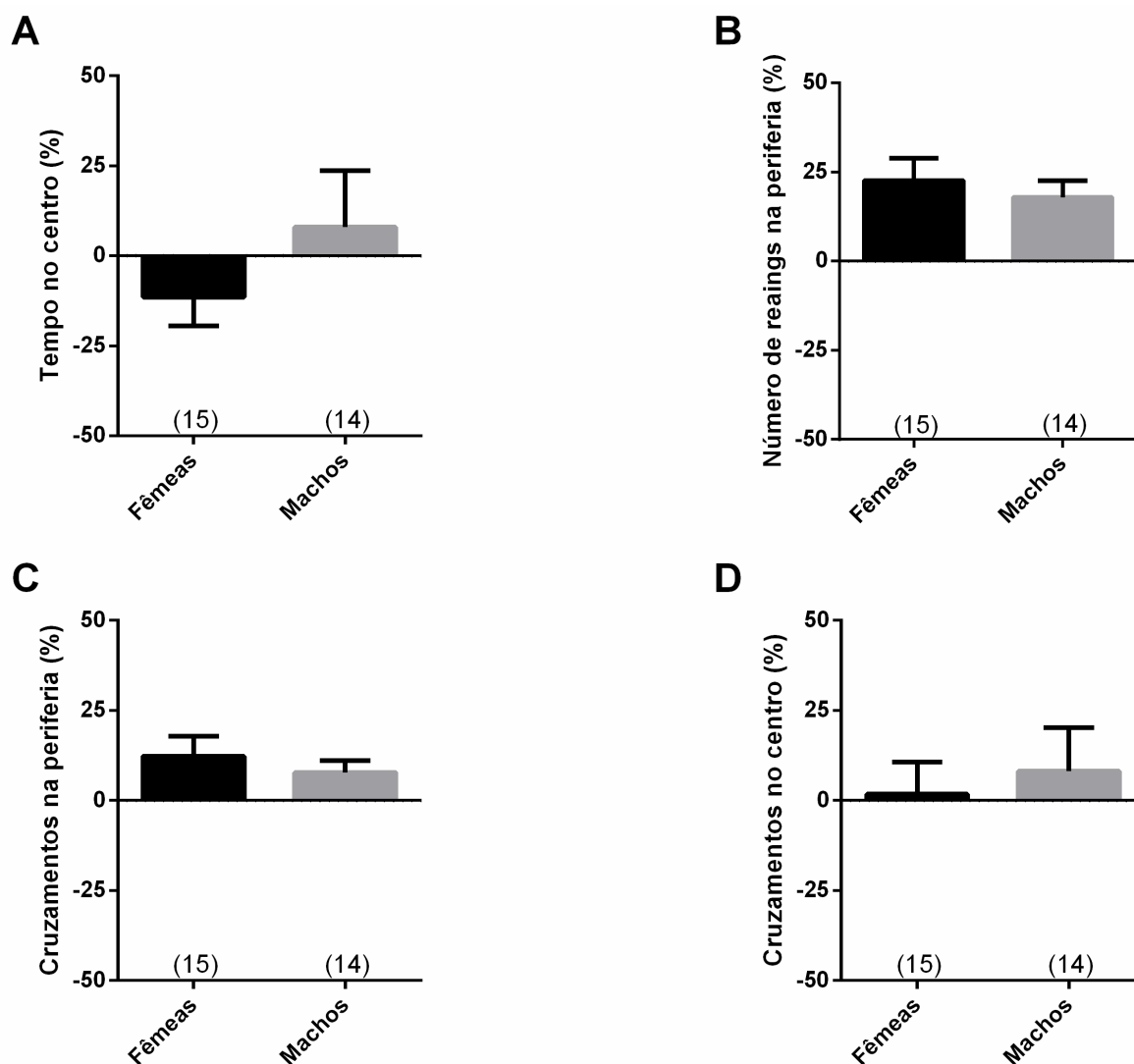


Figura 7: O estresse por separação maternal não altera o comportamento locomotor e exploratório de machos e fêmeas jovens no teste do campo aberto de forma sexualmente dimórfica. Normalizamos os dados dos animais MS pela média do grupo controle para avaliarmos se a resposta comportamental ao estresse por MS difere entre os sexos. Os parâmetros tempo no centro (A), número de rearing feitos da periferia (B), cruzamentos na periferia (C) e cruzamentos no centro (D). Número de animais entre parênteses. Média \pm SEM; Test t.

1.5.3 O estresse crônico pós-natal aumentou o comportamento tipo-ansioso de machos jovens no teste da caixa claro/escuro

O comportamento tipo-ansioso de animais machos e fêmeas jovens que passaram pelo protocolo de MS foi avaliado no teste da caixa claro/escuro onde os parâmetros latência para a primeira entrada no ambiente escuro, tempo no claro e número de transições entre os compartimentos foram avaliados.

Não observamos diferenças significativas na latência entre os sexos ($p = 0,982$), no fator MS ($p = 0,667$) e não observamos uma interação entre os fatores ($p = 0,398$) (Figura 8A).

Ao analisarmos o tempo no ambiente claro, vimos que não houve diferenças no fator sexo ($p = 0,295$) e na interação entre os fatores sexo e MS ($p = 0,147$), porém, ao analisarmos o fator MS observamos que houve uma diferença significativa ($p = 0,009$). Na análise de múltiplas comparações vimos que machos MS apresentaram uma redução do tempo de permanência no ambiente claro em relação aos machos Naive ($p = 0,007$). Além disso, vimos que os machos Naive possuem uma leve tendência a permanecer mais tempo no ambiente claro quando comparamos com as fêmeas Naive ($p = 0,095$) (Figura 8B).

No parâmetro número de transições, vimos que existe uma interação entre os fatores sexo e MS ($p = 0,034$), porém não vimos diferenças nos fatores sexo ($p = 0,063$) e MS ($p = 0,111$). No post hoc vimos que os machos MS tiveram uma redução em relação aos machos Naive ($p = 0,014$) e que machos Naive transicionaram mais entre os ambientes em relação às fêmeas Naive ($p = 0,009$) (Figura 8C).

Ao normalizar os animais MS pela média dos animais Naives, não observamos diferenças significativas entre os sexos nos parâmetros latência e tempo no centro (Figura 9A e 9B), porém, ao avaliarmos o parâmetro número de transições, vimos que os machos se locomovem menos entre os compartimentos claro/escuro em comparação com as fêmeas ($p = 0,016$) (Figura 9C).

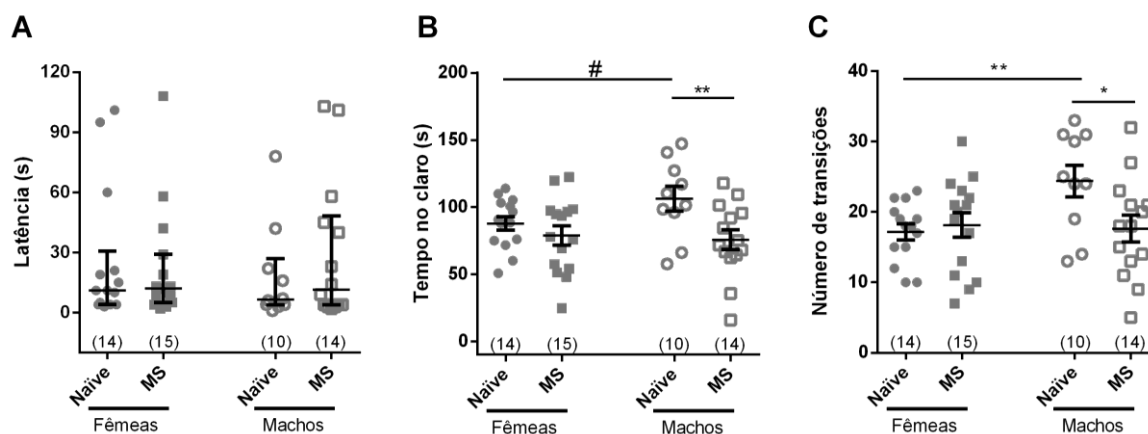


Figura 8: O estresse por separação materna aumenta o comportamento tipo ansioso de machos jovens. Machos e fêmeas jovens passaram pelo teste da caixa claro/escuro onde foram colocados no ambiente claro e a latência para a primeira entrada no escuro foi quantificada (A). Após a latência, os animais puderam explorar livremente o aparato durante 5 minutos e os seguintes parâmetros

foram avaliados: tempo no ambiente claro (B) e número de transições entre os compartimentos (C). Número de animais entre parênteses. Média \pm SEM; Two Way ANOVA seguida do Teste de Tukey * = $p < 0,05$ ** = $p < 0,01$, # = $p < 0,09$.

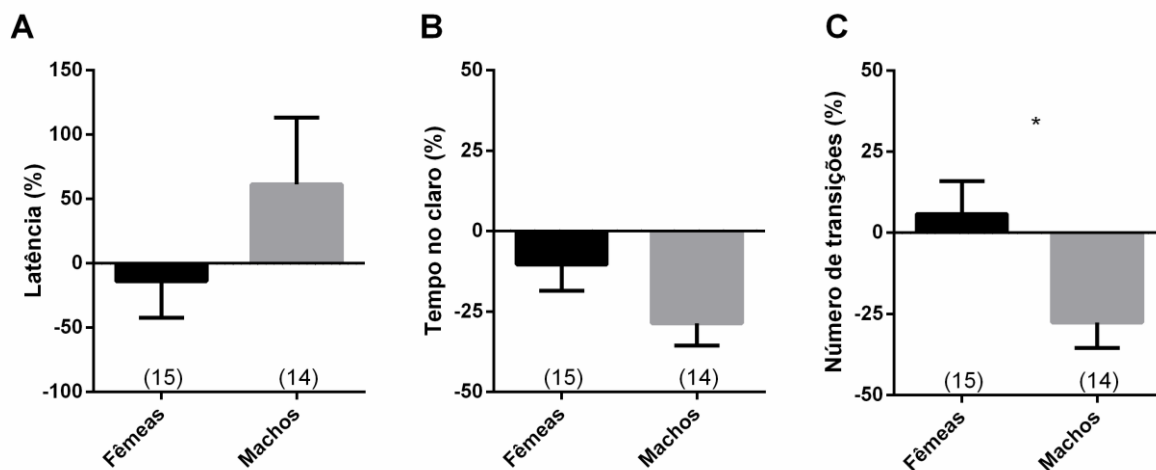


Figura 9: Fêmeas e machos que passaram pelo protocolo de estresse crônico pós-natal diferem no número de transições no teste da caixa claro/escuro. Normalizamos os dados dos animais MS pela média do grupo controle para avaliarmos se a resposta comportamental ao estresse por MS se difere entre os sexos. Os parâmetros latência (A), tempo no claro (B) e número de transições (C) foram analisados. Número de animais entre parênteses. Média \pm SEM; Test t * = $p < 0,05$.

1.5.4 Machos MS tiveram um aumento do comportamento tipo-ansioso no teste de labirinto em cruz elevado

Machos e fêmeas jovens que passaram pelo protocolo de MS foram testados no labirinto em cruz elevado, que é um teste clássico para avaliar o comportamento tipo ansioso em roedores. Os parâmetros entradas e tempo nos braços abertos, número de rearings e dippings, tempo nas extremidades e tempo de grooming foram avaliados.

Ao avaliarmos as entradas nos braços abertos, não vimos diferenças significativas no parâmetro sexo ($p = 0,638$), MS ($p = 0,199$) e não observamos uma interação ente os fatores ($p = 0,325$) (Figura 10A).

No tempo nos braços abertos, existe uma interação entre os fatores sexo e MS ($p = 0,010$) porém nos parâmetros sexo ($p = 0,104$) e MS ($p = 0,498$) de forma isolada não foram identificadas diferenças significativas. Na análise de múltiplas comparações, vimos que os machos MS mostraram uma redução do tempo nos braços abertos em relação aos machos Naive

($p = 0,029$) e que machos Naive permanecem mais tempo nos braços abertos em relação às fêmeas ($p = 0,006$) (Figura 10B),

O número de rearings é um parâmetro que analisa a exploração vertical dos animais e no labirinto em cruz elevado não houve diferenças nos fatores sexo ($p = 0,993$), MS ($p = 0,204$) e também não observamos interações entre os fatores ($p = 0,387$) (Figura 10C).

Dippings é o nome dado a um comportamento exploratório onde o animal insere a cabeça para fora dos braços abertos. Ao analisarmos esse parâmetro, vimos que não existe diferenças significativas no fator sexo ($p = 0,116$) e no fator MS ($p = 0,423$) porém, vimos que existe uma interação entre os dois fatores ($p = 0,001$). No Tukey test observamos que machos e fêmeas MS respondem de maneiras distintas, onde os machos MS apresentaram uma redução do número de dippings em relação aos machos Naive ($p = 0,007$) e as fêmeas MS mostraram uma leve tendência a aumentar o número de dippings em relação às fêmeas Naive ($p = 0,054$). Ao comparar machos e fêmeas vimos que os machos Naive fazem mais dippings do que fêmeas Naive ($p = 0,002$) (Figura 10D).

No parâmetro tempo nas extremidades dos braços abertos, vimos que existe uma diferença no fator sexo ($p = 0,040$), que não tem diferença significativa no fator MS ($p = 0,363$) e que existe uma interação entre os fatores sexo e MS ($p = 0,005$). Na análise de múltiplas comparações vimos que machos MS permanecem menos tempo nas extremidades dos braços abertos em relação aos machos Naive ($p = 0,013$) e que machos Naive ficam mais tempo nas extremidades quando comparamos com as fêmeas Naive ($p = 0,001$) (Figura 10E).

Para identificar se machos e fêmeas respondem de maneiras distintas ao protocolo de MS, normalizamos os dados pela média do grupo controle. Vimos que existe uma diferença significativa entre os sexos no labirinto em cruz elevado quando analisamos os parâmetros tempo nos braços abertos ($p = 0,002$), número de dippings ($p < 0,001$) e tempo nas extremidades ($p < 0,001$) onde os machos tiveram uma redução de todos os parâmetros em relação às fêmeas (Figura 11B, 11D e 11E).

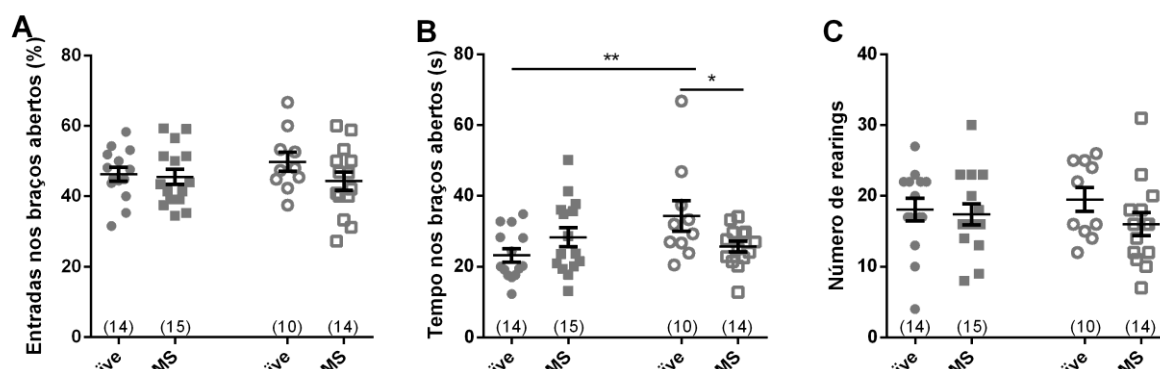


Figura 10: Machos MS apresentaram um aumento do comportamento tipo-ansioso no teste do labirinto em cruz elevado. Animais que passaram pelo protocolo de separação maternal foram submetidos ao teste do labirinto em cruz elevado. Machos e fêmeas tiveram 5 minutos para explorar o aparato e os seguintes parâmetros foram avaliados: entradas nos braços abertos (A), tempo nos braços abertos (B), número de rearings (C), número de dippings (D) e tempos nas extremidades (E). Número de animais entre parênteses. Mediana ou Média \pm SEM; Two Way ANOVA seguida do Teste de Tukey * = $p < 0,05$ ** = $p < 0,01$, # = $p < 0,09$

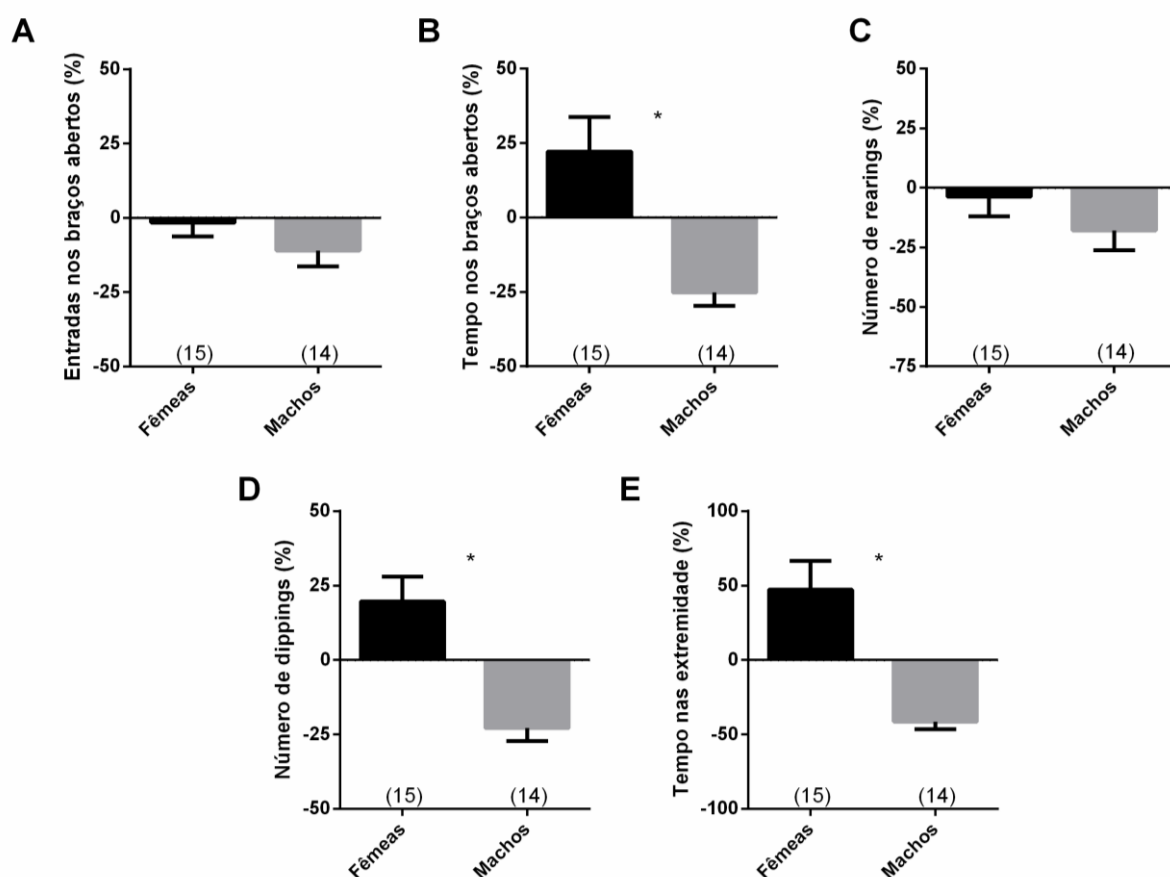


Figura 11: Fêmeas e machos respondem ao estresse por MS de forma diferente no teste do labirinto em cruz elevado. Normalizamos os dados dos animais MS pela média do grupo controle para avaliarmos se a resposta comportamental ao estresse por MS difere entre os sexos. Os parâmetros entradas nos braços abertos (A), tempo nos braços abertos (B), número de rearings (C), número de dippings (D) e tempo nas extremidades (E) foram analisados. Número de animais entre parênteses. Média \pm SEM; Test t * = $p < 0,05$.

1.5.5 Machos e fêmeas MS não tiveram alterações comportamentais no teste da alimentação suprimida pela novidade

Após os demais testes comportamentais, os animais foram submetidos ao teste de alimentação suprimida pela novidade, um teste que permite avaliar o comportamento tipo-impulsivo em roedores.

Na latência para a primeira ingestão de alimentos, vimos que não há diferença significativa no fator sexo ($p = 0,159$), MS ($p = 0,354$) e não existe interação entre os fatores ($p = 0,778$) (Figura 12A).

Também não observamos diferenças na quantidade de comida ingerida nos 10 minutos de teste na interação entre os fatores ($p = 0,504$) e não foram observadas diferenças nos fatores sexo ($p = 0,548$) e MS ($p = 0,504$) (Figura 12B).

Analizamos também a perda de peso do animal durante o período de jejum e não vimos diferenças entre os grupos analisados nem no fator sexo ($p = 0,383$), nem no fator MS ($p = 0,445$) e nem interação entre os fatores ($p = 0,474$) (Figura 12C).

Ao compararmos a resposta comportamental ao estresse por MS de machos e fêmeas no teste da alimentação suprimida pela novidade, vimos que não há diferença significativa entre os sexos em nenhum dos parâmetros avaliados.

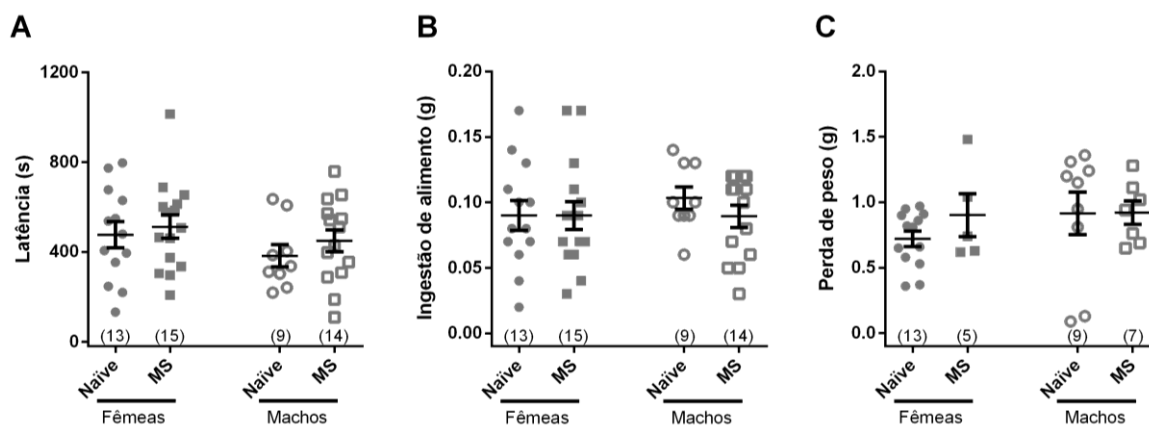


Figura 12: Efeito do estresse por separação maternal no teste de alimentação suprimida pela novidade. Machos e fêmeas tiveram 10 minutos para explorar o aparato após a latência (A) e os seguintes parâmetros foram avaliados: ingestão de alimento (B) e perda peso do animal (C). Número de animais entre parênteses. Média \pm SEM; Two Way ANOVA seguida do Teste de Tukey

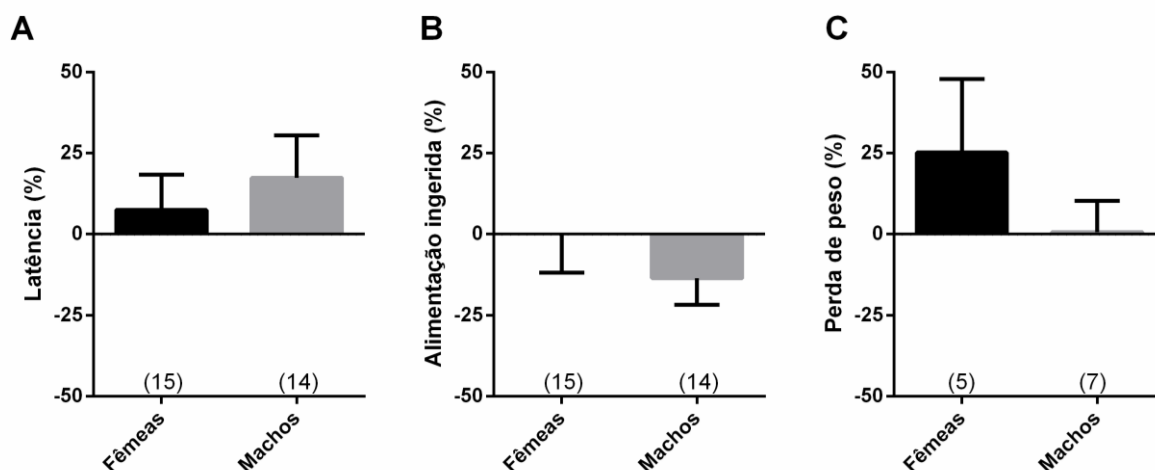


Figura 13: Fêmeas e machos jovens não diferem no teste da alimentação suprimida pela novidade após a MS. Normalizamos os dados dos animais MS pela média do grupo controle para avaliarmos se a resposta comportamental ao estresse por MS difere entre os sexos. Os parâmetros distância total percorrida (A) e número de rearings (B) foram analisados. Número de animais entre parênteses. Média \pm SEM; Test t.

1.5.6 Machos MS apresentam um aumento do comportamento tipo-depressivo no teste do nado forçado

O teste do nado forçado é um teste clássico para avaliar o comportamento tipo-depressivo dos animais. Machos e fêmeas jovens foram testados no nado forçado e vimos que no parâmetro latência, não houve diferenças no fator sexo ($p = 0,153$), nem no fator MS ($p = 0,653$) e também não houve uma interação entre os fatores ($p = 0,699$) (Figura 14A).

Ao analisarmos a frequência de imobilidade, vimos que os grupos não se diferiam em relação ao fator sexo ($p = 0,$), ao fator MS ($p = 0,690$) e vimos que não existe uma interação entre os fatores ($p = 0,074$) (Figura 14B). Porém, ao avaliarmos o tempo de imobilidade vimos que existe uma interação entre os fatores sexo e MS ($p = 0,043$) apesar de não ter diferença nos fatores sexo ($p = 0,058$) e MS ($p = 0,425$) isoladamente. Ao fazermos a análise de múltiplas comparações, vimos que machos MS ficaram mais tempo imóveis em relação aos machos Naive ($p = 0,040$) e em relação às fêmeas MS ($p = 0,014$) (Figura 14 C).

O tempo de nado foi um parâmetro em que não observamos diferenças entre os sexos ($p = 0,202$), no fator MS ($p = 0,155$) e não houve interação entre ambos os fatores ($p = 0,089$) (Figura 14D).

Climbing é um comportamento de escalada do animal nas paredes do vidro, indica que o animal está procurando de alguma forma escapar da água. No parâmetro frequência de

climbing, não vimos diferenças significativas no fator sexo ($p = 0,277$), no fator MS ($p = 0,789$) e não vimos interações entre os fatores ($p = 0,594$) (Figura 14E).

O último parâmetro avaliado no teste de nado forçado foi o tempo que o animal permaneceu fazendo o comportamento de climbing. Assim como na frequência de climbing, não vimos diferenças no fator sexo ($p = 0,183$), no fator MS ($p = 0,194$) e na interação entre os fatores ($p = 0,811$) (Figura 14F).

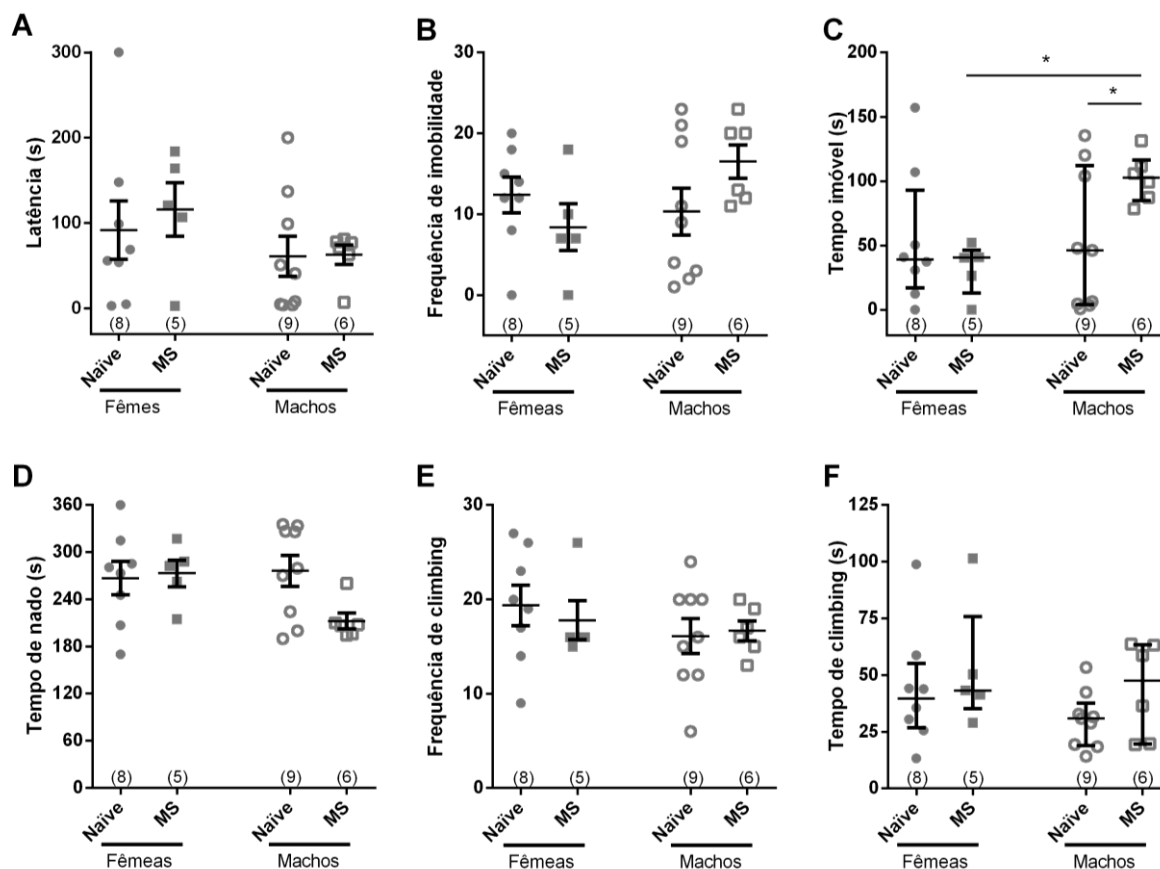


Figura 14: O estresse crônico por MS aumentou o comportamento tipo-depressivo de animais machos mas não de fêmeas. Machos e fêmeas tiveram 6 minutos para explorar o aparato e os seguintes parâmetros foram avaliados: latência para o primeiro episódio de imobilidade (A), frequência de imobilidade (B), tempo imóvel (C), tempo de nado (D), frequência de climbing (E) e tempo de climbing (F). Número de animais entre parênteses. Mediana ou Média \pm SEM; Two Way ANOVA seguida do Teste de Tukey * = $p < 0,05$.

Quando comparamos a resposta comportamental de machos e fêmeas ao estresse crônico infantil no teste de nado forçado vimos que os grupos se diferem no parâmetro frequência de imobilidade ($p = 0,015$) (Figura 15B), onde machos fazem episódios de imobilidade com maior frequência em relação às fêmeas. No parâmetro tempo imóvel, vimos

uma diferença entre machos e fêmeas, os machos aumentaram o tempo imóvel em relação às fêmeas MS ($p < 0,001$) (Figura 15C). Por fim, também observamos diferença entre machos e fêmeas no tempo de nado ($p = 0,006$) (Figura 15D).

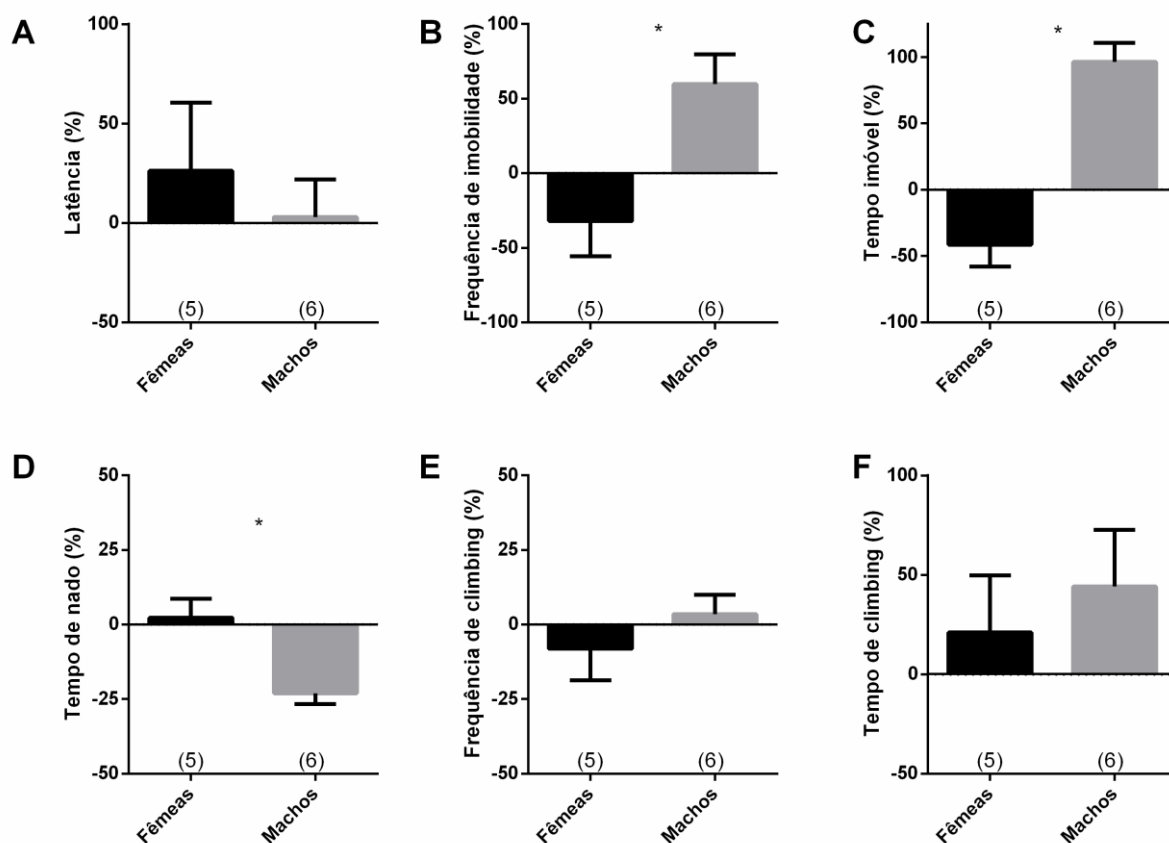


Figura 15: Fêmeas e machos MS respondem de maneiras distintas ao estresse por MS no teste de nado forçado. Normalizamos os dados dos animais MS pela média do controle para avaliarmos se a resposta comportamental ao estresse por MS se difere entre os sexos. Os seguintes parâmetros foram avaliados: latência para o primeiro episódio de imobilidade (A), frequência de imobilidade (B), tempo imóvel (C), tempo de nado (D), frequência de climbing (E) e tempo de climbing (F). Número de animais entre parênteses. Média \pm SEM; Test t * = $p < 0,05$.

1.6 DISCUSSÃO

Nos últimos anos, têm aumentado os casos de ansiedade e depressão na população mundial. Além dos casos estarem aumentando em indivíduos adultos, nota-se um significativo aumento de transtornos psiquiátricos em crianças e adolescentes. O estresse crônico infantil, juntamente com outros fatores, é um dos responsáveis por esse crescente aumento nos casos de ansiedade e depressão em indivíduos jovens (BIFULCO; BROWN; ADLER, 1991).

Embora a maioria dos sintomas apareça durante a adolescência, uma fase crítica do desenvolvimento, grande parte dos trabalhos já publicados focam os estudos em animais adultos. Com isso, pouco se sabe a respeito das consequências do estresse crônico infantil na adolescência. Os poucos trabalhos publicados que mostram os efeitos do estresse crônico em animais jovens possuem resultados muito divergentes (BIAN et al., 2015; GRACIA-RUBIO et al., 2016; RIGGS et al., 2014; SHIN et al., 2019). Essa inconsistência dos resultados se dá principalmente devido às diferenças nos protocolos utilizados, especialmente o tempo de duração e a condição que a ninhada ficou durante a separação maternal.

Na literatura, existem diferentes protocolos de MS, com variações no tempo e horário de separação e com variações em relação ao isolamento dos animais. Um estudo ainda não publicado do nosso grupo teve como principal objetivo avaliar as diferenças comportamentais de diferentes tipos de protocolos de MS, levando em consideração a variação do horário da MS e também o isolamento ou não dos animais em relação aos seus irmãos de ninhada. Vimos que o protocolo em que o horário da separação variava durante o dia, gerando um estresse imprevisível aos animais, juntamente com isolamento dos irmãos foi o protocolo que gerou maiores alterações comportamentais em animais machos e fêmeas jovens (Medeiros, *et al.* dados não publicados). A partir desses resultados, optamos por, no presente estudo, utilizar o protocolo de MS com horários variados durante o período de separação, e mantivemos os animais em potes isolados fisicamente dos irmãos. Apesar dos animais sentirem a presença dos irmãos através do olfato durante o protocolo, estudos mostram que a ausência do contato físico torna o eixo HPA mais responsivo aos estressores (LEVINE, 2001, 2002).

Na caixa de atividade locomotora (Figura 4), vimos que as fêmeas que passaram pelo protocolo de estresse crônico pós-natal tiveram um aumento da distância percorrida e do número de rearings, o que mostra um aumento da atividade locomotora e exploratória desses animais. Ao compararmos as fêmeas com os machos (Figura 5) vimos que, ao normalizarmos os dados dos animais pela média do controle, as fêmeas apresentaram maior número de rearings

do que os machos, indicando que a resposta comportamental no teste da caixa de atividade locomotora difere entre os sexos.

No teste de campo aberto podemos mensurar a atividade locomotora e exploratória dos animais, ele difere da caixa de atividade locomotora principalmente pelo tamanho da arena, onde podemos dividi-lo em região central (mais aversiva aos roedores) e região periférica (um local mais confortável para os animais).

Nos parâmetros que avaliam a atividade dos animais na região central, ou seja, a mais aversiva, nós não observamos diferenças entre os grupos nem em machos e nem em fêmeas (Figura 6A e 6D), porém, ao avaliarmos os cruzamentos na periferia, vimos que as fêmeas MS apresentam uma pequena diferença em relação às fêmeas Naive (Figura 6C). Isso sugere, mais uma vez, um aumento do comportamento locomotor.

Ainda no teste de campo aberto, vimos um aumento no número de rearings na periferia tanto em machos quanto em fêmeas MS (Figura 6B). Essa diferença no número de rearings em machos que observamos no teste de campo aberto e não observamos na caixa de atividade locomotora pode ser devido ao ambiente, pois o campo aberto é um aparato maior, com as paredes escuras e a caixa de atividade locomotora possui as paredes transparentes. Outra hipótese é que pode ser devido ao menor tempo de teste no campo aberto, 5 minutos, onde os animais se mostraram mais exploradores justamente por ser um período de adaptação ao novo ambiente. Por fim, observamos um efeito da separação maternal tanto em machos quanto em fêmeas no teste do campo aberto, mostrando que neste teste não há uma resposta comportamental diferente entre os sexos (Figura 7).

A caixa claro/escuro é um aparato que consiste em dois compartimentos ligados entre si por uma pequena abertura. Roedores são animais curiosos e tendem a gostar de explorar novos ambientes, porém, ambientes desconhecidos e principalmente bem iluminados são também locais de extrema exposição e se tornam aversivos. Animais que tendem a permanecer mais tempo explorando o compartimento claro da caixa são animais com menor comportamento tipo-ansioso. Com nossas análises, vimos que os machos MS apresentaram uma redução do tempo no claro, indicando um aumento do comportamento tipo-ansioso nesse grupo (Figura 8B). Além disso, os machos MS também apresentaram uma redução no número de transições entre os compartimentos o que sugere uma redução do comportamento exploratório desses animais (Figura 8C).

Ao compararmos o comportamento exploratório de machos MS na caixa claro/escuro e nos testes da caixa de atividade locomotora e campo aberto, vimos que os machos na caixa claro/escuro tiveram uma redução em relação aos animais Naive. Isso pode ser devido à grande

aversão desses animais a ambientes mais ansiogênicos, como é a parte clara do aparato. Além disso, no início do teste os animais são colocados diretamente na região clara, o que pode gerar um maior comportamento tipo-ansioso fazendo com que isso afete também o comportamento locomotor e exploratório.

Na análise do Test t entre machos e fêmeas, vimos que existem diferenças entre os sexos no parâmetro número de transições entre os compartimentos (Figura 9C), em que os machos MS apresentaram uma redução em relação às fêmeas MS. Portanto, vimos até aqui que as fêmeas jovens sejam mais resilientes aos efeitos do estresse crônico infantil. Nossos resultados da caixa claro-escuro se diferem dos dados encontrados na literatura para machos C57/BL6 adultos, que não tiveram diferenças no parâmetro número de transições, mas não se diferem dos dados da literatura no parâmetro latência (OWN; PATEL, 2013).

O teste clássico para avaliar o comportamento tipo-ansioso em roedores é o teste do labirinto em cruz elevado. Animais com maior comportamento tipo-ansioso tendem a ficar menos tempo nos braços abertos, que é um local mais aversivo do labirinto, principalmente nas suas extremidades e tendem a explorar menos os ambientes do labirinto. Neste teste, vimos que os machos MS apresentaram uma redução do tempo nos braços abertos (Figura 10B), uma redução no número de dippings (Figura 10D) e uma redução do tempo nas extremidades (Figura 10E), sugerindo mais uma vez que o estresse por separação maternal aumenta o comportamento tipo-ansioso de machos. Em contrapartida, vimos que as fêmeas MS tiveram uma fraca diferença no número de dippings em relação às fêmeas Naive (Figura 10D).

Vimos também no teste de labirinto em cruz elevado que machos e fêmeas possuem respostas comportamentais distintas ao estresse sofrido, onde os machos apresentaram uma redução no tempo nos braços abertos (Figura 11B), no número de dippings (Figura 11D) e no tempo nas extremidades (Figura 11E), o que novamente sugere uma maior resiliência das fêmeas ao protocolo de estresse crônico feito no presente trabalho.

O teste da alimentação suprimida pela novidade se baseia na premissa do conflito entre a fome e o ambiente aversivo ao animal. Animais mais impulsivos tendem a ter uma redução no período de latência para a primeira ingestão alimentar, pois eles não avaliam os riscos e vão diretamente se alimentar. Além da latência e da quantidade de comida ingerida, a perda de peso dos animais durante o período de jejum também foi avaliada, a fim de evitar que a perda de peso excessiva prejudicasse o teste dos animais. Vimos que não existe diferença entre os grupos no teste da alimentação suprimida pela novidade (Figuras 12 e 13). Um estudo utilizando ratos com 41 dias de vida mostrou que a MS foi capaz de aumentar o tempo de latência dos animais, mas não o consumo de alimento no teste da alimentação suprimida pela novidade, porém, o

tempo de jejum foi de 24 horas (HU et al., 2017). Já outro trabalho, viu que camundongos C56/BL6 machos em idade adulta que passaram por 180 minutos de MS do P2 ao P14 não diferiram do grupo controle na latência, mas sim na quantidade de comida ingerida durante o teste, que foi maior (OWN; PATEL, 2013). Nossa hipótese é que não observamos tal diferença entre nossos grupos devido à idade, à linhagem e também devido ao fato dos animais responderem de formas diferentes aos testes comportamentais, que será melhor discutido adiante.

Um clássico teste comportamental para avaliar o comportamento tipo-depressivo é o teste de nado forçado. Após o teste, vimos que os machos MS apresentam um aumento do tempo de imobilidade em relação aos machos Naive e às fêmeas MS, o que sugere um aumento do comportamento tipo-depressivo (Figura 14C). Ao compararmos machos e fêmeas, vimos que os animais respondem de maneira distinta no teste do nado forçado. Os machos tiveram um aumento da frequência e do tempo de imobilidade e uma redução do tempo de nado (Figura 15), o que sugere que os machos são mais vulneráveis aos efeitos do estresse crônico infantil quando comparamos com as fêmeas, que se mostraram mais resilientes.

No presente estudo utilizamos vários testes comportamentais pois acreditamos que a variabilidade dos testes pode contribuir para a sua confiabilidade. Sabemos que existem diferentes tipos de ansiedade e depressão e que testes de comportamento distintos podem estar avaliando diferentes aspectos da ansiedade e da depressão dos animais, pois os testes têm fatores como luminosidade, brilho, novidade, tamanho, punição, dentre outros fatores que podem influenciar de maneira distinta. Os transtornos psiquiátricos na prática clínica também compreendem uma gama de patologias com sinais e sintomas que podem ser desencadeados por estímulos diferentes. De fato, alguns estudos que comparam testes que avaliam o comportamento de animais, têm demonstrado que animais respondem de maneiras distintas em diferentes testes mesmo em testes padronizados para avaliar o mesmo perfil comportamental (ANDRE, 2008; MORME, 1998; PEREIRA et al., 2008). Esses dados condizem com nossos resultados, onde vimos que os animais respondem de maneira diferente nos testes comportamentais avaliados.

Apesar de nossos experimentos terem sido realizados durante a quarta semana de vida dos animais, fase na qual ainda não ocorreu maturação sexual, nossos resultados sugerem um dimorfismo sexual nos comportamentos tipo-ansioso e tipo-depressivo induzidos pelo estresse crônico durante o desenvolvimento (Tabela 1 em anexo). Vimos que o estresse crônico pós-natal não surtiu efeitos negativos em fêmeas, visto que elas tiveram um aumento do comportamento exploratório e não mostraram alterações no comportamento tipo-ansioso e tipo-

depressivo, sugerindo uma maior resiliência nesses animais. Já os machos mostraram um aumento no comportamento tipo-ansioso na caixa claro-escuro e no labirinto em cruz elevado e um aumento do comportamento tipo-depressivo no teste do nado forçado. Além disso, em diferentes testes, observamos que os machos Naive tendem a explorar mais e se locomovem mais em ambientes mais aversivos em relação às fêmeas Naive (Figuras 4, 8 e 10) o que indica que etologicamente os machos são mais ativos do que as fêmeas.

Apesar de nossos testes terem sido realizados em um período pré-púbere, onde os animais ainda não estão sob os efeitos de hormônios sexuais, durante o protocolo de MS eles estavam expostos a esses hormônios, visto que a exposição aos hormônios sexuais começa durante já o desenvolvimento fetal, resultando em diferenciação sexual dos órgãos genitais, cérebro e de tecidos específicos. Durante o início da vida, o eixo hipotálamo-hipófise-gonadal está ativo, isso é importante para o desenvolvimento adequado e para a diferenciação entre os gêneros (ALTEMUS et al., 2016),s sugerindo que a exposição prévia aos hormônios sexuais pode modular o comportamento de machos e fêmeas jovens de forma distinta.

Mesmo com a inconsistência dos dados da literatura, observamos que as consequências comportamentais da separação maternal nos animais adolescentes são muito sutis. Com isso, diversos estudos têm mostrado que o estresse no início da vida pode não gerar alterações no comportamento dos animais jovens, porém os torna mais sensíveis a um segundo evento estressor durante a vida (HAN et al., 2019; PEÑA et al., 2017). Então, resolvemos testar se o estresse por separação maternal torna os animais mais vulneráveis às alterações comportamentais em resposta a um estresse agudo. Em um experimento piloto, animais machos e fêmeas que passaram pelo protocolo de MS, ao completarem 30 dias de vida, foram submetidos a 30 minutos de estresse por contenção de movimentos dentro de um tubo cônico para centrifugação de 50mL, com a extremidade fechada, contendo orifícios que permitia a ventilação. Após os 30 minutos, os animais foram imediatamente submetidos ao teste do labirinto em cruz elevado. Iniciamos os experimentos no início de 2020, e logo depois foi necessária interrupção dos experimentos devido à pandemia do novo coronavírus. Com isso, não obtivemos um número suficiente de animais para melhor avaliação (Figura 1 em anexo). O cérebro dos animais desse grupo foi perfundido 1 hora e meia após o teste para analisarmos a ativação dos neurônios da amígdala (dados ainda não obtidos).

Sabemos que o protocolo de MS altera o comportamento materno (OWN; PATEL, 2013) e que o cuidado materno influencia a função do eixo HPA em roedores e em humanos, através da modulação epigenética do receptor de glicocorticoide (SZYF et al., 2009). Camundongos adultos de mães que apresentam uma maior frequência de lambida e cuidado

maternal durante os primeiros dias de vida apresentam maior expressão do receptor de glicocorticoide no hipocampo (HELLSTROM et al., 2012). Isso favorece o mecanismo de feedback negativo exercido por esses receptores no hipocampo, reduzindo assim a atividade do eixo HPA.

Além do cuidado materno, eventos estressores no início da vida levam a alterações epigenéticas nos indivíduos. Sabe-se que um dos genes alterados pelo estresse crônico é o NR3C1, que codifica o receptor de glicocorticoide (HOLMES et al., 2019). Níveis mais baixos desses receptores induzem um aumento na atividade do eixo HPA, que resulta em respostas alteradas ao estresse. A resposta alterada ao estresse prejudica o mecanismo de feedback negativo, o que torna o indivíduo menos preparado para lidar com eventos estressores, podendo desencadear alterações comportamentais.

De fato, um estudo publicado em 2000 mostrou que ratos que não tiveram alterações no comportamento em resposta a um protocolo de estresse durante o desenvolvimento tiveram uma redução nos níveis de receptores de glicocorticoides no hipocampo quando comparados com os animais que mostraram alterações comportamentais. Isso sugere que existe um mecanismo compensatório e uma relação entre os níveis dos receptores de glicocorticoides e a alteração no comportamento dos animais (POKORNY et al., 2000). Um outro trabalho mostrou que animais que tiveram aumento do comportamento tipo-depressivo em resposta ao estresse tinham também uma redução nos níveis de receptores de glicocorticoides (GROSS et al., 2018).

Com isso, decidimos analisar os níveis de receptores de glicocorticoides no hipocampo e na amígdala dos animais através das técnicas de western blot e imuno-histoquímica. Para isso, 24 horas após o último teste comportamental, os animais foram eutanasiados e divididos em dois grupos: grupo onde os cérebros foram dissecados e armazenados em tampão de amostras com adição de inibidores de proteases e fosfatases para o western blot e grupo onde os animais foram perfundidos os cérebros fatiados e armazenados para a imuno-histoquímica. Foram realizadas algumas tentativas, sem sucesso, para padronizar o protocolo do western blot e a concentração do anticorpo. Os tecidos para a imunohistoquímica estão fatiados e armazenados no -20 °C. Novamente, devido à pandemia do novo coronavírus, nossos experimentos interrompidos por mais de um ano e assim que a situação se normalizar daremos continuidade aos protocolos afim de publicarmos nossa pesquisa.

1.7 CONCLUSÃO

A partir dos nossos resultados podemos concluir que (I) os efeitos do estresse crônico na infância diferem entre os sexos, (II) as fêmeas MS jovens tiveram um aumento do comportamento locomotor e exploratório e que (III) machos tiveram um aumento do comportamento tipo-ansioso e tipo-depressivo. Assim observamos que as fêmeas jovens são mais resilientes aos efeitos do estresse crônico pós-natal do que os machos jovens.

2. CAPÍTULO 2: O AUMENTO DO TÔNUS DOPAMINÉRGICO DURANTE O ESTRESSE PÓS-NATAL INTERFERIU NOS EFEITOS COMPORTAMENTAIS DO ESTRESSE

2.1.1 Estresse e neurotransmissores

Vimos no primeiro capítulo que o estresse crônico durante o neurodesenvolvimento pode levar a alterações comportamentais e morfológicas. Além dessas alterações, dados publicados em 2004 mostraram que o estresse crônico durante o neurodesenvolvimento pode alterar também os níveis de monoaminas e seus metabólitos no hipocampo e na amígdala de animais machos e fêmeas quando adultos (BOWMAN et al., 2004). Evidências genéticas, farmacológicas e bioquímicas sustentam a hipótese do envolvimento de distúrbios da sinalização dopaminérgica em muitos dos transtornos neuropsiquiátricos (MONEY; STANWOOD, 2013; SOUZA et al., 2006; SOUZA; TROPEPE, 2011). Além disso, sabe-se que o sistema dopaminérgico está envolvido na estratégia de enfrentamento (*coping*) ao estresse (BAIK, 2020; CABIB; PUGLISI-ALLEGRA, 2012; HÖGLUND et al., 2017)

2.1.2 Sistema dopaminérgico

Um dos neurotransmissores que sofrem modulação através do estresse é a dopamina. A dopamina foi primeiramente descrita em cérebros humanos por Kathleen Montagu em 1957 (MONTAGU, 1957). Ainda em 1957, Arvid Carlsson demonstrou que a dopamina é um neurotransmissor, e que também está presente em cérebros de animais (CARLSSON et al., 1957). Hoje nós sabemos que a dopamina é um neurotransmissor catecolaminérgico, ou seja, possui um grupo catecol ligado a um grupamento amina e que se origina do aminoácido tirosina, podendo ser obtido através da alimentação ou por produção endógena. A enzima tirosina hidroxilase converte a tirosina em L-Dopa (1-3,4-diidroxifenilalanina), e por fim, a enzima aminoácido aromático descarboxilase converte L-Dopa em dopamina (Figura 16) (BLASCHKO, 1942).

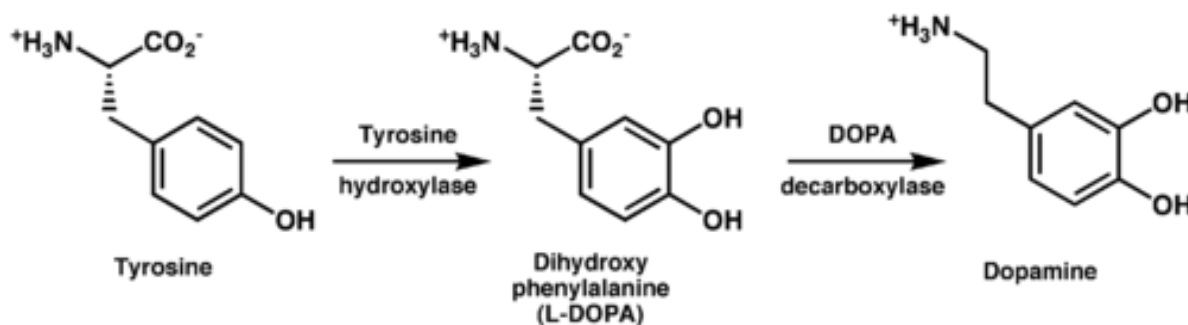


Figura 16: Síntese de dopamina. A síntese de dopamina se dá através da ação da enzima tirosina hidroxilase na molécula de tirosina, obtida através da alimentação ou por produção endógena, originando a L-Dopa (1-3,4-diidroxifenilalanina). A L-Dopa por sua vez, é convertida em dopamina através da ação enzimática da enzima DOPA descarboxilase.

Os circuitos neurais nos quais os neurônios dopaminérgicos fazem parte são circuitos responsáveis por diferentes funções fisiológicas e comportamentais, como por exemplo controle motor, sono, atenção, memória de trabalho, regulação hormonal da liberação de prolactina, aprendizado e sistema de recompensa (GIRAULT; GREENGARD, 2004; SCHULTZ, 1997). São bem conhecidas cinco diferentes vias dopaminérgicas no cérebro humano (Figura 17), que possuem funções distintas, porém seus circuitos são conectados, tornando um sistema complexo e interligado (BJÖRKLUND; DUNNETT, 2007). Abaixo serão descritas cada uma dessas vias:

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

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

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

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

(5) Talâmica - Trata-se de uma via que inerva o tálamo nos primatas e tem sua origem em diferentes lugares do cérebro. Suas funções ainda não estão totalmente esclarecidas.

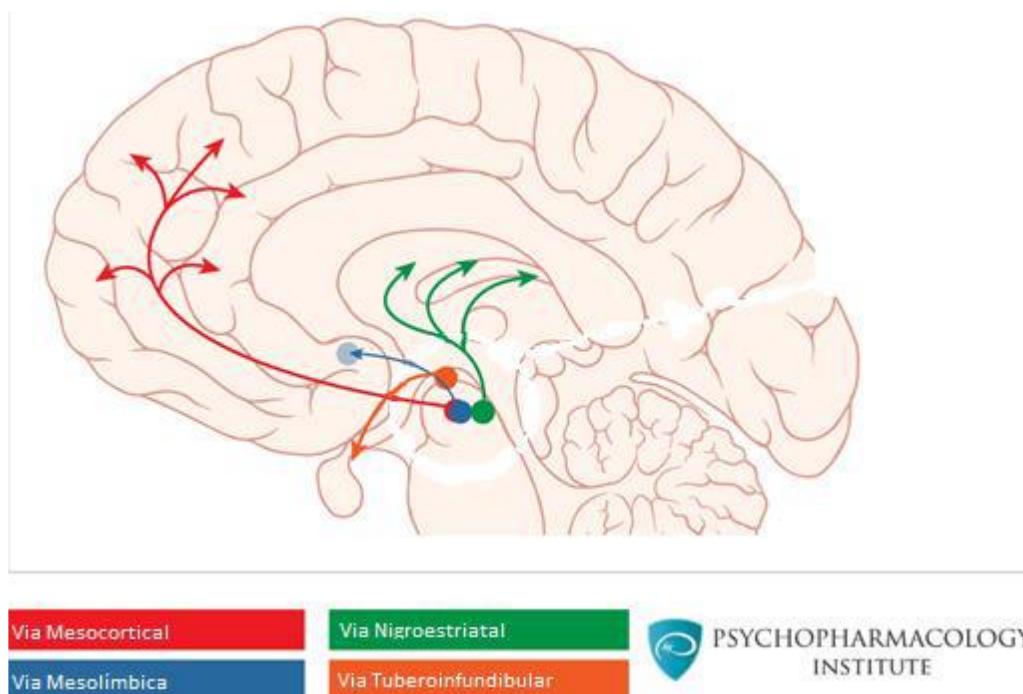


Figura 17: Vias dopaminérgicas no cérebro humano. São bem conhecidas cinco diferentes vias dopaminérgicas no cérebro humano: (I) via mesolímbica, (II) via mesocortical, (III) via nigroestriatal, (IV) via tuberoinfundibular e (V) via talâmica (não mostrada na figura). Cada uma dessas vias é responsável por funções fisiológicas e comportamentais distintas, porém, existe uma conexão entre elas tornando o sistema dopaminérgico um sistema complexo e interligado. Adaptado de Psychopharmacology Institute - First-Generation Antipsychotics: An Introduction <http://psychopharmacologyinstitute.com/antipsychotics/first-generation-antipsychotics/>

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

A família dos receptores D1 compreende os receptores D1 e D5, que estão presentes no terminal pós-sináptico e estão associados à proteína G estimulatória (Gs), se assemelham por terem o terceiro loop citoplasmático curto e uma grande cauda C-terminal. O receptor D1 está distribuído principalmente nas áreas nigroestriatais, mesolímbica e mesocorticais (MISSALE et al., 1998). O receptor D5 possui maior afinidade pela dopamina, e em contrapartida, tem uma

menor densidade no cérebro de mamíferos em comparação com o receptor D1, encontra-se em regiões como o córtex pré-frontal, córtex pré-motor, substância negra, hipotálamo, hipocampo e giro denteado.

A família D2 compreende os receptores D2, D3 e D4 e está associada à proteína G inibitória (Gi) (NEVE; SEAMANS; TRANTHAM-DAVIDSON, 2004). Esses receptores se encontram tanto nos terminais pré-sinápticos como nos pós-sinápticos e estão presentes no estriado, núcleo accumbens e tubérculo olfatório. São ainda encontrados, em menor densidade na substância negra, VTA, hipotálamo, áreas corticais, septum, amígdala e hipocampo (MISSALE et al., 1998; SEEMAN, 2006). Estes receptores apresentam o terceiro loop citoplasmático longo e uma cauda C-terminal curta, ao contrário dos receptores da família D1 (MISSALE et al., 1998).

A ativação de receptores D1 (Figura 18) promove formação de AC que forma o segundo mensageiro cAMP e, conseqüentemente, leva a ativação da proteína quinase A (PKA) aumentando a fosforilação da Fosfoproteína Regulada por Dopamina de 32 kD (DARPP-32) (NEVE; SEAMANS; TRANTHAM-DAVIDSON, 2004). A DARPP-32 tem um importante papel na integração da sinalização intracelular (SVENNINGSSON et al., 2004), pois é um potente inibidor da proteína fosfatase-1 (PP-1) que é responsável por desfosforilar diversas proteínas com amplas funções celulares (BEAULIEU; GAINETDINOV, 2011; SVENNINGSSON et al., 2004). Além disso, a DARPP-32 integra a sinalização intracelular por ser regulada por diversos receptores de membrana, tais como, GABA e NMDA. A ativação dos receptores dopaminérgicos D2 (Figura 18) é conhecida por regular processos intracelulares que são fundamentais para o neurodesenvolvimento, transcrição de genes e proliferação celular, inibindo a formação de AC e conseqüentemente diminuindo a ativação de cAMP e PKA e reduzindo a fosforilação DARPP-32 (NEVE; SEAMANS; TRANTHAM-DAVIDSON, 2004).

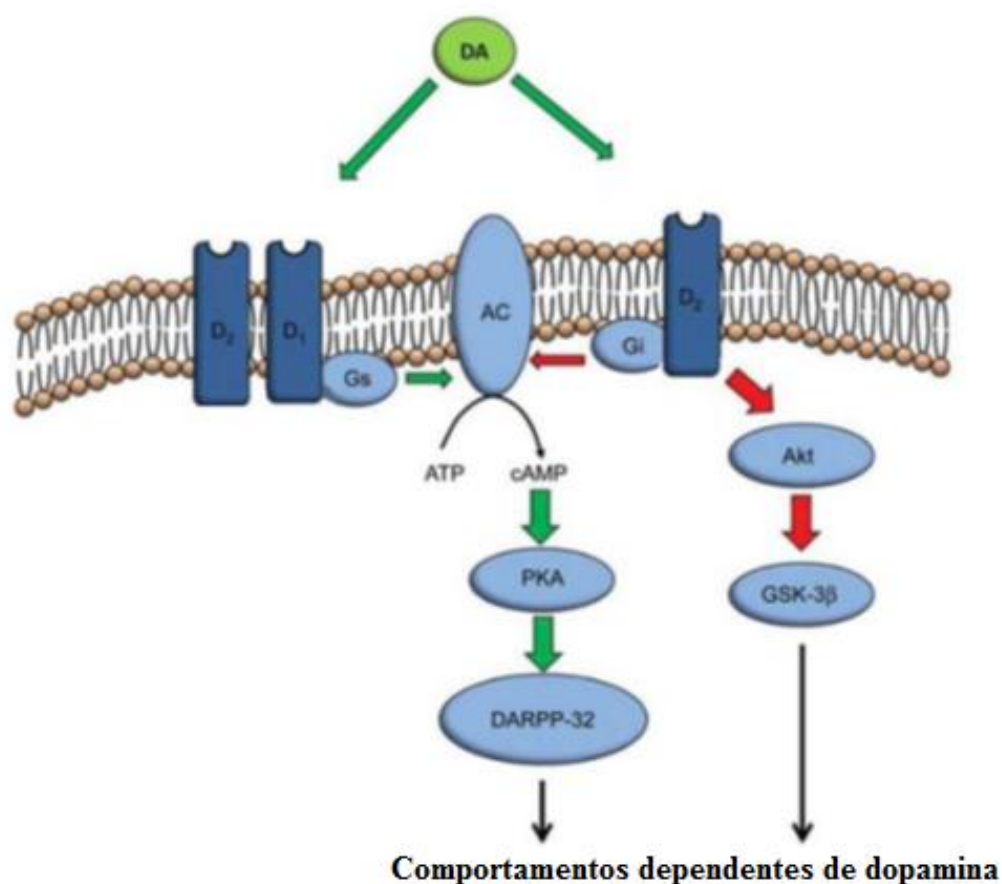


Figura 18: Cascata de sinalização intracelular após a ativação dos receptores dopaminérgicos. Adaptado de SOUZA e TROPEPE, 2011

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

2.1.3 Dopamina e neurodesenvolvimento

O início da síntese de dopamina e da expressão dos seus receptores ocorre já durante o desenvolvimento fetal dos mamíferos (ARAKI, K.Y., SIMS, J.R., AND BHIDE, 2007; SHEARMAN; ZEITZER; WEAVER, 1997). Os neurônios dopaminérgicos surgem por volta da 6^a - 8^a semana de gestação em seres humanos (SUNDSTRÖM *et al.*, 1993) e em camundongos por volta dos dias 10 – 15 de gestação, ocorrendo mais cedo em fêmeas do que em machos (SEIGER; OLSON, 1973). As inervações dopaminérgicas se tornam maduras

apenas no final da adolescência, mesmo começando a serem expressas no início do desenvolvimento embrionário. Em camundongos, isso ocorre por volta do dia pós-natal 60, quando os animais já passam a ser considerados adultos (MONEY; STANWOOD, 2013). Esse longo amadurecimento permite uma ampla janela de período crítico no desenvolvimento, onde qualquer alteração pode induzir efeitos a longo prazo.

Após o nascimento de roedores, a expressão dos receptores é baixa, e aumenta progressivamente até atingir níveis vistos em adultos entre os dias pós-natal 14 e 21, sugerindo diferenças na regulação traducional dos receptores de DA em diferentes fases de desenvolvimento (ARAKI; SIMS; BHIDE, 2007; GELBARD et al., 1989; SCHAMBRA et al., 1994). A migração dos neurônios dopaminérgicos para suas posições finais se inicia durante o período embrionário e termina nas primeiras semanas pós-natais. Em ratos, esse processo parece estar terminada em torno da terceira semana pós-natal (PRAKASH; WURST, 2006).

Os fatores genéticos determinam o desenvolvimento básico do cérebro, contudo, o desenvolvimento dos circuitos neurais se dá através da ação de neurotransmissores e neuromoduladores. A ativação dos receptores dopaminérgicos modula a migração, proliferação e diferenciação neuronal no cérebro de embriões. Um estudo mostrou que antes mesmo da inervação dopaminérgica ser formada, os receptores dopaminérgicos já estão farmacologicamente ativos (SILLIVAN; KONRADI, 2011), sugerindo que o equilíbrio fisiológico na ativação dos receptores dopaminérgicos é importante para o neurodesenvolvimento (CRANDALL et al., 2007; MONEY; STANWOOD, 2013; SOUZA; ROMANO-SILVA; TROPEPE, 2011). Os receptores dopaminérgicos, principalmente D3, são muito expressos durante o desenvolvimento do cérebro, predominantemente nas zonas germinativas neuroepiteliais, que são ativamente envolvidas na neurogênese no prosencéfalo basal, dando base para a hipótese de que a dopamina desempenha um papel no desenvolvimento do cérebro durante a neurogênese (DIAZ et al., 1997). Além disso, níveis elevados dos receptores D1 foram encontrados no cérebro de camundongos no período perinatal. A ativação desses receptores modula a transcrição de diversos genes. Portanto, a ativação anormal do sistema dopaminérgico durante um período crítico de desenvolvimento pode gerar alterações duradouras no cérebro do indivíduo (HERLENIUS; LAGERCRANTZ, 2004).

Sabemos que um desequilíbrio na sinalização dopaminérgica pode afetar diversos comportamentos, o que é observado em pacientes com transtornos psiquiátricos, tais como esquizofrenia, déficit de atenção de hiperatividade, transtorno bipolar, dentre outros. Além disso, estudos demonstraram que pacientes com diferentes distúrbios psiquiátricos apresentam alterações no desenvolvimento do cérebro, antes mesmo dos sintomas aparecerem (INSEL,

2010), o que sugere que essas alterações comportamentais podem ser consequências de um problema neurodesenvolvimental. Com isso, existem evidências de que um desbalanço na sinalização dopaminérgica, mesmo que transitório, pode gerar prejuízos no neurodesenvolvimento, o que conseqüentemente leva a alterações duradouras na estrutura e função do cérebro maduro (JONES et al., 2000; SHEARMAN; ZEITZER; WEAVER, 1997). Existem vários fatores que podem contribuir para uma alteração da sinalização dopaminérgica durante o neurodesenvolvimento, sendo um desses fatores o estresse crônico.

2.1.4 Dopamina e estresse

Os circuitos neurais, em resposta ao estresse agudo, agem de forma a manter o organismo em alerta para enfrentar os desafios e para lidar com uma possível situação de perigo. Em contrapartida, a resposta prolongada do organismo ao estresse, promove componentes adaptativos de forma a retornar ao estado de homeostase do organismo. Portanto, as flutuações na liberação de neurotransmissores são importantes para a resposta do organismo ao estresse.

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

Como vimos anteriormente, o estresse agudo leva ao aumento da atividade dos neurônios dopaminérgicos na VTA logo após a ocorrência do evento estressor (VALENTI;

LODGE; GRACE, 2011). De forma contrária, algumas horas após o estresse agudo ou o estresse crônico há uma diminuição da atividade dos neurônios dopaminérgicos na VTA, na amígdala e no hipocampo ventral (CHANG; GRACE, 2013; LIN et al., 2016; MOORE, 2001; VALENTI; GILL; GRACE, 2012). Estas alterações indicam que, diferentemente do estresse agudo, que estimula o sistema dopaminérgico nas vias mesolímbica e mesocortical, o estresse crônico ou um tempo após o estresse agudo conduz a uma redução no número de neurônios dopaminérgicos ativos, sendo este um processo fisiológico de adaptação ao estresse. Um outro estudo mostrou que a administração de antagonista dos receptores noradrenérgicos tanto sistemicamente, quanto intra-amígdala basolateral (BLA) reverteu essa diminuição da atividade dos neurônios dopaminérgicos, sugerindo que os sistemas noradrenérgico e dopaminérgico interagem para gerar uma resposta apropriada a eventos estressores (CHANG; GRACE, 2013). É provável que a ação noradrenérgica sobre os neurônios dopaminérgicos da VTA seja modulada pela BLA.

Uma explicação para esses efeitos no sistema dopaminérgico seria que o aumento imediato na atividade dos neurônios dopaminérgicos logo após o evento estressor poderia facilitar o mecanismo de luta ou fuga, e a posterior atenuação da atividade desses neurônios poderia impedir uma segunda ocorrência do evento estressor.

Vimos que o sistema dopaminérgico está intimamente relacionado com a resposta fisiológica aos eventos estressores, com isso se torna importante compreender o papel do sistema dopaminérgico dentro do complexo mecanismo dos efeitos gerados pelo estresse crônico durante o desenvolvimento.

2.2 JUSTIFICATIVA E HIPÓTESE

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

O estresse pode alterar as vias de sinalização dopaminérgica, essas alterações sugerem que o desenvolvimento de vias neurais pode ser permanentemente alterado como resultado do estresse sofrido em um período crítico de neurodesenvolvimento. O mau desenvolvimento destas vias pode favorecer o desenvolvimento de esquizofrenia, TDAH, autismo, transtornos de ansiedade, depressão e outros distúrbios neuropsiquiátricos. Deste modo, torna-se essencial

o melhor entendimento do papel do sistema dopaminérgico sobre os efeitos gerados pelo estresse durante o desenvolvimento.

Estudos mostram que o estresse crônico diminui a ativação dos neurônios dopaminérgicos nas vias mesolímbica e mesocortical e que sinalização do sistema dopaminérgico está envolvida na estratégia de enfrentamento (*coping*) ao estresse. A principal hipótese desse estudo é que o tratamento com L-Dopa durante o estresse crônico de separação maternal reverte os efeitos gerados pela diminuição da sinalização dopaminérgica e/ou a estratégia de enfrentamento ao estresse. Nossos resultados poderão contribuir para a elucidação do papel da dopamina nas alterações fisiológicas e comportamentais geradas pelo estresse.

2.3 OBJETIVOS

2.3.1 Geral

Estudar os efeitos morfológicos, fisiológicos e comportamentais gerados pela interação entre o desequilíbrio da sinalização dopaminérgica e o estresse crônico por separação maternal.

2.3.2 Específicos

- (I) Investigar os efeitos da administração de L-Dopa do P2 ao P14 no comportamento exploratório, locomotor e tipo-ansioso de animais jovens.
- (II) Investigar os efeitos do aumento da sinalização dopaminérgica em conjunto com o estresse crônico pós-natal no comportamento tipo-ansioso em camundongos C57/BL6 jovens.
- (III) Analisar se o desequilíbrio da sinalização dopaminérgica e/ou o estresse pós natal altera os níveis de receptores de glicocorticoides no hipocampo e amígdala de camundongos C57/BL6.

2.4 MATERIAIS E MÉTODOS

2.4.1 Animais

Foram utilizados camundongos fêmeas e machos da espécie C57/BL6, com idade entre 8 e 10 semanas. As fêmeas foram mantidas em gaiolas dentro de estantes ventiladas com

temperatura de $22 \pm 1^\circ\text{C}$ e umidade 40-70%, em ciclo claro-escuro de 12/12 horas, e tiveram livre acesso à ração e água. Os machos foram mantidos separadamente das fêmeas, nas mesmas condições ambientais, e foram utilizados como matrizes para os cruzamentos. Todos os protocolos foram aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA: 86/2016 e 201/2019)

2.4.2 Grupos experimentais e protocolo de separação maternal

Macho e fêmeas (proporção 1:2) foram alocados em caixas conjuntamente por sete dias. Após este período os animais foram novamente separados e a gestação das fêmeas foi acompanhada até o nascimento dos filhotes. As fêmeas foram mantidas em caixas separadas após o 19o provável dia de gestação.

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

O protocolo de separação maternal foi feito conforme descrito no capítulo 1.

2.4.3 Testes de comportamento

Ao completarem quatro semanas os animais foram submetidos a testes comportamentais com o objetivo de avaliar alterações comportamentais em decorrência do estresse de separação maternal juntamente com a administração de L-Dopa. Os testes comportamentais foram feitos conforme já citado no primeiro capítulo.

2.4.4 Análise estatística

Os resultados serão demonstrados através da média, para dados paramétricos, ou mediana, para dados não paramétricos, \pm erro padrão da média/mediana. Para analisar os efeitos da administração de L-Dopa utilizamos Two Way ANOVA, seguida do teste post-hoc Tukey. Grau de significância ($p < 0,05$).

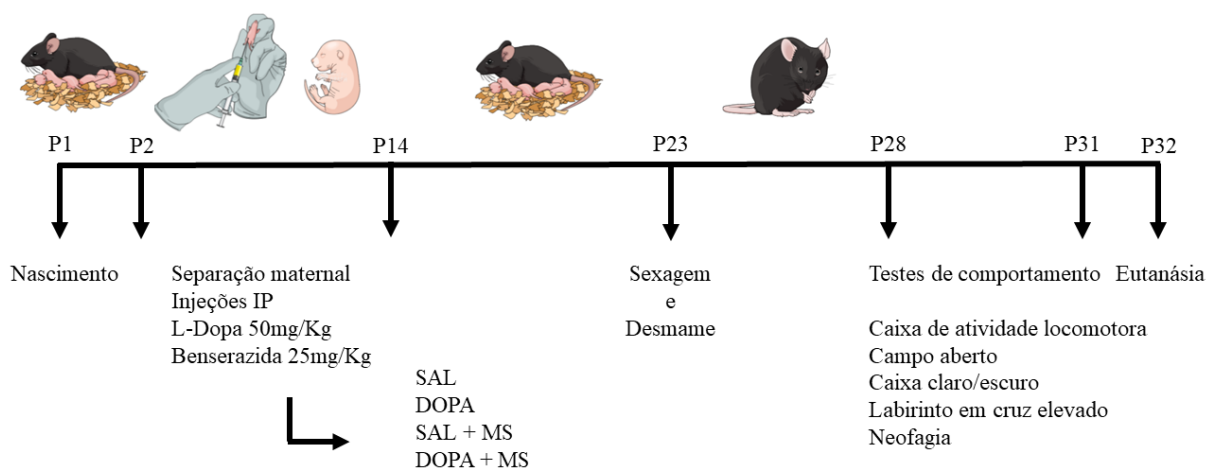


Figura 19: Procedimento experimental 2. Os animais foram divididos em quatro diferentes grupos: animais que receberam uma injeção de salina diariamente do P2 ao P14 (SAL), animais que receberam uma injeção de L-Dopa 50mg/Kg diariamente durante o mesmo período (DOPA), animais que receberam salina e foram submetidos ao protocolo de MS (SAL + MS) e animais que receberam L-Dopa e passaram pelo protocolo de MS (DOPA + MS). No P23 os animais foram separados em caixas por sexo e do P28 ao P32 eles foram submetidos aos testes comportamentais. 24 horas após o último teste de comportamento os animais foram eutanasiados e os tecidos armazenados para posteriores análises.

2.5 RESULTADOS

2.5.1 O estresse por separação maternal juntamente com a administração de L-Dopa aumentou o comportamento locomotor de fêmeas, mas não de machos jovens

Investigamos se a administração de L-Dopa juntamente com o estresse pós-natal alterou o comportamento locomotor e exploratório dos animais. Para isso, machos e fêmeas foram submetidos ao teste da caixa de atividade locomotora e os seguintes parâmetros foram avaliados: distância total percorrida e número de rearings.

No parâmetro distância percorrida, para fêmeas, vimos que houve uma diferença significativa no fator MS ($p = 0,020$), além de uma pequena diferença no fator L-Dopa ($p = 0,075$) e que não houve uma interação entre os fatores ($p = 0,136$). Na análise de múltiplas comparações (Tukey test) vimos que as fêmeas MS + Dopa apresentaram um aumento da distância percorrida em relação às fêmeas DOPA ($p = 0,004$) e fêmeas MS + SAL ($p = 0,024$) (Figura 20A). Ao analisarmos o mesmo parâmetro nos machos, vimos que existe uma diferença no fator MS ($p = 0,016$), e não houve diferença no fator L-Dopa ($p = 0,847$), assim como não houve uma interação entre os fatores ($p = 0,242$). Na análise do Tukey test, vimos que houve diferença significativa apenas entre os grupos SAL e MS + SAL, onde os machos que passaram pelo protocolo de MS e receberam injeções de salina apresentaram um aumento da distância percorrida ($p = 0,011$) (Figura 20C).

Quando analisamos o número de rearings em fêmeas, vimos que não existe diferença significativa entre os grupos levando em consideração o fator MS ($p = 0,477$), o fator L-Dopa ($p = 0,479$) e a interação entre os dois fatores ($p = 0,737$) (Figura 20B). Em machos nós também não observamos diferenças significativas no fator MS ($p = 0,954$), L-Dopa ($p = 0,871$), assim como também não foi vista uma interação entre os fatores ($p = 0,383$) (Figura 20D).

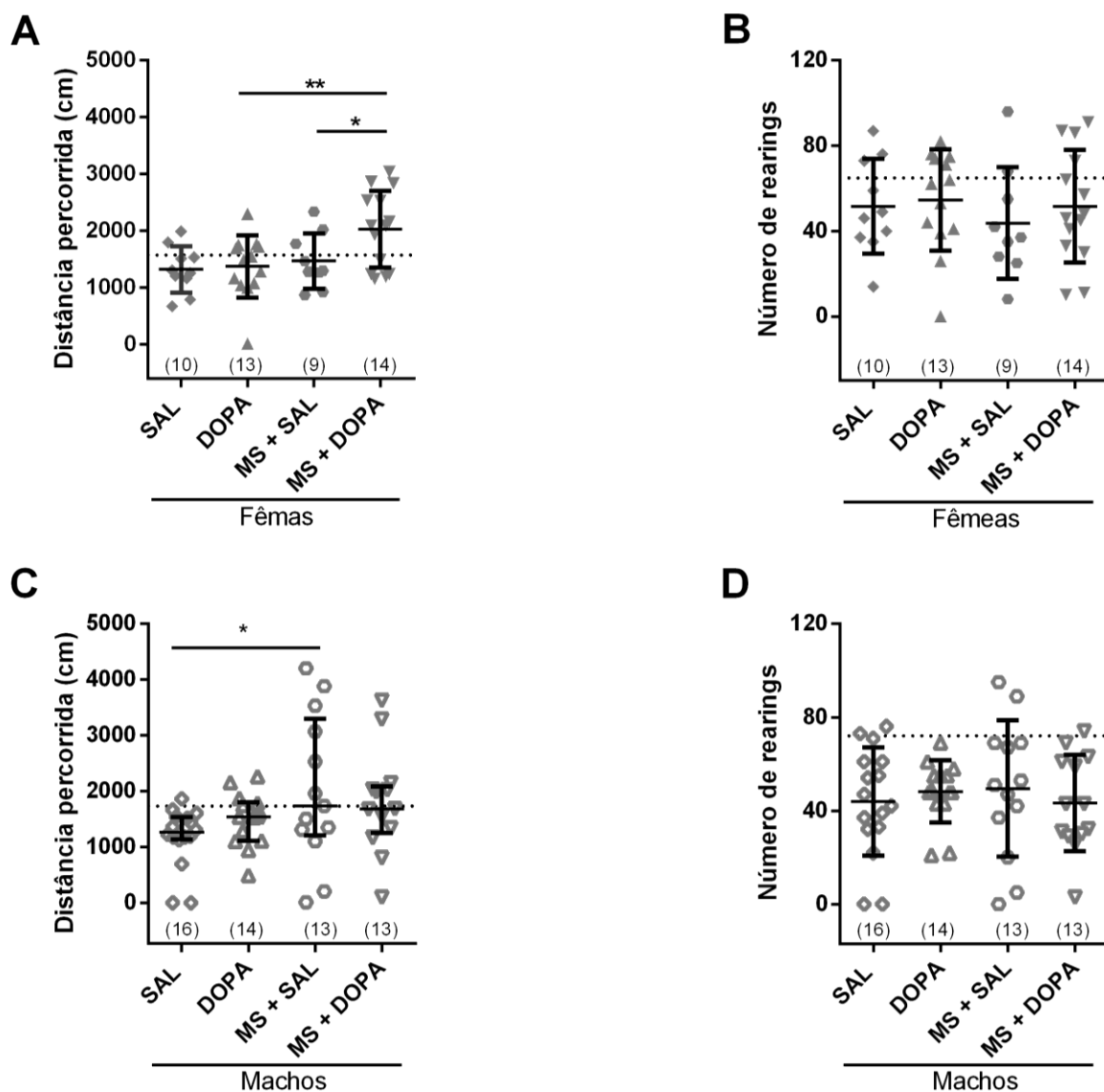


Figura 20: Fêmeas MS + DOPA apresentaram um aumento do comportamento locomotor no teste da caixa de atividade locomotora. Animais que passaram pelo protocolo de separação maternal e/ou receberam salina ou L-Dopa foram submetidos ao teste da caixa de atividade locomotora. Machos e fêmeas tiveram 10 minutos para explorar o aparato e os seguintes parâmetros foram avaliados: distância total percorrida (A e C) e número de rearings (C e D). A linha pontilhada representa a média dos animais MS. Número de animais em parênteses. Média \pm SEM; Two Way ANOVA seguida do Teste de Tukey * = $p < 0,05$ ** = $p < 0,01$.

2.5.2 O estresse por separação maternal juntamente com a administração de L-Dopa aumentou o comportamento locomotor de fêmeas em ambientes menos aversivos

Uma outra maneira de avaliar o comportamento locomotor e exploratório dos animais é através do teste de campo aberto. Para isso, animais machos e fêmeas foram colocados no aparato por 5 minutos para livre exploração e os parâmetros tempo no centro, cruzamentos no centro e na periferia e número de rearings foram quantificados.

No parâmetro tempo no centro de fêmeas, vimos que não teve diferença significativa no fator MS ($p = 0,211$), no fator L-Dopa ($p = 0,679$) e não houve uma interação entre os fatores ($p = 0,680$) (Figura 21A). Em contrapartida, ao avaliarmos o mesmo parâmetro em machos, vimos que existe uma interação entre os fatores MS e L-Dopa ($p = 0,013$), mas ao avaliarmos os fatores isoladamente não vimos diferença em relação à MS ($p = 0,804$) e em relação à L-Dopa ($p = 0,641$). Quando fizemos a análise de múltiplas comparações vimos que os machos DOPA tiveram um aumento do tempo no centro em relação aos machos SAL ($p = 0,028$) e que os machos MS + SAL tiveram uma leve tendência a aumentar o tempo no centro em relação aos machos SAL ($p = 0,097$) e que os machos MS + DOPA tiveram uma leve redução no tempo no centro em relação aos machos DOPA ($p = 0,059$) (Figura 21E)

Quando analisamos o número de rearings em fêmeas, não observamos diferenças levando em consideração o fator MS ($p = 0,241$), L-Dopa ($p = 0,753$) e também não vimos uma interação entre ambos os fatores ($p = 0,684$). Da mesma forma, os machos também não mostraram diferenças no fator MS ($p = 0,305$), L-Dopa ($p = 0,578$) e não vimos uma interação entre os fatores nesses animais ($p = 0,972$) (Figura 21F).

No parâmetro cruzamentos na periferia em fêmeas, vimos que existe uma diferença significativa no fator MS ($p = 0,034$) mas que não tem diferença no fator L-Dopa ($p = 0,835$) e também não há uma interação entre os fatores ($p = 0,350$). Na análise de múltiplas comparações vimos que as fêmeas MS + DOPA tiveram um aumento dos cruzamentos na periferia em relação às fêmeas DOPA ($p = 0,017$) (Figura 21C). Em machos, esse mesmo parâmetro não mostrou diferença entre os grupos, onde o fator MS teve uma leve tendência com valor de $p = 0,096$ o fator L-Dopa $p = 0,335$ e a interação entre MS e L-Dopa teve um $p = 0,253$ (Figura 21G).

O último parâmetro avaliado no teste de campo aberto foram os cruzamentos no centro. Ao analisarmos as fêmeas, vimos que nem o fator MS ($p = 0,8511$) nem o fator L-Dopa ($p = 0,118$) mostrou diferença significativa, assim como também não vimos uma interação entre os fatores ($p = 0,389$). (Figura 21D). Assim como nas fêmeas, também não observamos diferenças

em machos no fator MS ($p = 0,062$), apesar de haver uma tendência, L-Dopa ($p = 0,544$) e interação entre os fatores MS e L-Dopa ($p = 0,202$) (Figura 21H).

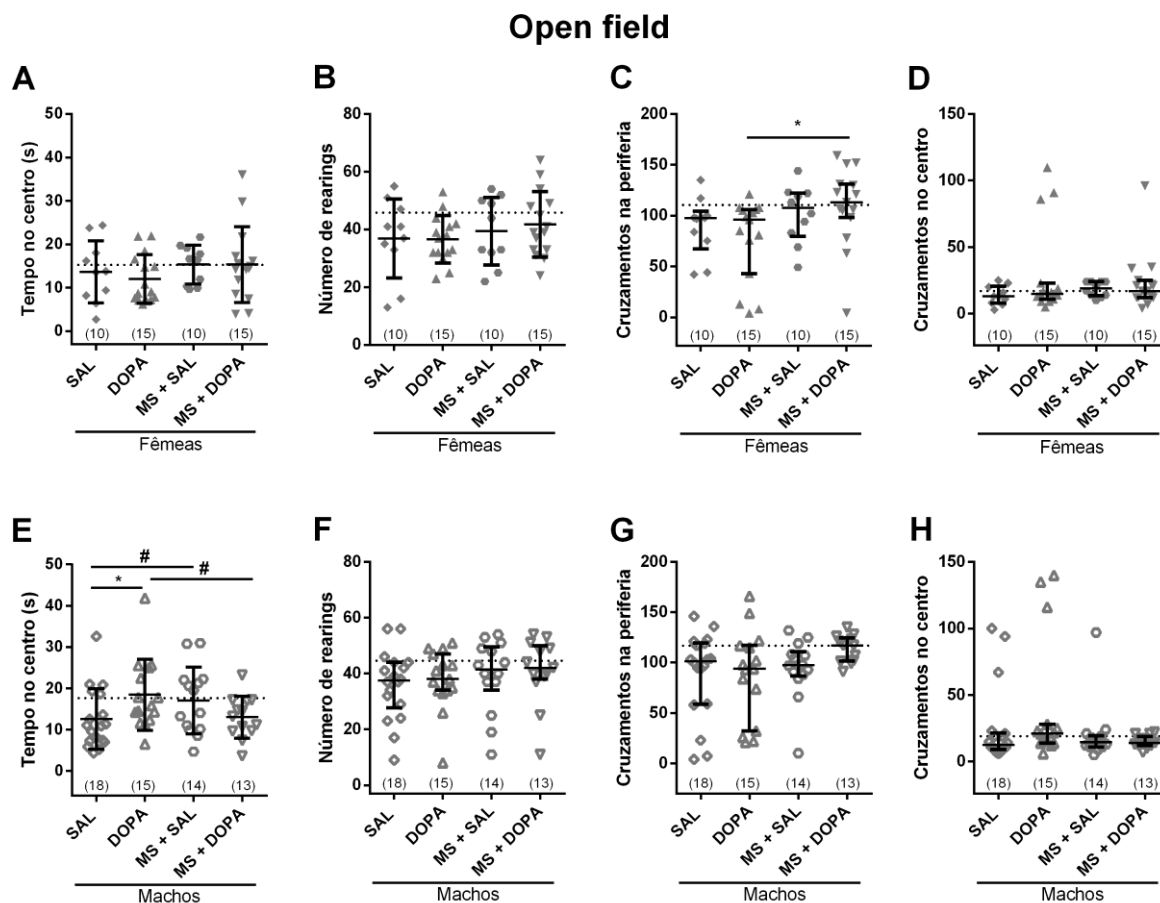


Figura 21: Efeito do estresse pós-natal juntamente com a administração de L-Dopa no teste do campo aberto. Animais que passaram pelo protocolo de separação maternal e/ou receberam salina ou L-Dopa foram submetidos ao teste do campo aberto. Machos e fêmeas tiveram 5 minutos para explorar o aparato e os seguintes parâmetros foram avaliados: tempo no centro (A e E), número de rearings (B e F), cruzamentos na periferia (C e G) e cruzamentos no centro (D e H). A linha pontilhada representa a média dos animais MS. Número de animais em parênteses. Média \pm SEM; Two Way ANOVA seguida do Teste de Tukey * = $p < 0,05$ # = $p < 0,09$.

2.5.3 Caixa claro/escuro

A caixa claro/escuro foi utilizada para avaliar o comportamento tipo-ansioso dos animais machos e fêmeas que passaram pelo protocolo de separação maternal e/ou receberam injeções de L-Dopa ou salina. Os animais foram colocados no ambiente claro e o tempo de latência para a primeira entrada no ambiente escuro foi quantificado, além disso, analisamos o tempo total que o animal permaneceu no claro e o número de transições entre os ambientes.

Na latência de fêmeas, não vimos diferenças significativas no fator MS ($p = 0,987$) e no fator L-Dopa ($p = 0,843$) também não vimos uma interação entre os fatores ($p = 0,553$) (Figura 22A). Em machos não houve diferença no fator MS ($p = 0,447$) e não vimos interação entre os fatores ($p = 0,155$), porém, ao avaliarmos o fator L-Dopa observamos que há uma diferença significativa ($p = 0,014$). Na análise de múltiplas comparações, vimos que machos DOPA apresentaram uma redução do tempo de latência em relação aos machos SAL ($p = 0,005$) (Figura 22D).

Ao avaliarmos o tempo no ambiente claro vimos que as fêmeas mostraram uma diferença significativa na interação entre os fatores MS e L-Dopa ($p = 0,009$), mas não observamos diferenças no fator MS ($p = 0,772$) e no fator L-Dopa ($p = 0,767$). Na análise do Tukey test vimos que fêmeas DOPA ficaram mais tempo no claro em relação às SAL ($p = 0,037$). Assim como vimos que fêmeas MS + SAL também tiveram uma leve diferença para permanecer mais tempo no claro em relação aos animais SAL ($p = 0,056$). Além disso, o grupo MS + DOPA mostrou uma pequena diferença por ficar menos tempo no ambiente claro em comparação com as fêmeas DOPA ($p = 0,090$) (Figura 22B). Os machos mostraram uma diferença no fator MS ($p = 0,019$) mas não no fator L-Dopa ($p = 0,626$) e também não teve interação entre os fatores ($p = 0,727$). Na análise de múltiplas comparações vimos apenas uma leve diferença a permanecer mais tempo no claro dos machos MS + DOPA em comparação com os machos DOPA ($p = 0,062$) (Figura 22E).

Quando analisamos o número de transições entre os ambientes claro e escuro, vimos que as fêmeas não mostraram diferenças significativas no fator MS ($p = 0,962$), no fator L-Dopa ($p = 0,124$) e não observamos uma interação entre os fatores ($p = 0,416$) (Figura 22C). Assim como as fêmeas, machos também não mostraram uma diferença significativa no fator MS ($p = 0,247$), L-Dopa ($p = 0,579$) e não houve uma interação entre os dois fatores ($p = 0,137$) (Figura 22F).

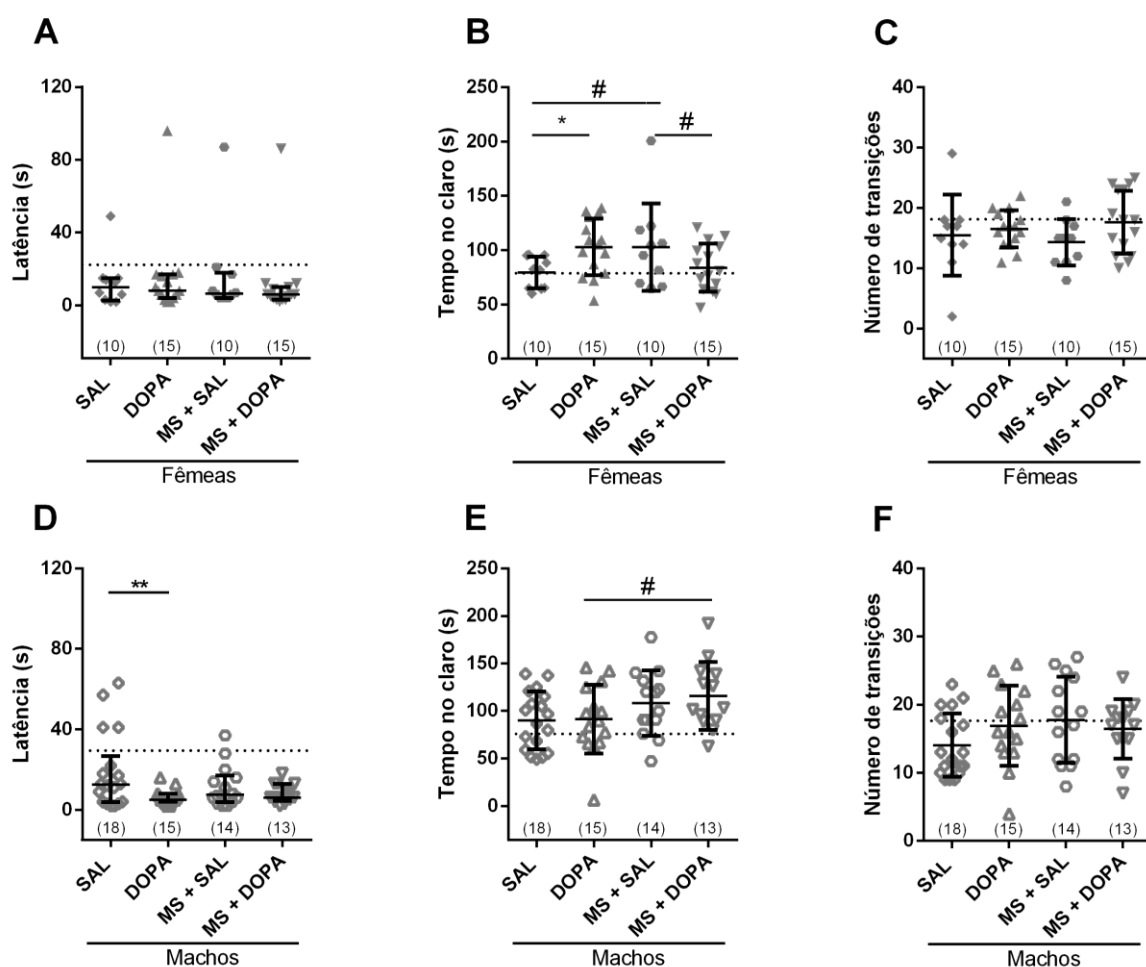


Figura 22: Efeito do estresse pós-natal juntamente com a administração de L-Dopa no comportamento tipo-ansioso. Animais que passaram pelo protocolo de separação maternal e/ou receberam salina ou L-Dopa foram submetidos ao teste da caixa claro/escuro. Machos e fêmeas tiveram 5 minutos após a latência para explorar o aparato e os seguintes parâmetros foram avaliados: latência para a primeira entrada no ambiente escuro (A e D), tempo no compartimento claro (B e E) e número de transições entre os ambientes (C e F). A linha pontilhada representa a média dos animais MS. Número de animais em parênteses. Média \pm SEM; Two Way ANOVA seguida do Teste de Tukey * = $p < 0,05$ ** = $p < 0,01$ # = $p < 0,09$.

2.5.4 Labirinto em cruz elevado

Além da caixa claro/escuro, utilizamos também o teste de labirinto em cruz elevado para analisar o comportamento tipo-ansioso dos animais. Para isso os animais foram colocados na região central do labirinto e puderam explorar durante 5 minutos os braços abertos e fechados. Além do tempo nos braços abertos, quantificamos também as entradas nos braços abertos, o número de rearings, dippings e tempo nas extremidades.

Em fêmeas, vimos que as entradas nos braços abertos não mostraram diferenças entre os grupos no fator MS ($p = 0,198$), no fator L-Dopa ($p = 0,269$) e não vimos uma interação entre os fatores ($p = 0,729$) (Figura 23A).

No parâmetro tempo nos braços abertos, não observamos diferença significativa no fator MS ($p = 0,354$), assim como não vimos diferenças no fator L-Dopa ($p = 0,153$) e não detectamos uma interação entre os dois fatores ($p = 0,219$) (Figura 23B)

Ao analisarmos o comportamento exploratório das fêmeas, não vimos diferenças entre os grupos nem no número de rearings nem no número de dippings. O fator MS teve um valor de $p = 0,090$ nos rearings, o que representa uma pequena diferença, e $p = 0,0860$, nos dippings, já o fator L-Dopa teve um valor de $p = 0,733$ nos rearings e $p = 0,770$ nos dippings e por fim, não vimos uma interação entre os fatores MS e L-Dopa tanto nos rearings ($p = 0,097$), apesar de observarmos uma leve diferença, quanto nos dippings ($p = 0,559$) (Figura 23C e 23D).

As extremidades dos braços abertos do labirinto são os locais mais aversivos do aparato, os animais que permanecem menos tempo nesse lugar apresentam um aumento do comportamento tipo-ansioso. Vimos que as fêmeas jovens não tiveram diferença nesse parâmetro no fator MS ($p = 0,617$), no fator L-Dopa ($p = 0,324$) e não observamos interações entre os fatores ($p = 0,306$) (Figura 23E).

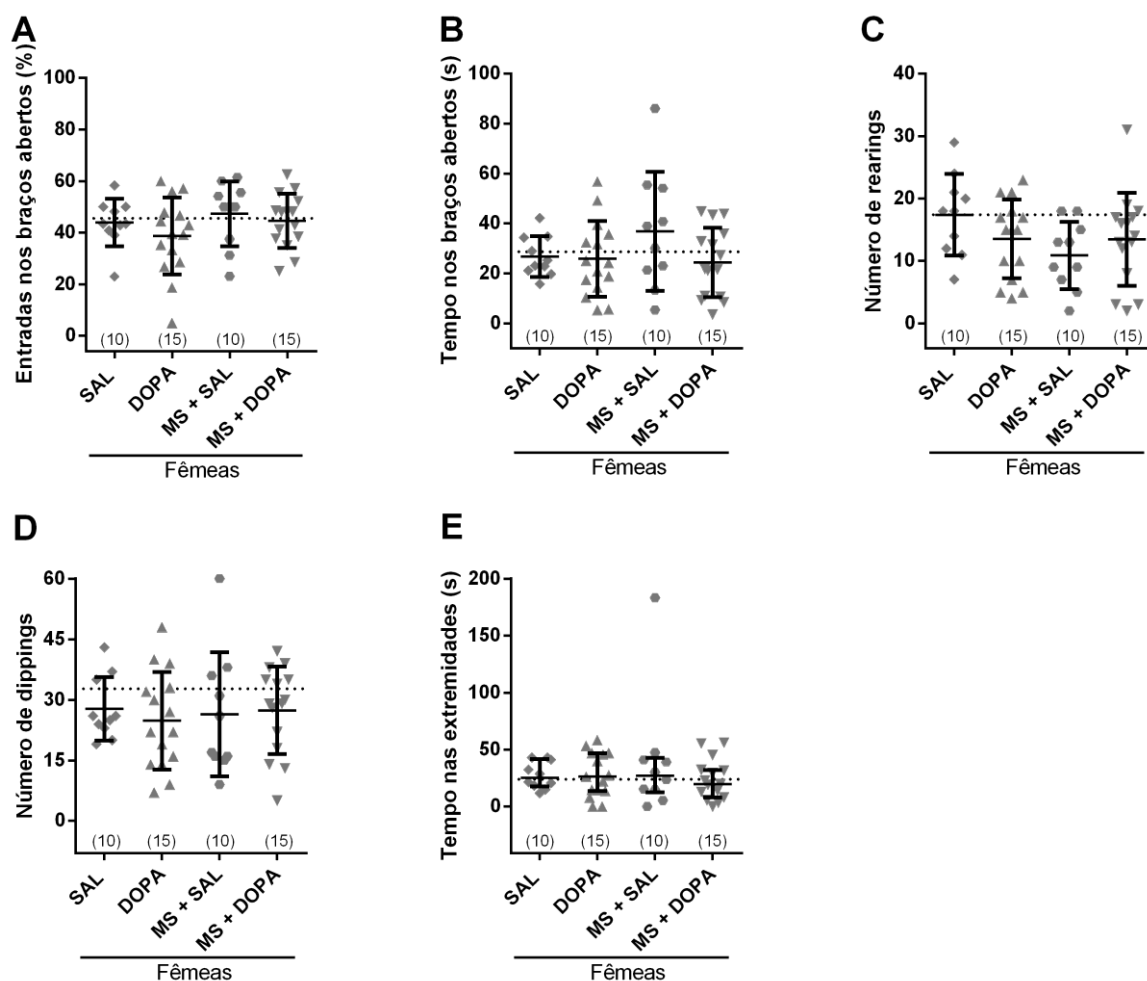


Figura 23: O estresse pós-natal juntamente com a administração de L-Dopa não mostrou alterações no teste do labirinto em cruz elevado em fêmeas. Animais que passaram pelo protocolo de separação materna e/ou receberam salina ou L-Dopa foram submetidos ao teste de labirinto em cruz elevado. Fêmeas tiveram 5 minutos para explorar o aparato e os seguintes parâmetros foram avaliados: entradas nos braços abertos (A), tempo nos braços abertos (B), número de rearings (C), número de dippings (D) e tempo nas extremidades (E). A linha pontilhada representa a média dos animais MS. Número de animais em parênteses. Média \pm SEM; Two Way ANOVA seguida do Teste de Tukey * = $p < 0,05$

Ao analisarmos os mesmos parâmetros em machos, vimos que esses animais, assim como as fêmeas, também não apresentaram diferenças em relação ao fator MS ($p = 0,140$), ao fator L-Dopa ($p = 0,407$) e não houve uma interação entre os fatores ($p = 0,870$) na porcentagem de entradas nos braços abertos (Figura 24A).

No parâmetro tempo nos braços abertos não observamos diferenças significativas no fator MS ($p = 0,900$), no fator L-Dopa ($p = 0,719$) e não vimos uma interação entre os fatores MS e L-Dopa ($p = 0,725$) (Figura 24B).

Quando analisamos os comportamentos exploratórios de rearings e dippings não vimos diferenças entre os grupos em ambos os parâmetros. No número de rearings não houve diferença em relação ao fator MS ($p = 0,209$), ao fator L-Dopa ($p = 0,807$) e não houve interação entre os fatores ($p = 0,283$). Assim como no número de dippings no fator MS ($p = 0,393$), L-Dopa ($p = 0,841$) e interação entre os fatores ($p = 0,993$) (Figura 24C e 24D).

No parâmetro tempo nas extremidades vimos que existe uma diferença significativa no fator MS ($p = 0,018$) e não observamos diferenças no fator L-Dopa ($p = 0,631$) e não vimos uma interação entre os fatores ($p = 0,825$). No Tukey test vimos que existe apenas uma leve diferença de machos MS + SAL a reduzir o tempo nas extremidades do labirinto em relação aos machos SAL ($p = 0,057$) (Figura 24E).

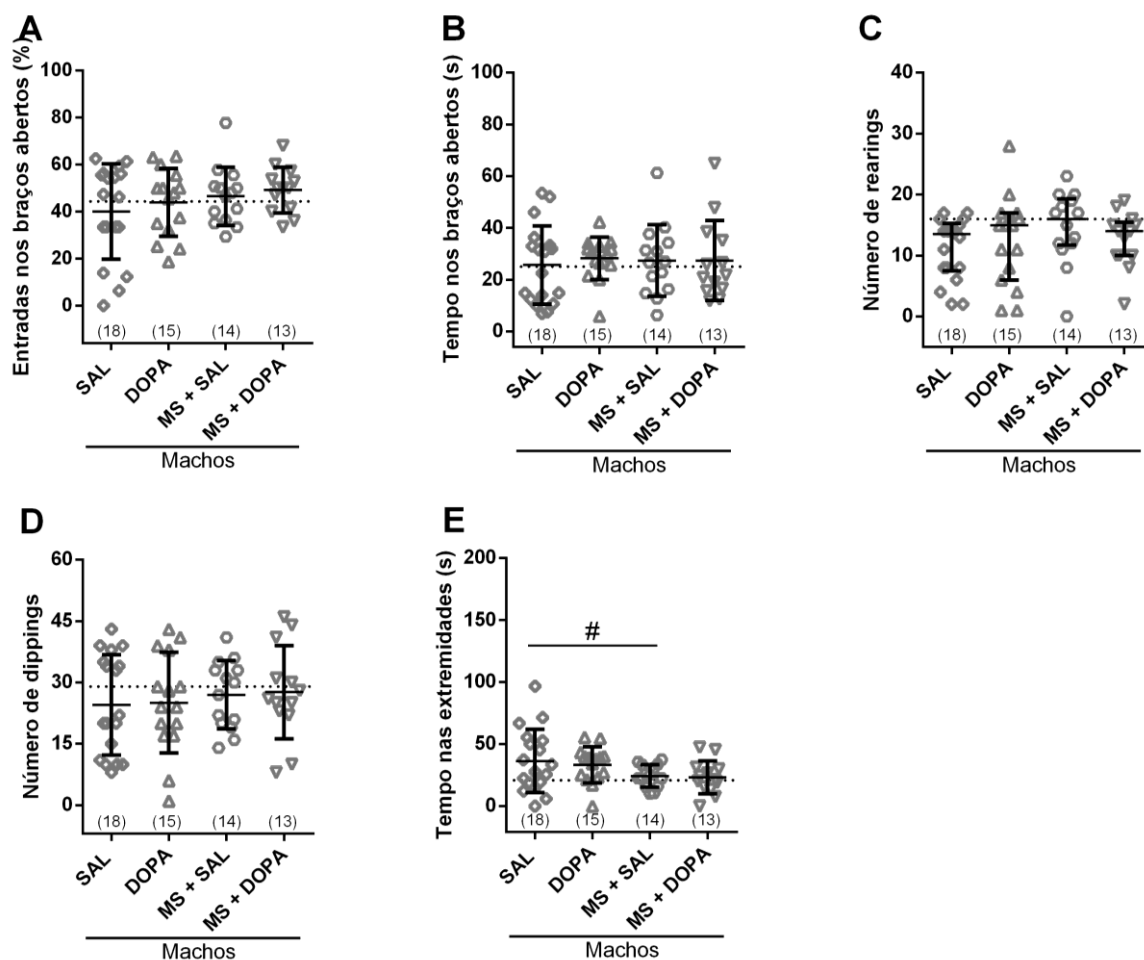


Figura 24: Efeitos do estresse pós-natal juntamente com a administração de L-Dopa de machos jovens no labirinto em cruz elevado. Animais que passaram pelo protocolo de separação maternal e/ou receberam salina ou L-Dopa foram submetidos ao teste de labirinto em cruz elevado. Machos tiveram 5 minutos para explorar o aparato e os seguintes parâmetros foram avaliados: entradas nos braços abertos (A), tempo nos braços abertos (B), número de rearings (C), número de dippings (D) e tempo nas extremidades (E). A linha pontilhada representa a média dos animais MS. Número de animais em parênteses. Média \pm SEM; Two Way ANOVA seguida do Teste de Tukey # = $p < 0,09$.

2.5.5 Alimentação suprimida pela novidade

Investigamos os efeitos do estresse pós-natal juntamente com a administração de L-Dopa ou salina no comportamento tipo-impulsivo dos animais através do teste da alimentação suprimida pela novidade. Machos e fêmeas ficaram 18 horas em jejum e o peso do animal foi medido no tempo zero e passadas as 16 horas para quantificarmos quanto de peso o animal

perdeu durante esse período. Os animais foram então colocados na caixa e a latência para a primeira ingestão de alimentos foi mensurada. Após a latência, os animais tiveram 10 minutos para explorar o ambiente e ingerir a ração que foi colocada no centro, por fim, pesamos a quantidade de comida ingerida durante os 10 minutos de teste.

Na latência não observamos diferenças significativas em fêmeas no fator MS ($p = 0,942$), no fator L-Dopa ($p = 0,148$) e não vimos uma interação entre os fatores ($p = 0,905$) (Figura 25A). Da mesma forma, não vimos diferenças significativas em machos no fator MS ($p = 0,907$), L-Dopa ($p = 0,917$) e não houve uma interação entre os fatores ($p = 0,559$) (Figura 25D).

No parâmetro ingestão de alimentos, vimos que fêmeas mostraram uma diferença significativa no fator MS ($p = 0,010$) e não no fator L-Dopa ($p = 0,793$) e não houve uma interação entre os fatores ($p = 0,994$). Na análise de múltiplas comparações, vimos que as fêmeas MS + DOPA apresentaram uma redução da ingestão alimentar em relação às fêmeas DOPA ($p = 0,040$) e que fêmeas MS + SAL tiveram uma pequena diferença para ingerir menor quantidade de comida quando comparadas com as fêmeas SAL ($p = 0,088$) (Figura 25B). Já os machos, mostraram uma diferença estatística nos fatores MS ($p = 0,026$) e L-Dopa ($p = 0,023$) mas não houve interação entre esses fatores ($p = 0,971$). No Tukey test vimos apenas que machos MS + SAL tiveram pequena diferença à redução da ingestão alimentar em relação aos machos SAL ($p = 0,096$) e machos DOPA tiveram uma tendência a aumentar a ingestão alimentar quando comparados aos machos SAL ($p = 0,092$) (Figura 25E).

Ao avaliarmos a perda de peso dos animais após o período de jejum, não vimos diferenças nas fêmeas no fator MS ($p = 0,887$) e L-Dopa ($p = 0,279$) (Figura 25C). Assim como em fêmeas, os machos também não demonstraram diferenças nos fatores MS ($p = 0,693$), L-Dopa ($p = 0,341$) (Figura 25F).

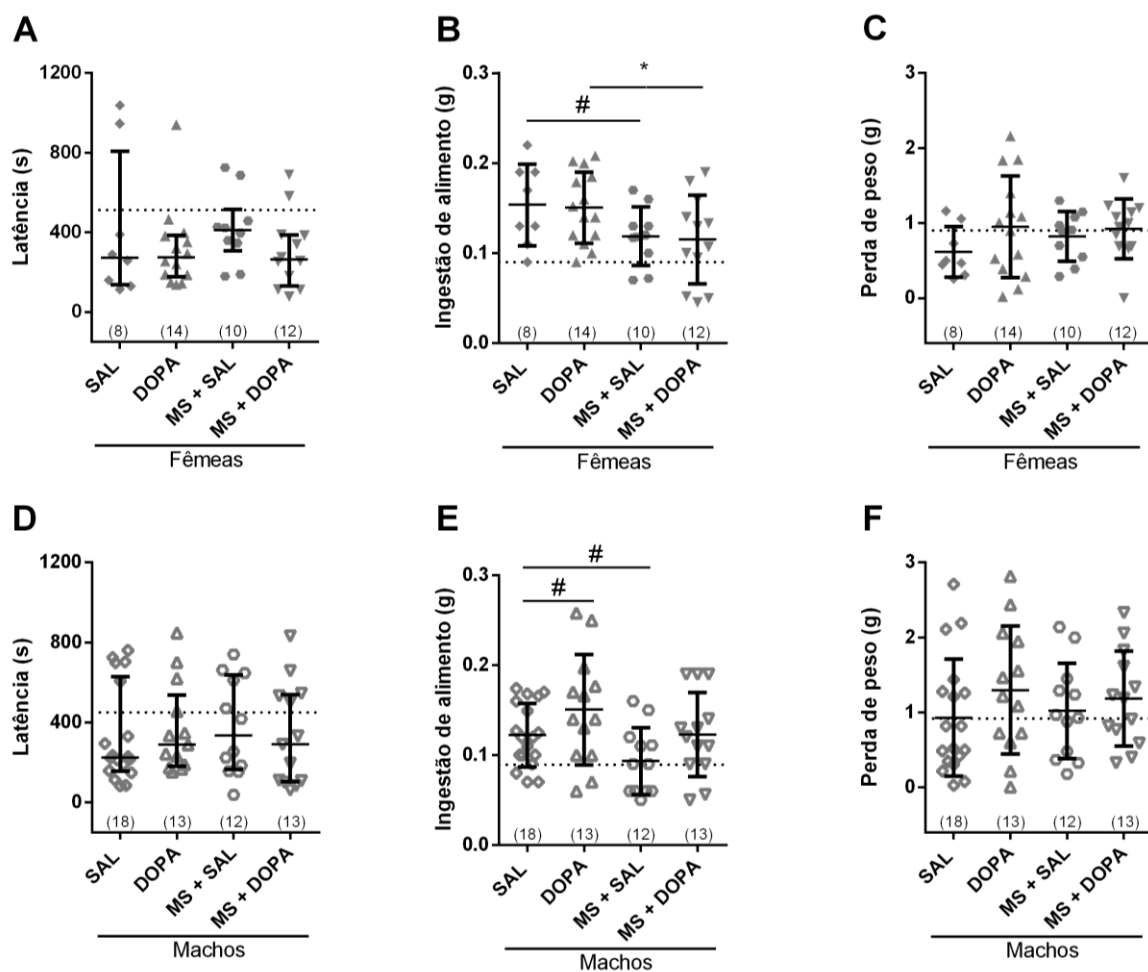


Figura 25: Efeito do estresse pós-natal juntamente com a administração de L-Dopa no comportamento tipo-impulsivo. Animais que passaram pelo protocolo de separação maternal e/ou receberam salina ou L-Dopa foram submetidos ao teste da alimentação suprimida pela novidade. Machos e fêmeas tiveram 10 minutos após a latência para explorar o aparato e os seguintes parâmetros foram avaliados: tempo de latência (A e D), ingestão de alimento durante os 10 minutos de teste (B e E) e perda de peso do animal durante o tempo em jejum (C e F). A linha pontilhada representa a média dos animais MS. Média \pm SEM; Two Way ANOVA seguida do Teste de Tukey * = $p < 0,05$ # = $p < 0,09$.

2.6 DISCUSSÃO

A dopamina é um neurotransmissor importante para diversas funções neurofisiológicas e comportamentais. Alterações na sinalização dopaminérgica, mesmo que transitórias, durante o neurodesenvolvimento estão associadas a modificações duradouras e persistentes no cérebro, que podem levar a diversos transtornos psiquiátricos, como transtornos de ansiedade e depressão (JONES et al., 2000). Com isso, resolvemos investigar se a administração de L-Dopa durante o desenvolvimento pós-natal seria capaz de alterar o comportamento de animais jovens. Além disso, como discutido no capítulo 1, o estresse crônico no início da vida pode contribuir para o surgimento desses transtornos (BIFULCO; BROWN; ADLER, 1991; LUPIEN et al., 2009). Sabe-se também que o estresse crônico gera uma diminuição na liberação de dopamina nas vias mesocortical e mesolímbica (MOORE, 2001; VALENTI; GILL; GRACE, 2012) e que o sistema dopaminérgico está envolvido no comportamento de enfrentamento (*coping*) ao estresse (BAIK, 2020; CABIB; PUGLISI-ALLEGRA, 2012; HÖGLUND et al., 2017) . Estudos mostram que o estresse crônico leva a uma diminuição da atividade dos neurônios dopaminérgicos na VTA, na amígdala e no hipocampo ventral (CHANG; GRACE, 2013; LIN et al., 2016; MOORE et al., 2001; VALENTI; GILL; GRACE, 2012). A partir desses dados, resolvemos investigar se o aumento de dopamina durante o protocolo de estresse crônico pós-natal iria amenizar os efeitos comportamentais da separação maternal.

Na caixa de atividade locomotora, observamos um aumento da distância total percorrida das fêmeas MS + DOPA em relação às fêmeas DOPA e em relação às fêmeas MS + SAL (Figura 20A), mostrando uma interação entre o estresse crônico e o aumento dos níveis de L-Dopa no organismo do camundongo. Ao avaliarmos esse mesmo parâmetro nos machos (Figura 20C), vimos que machos MS + SAL tiveram um aumento da distância total percorrida quando comparados com os machos SAL. Uma hipótese é a de que a somatória de dois tipos de estressores distintos - pela MS e pela injeção diária de salina - pode ter provocado essa diferença. Como não vimos diferenças significativas entre os grupos DOPA e MS + DOPA, sugerimos que nesse teste e mais especificamente no parâmetro distância total percorrida, a L-Dopa protegeu os machos dos efeitos comportamentais gerados pela soma de dois estressores diferentes durante o neurodesenvolvimento. No comportamento exploratório, não observamos diferenças entre os grupos nesse teste (Figura 20B e 20D).

No campo aberto, vimos que as fêmeas MS + DOPA apresentaram um aumento dos cruzamentos na periferia da caixa em relação às fêmeas DOPA (Figura 21C), o que mostra que a interação entre a MS e a administração de L-Dopa gerou um aumento do comportamento locomotor em fêmeas jovens, assim como no teste da caixa de atividade locomotora.

O aumento da locomoção no teste do campo aberto ocorreu apenas na periferia, ou seja, apenas no ambiente menos aversivo da caixa, pois não vimos diferenças entre os grupos no número de cruzamentos no centro (Figura 21D), assim como não vimos diferenças no tempo no centro (Figura 21A) e no número de rearings em fêmeas, o que também corrobora com nossos resultados da caixa de atividade locomotora (Figura 21B).

Nos machos, a administração de L-Dopa do P2 ao P14 levou a um aumento do tempo no centro, o que indica que esses animais são menos responsivos aos ambientes mais aversivos a eles (Figura 21E). Além disso, vimos que machos MS + SAL apresentaram um leve aumento do tempo no centro em relação aos machos SAL (Figura 21E) e essa diferença não foi observada nos animais MS + DOPA.

O teste da caixa claro/escuro é um bom teste para se avaliar o comportamento tipo-ansioso dos animais. O teste se inicia com o animal no compartimento claro, o que gera uma ansiedade ativa nos animais. Observamos que os machos DOPA, assim que foram colocados no aparato, se esquivaram mais rapidamente do ambiente aversivo, tendo uma redução no tempo de latência em relação aos machos SAL (Figura 22D), o que indica um aumento do comportamento de medo desse grupo. Apesar de não termos visto uma diferença significativa no tempo no claro de machos, vimos que existe uma diferença fraca entre os grupos DOPA e MS + DOPA, onde os animais MS + DOPA ficaram mais tempo no compartimento claro, indicando uma maior tolerância a permanecer em um ambiente que é mais aversivo (Figura 22E).

Ao avaliarmos as fêmeas no teste da caixa claro/escuro, vimos que os animais DOPA ficaram mais tempo no claro em relação às fêmeas SAL (Figura 22B), o que indica que o aumento do tônus dopaminérgico permitiu que esses animais explorassem mais um ambiente que é mais aversivo para eles. Além disso, vimos que fêmeas MS + SAL mostraram uma pequena diferença em relação às fêmeas SAL, aumentando o tempo no claro, e em contrapartida, fêmeas MS + DOPA, apesar de não ter uma diferença significativa, tiveram uma redução do tempo no claro em relação às MS + SAL, retornando aos níveis basais. Isso sugere que, nesse parâmetro, a interação entre dois fatores estressores, a injeção e a MS, levou a um aumento do comportamento exploratório no ambiente mais aversivo e o aumento de dopamina reverteu essa alteração (Figura 22B).

Ao contrário do que vimos no teste da caixa claro/escuro, não observamos diferenças significativas das fêmeas DOPA em relação às fêmeas SAL no outro teste que utilizamos para avaliar o comportamento tipo-ansioso dos animais, o labirinto em cruz elevado. Assim como também não vimos diferenças entre os demais grupos de fêmeas nesse teste (Figura 24).

Ao analisarmos o labirinto em cruz elevado dos machos, vimos que existe uma pequena diferença entre os grupos SAL e MS + SAL, em que os animais que passaram pelo protocolo de estresse crônico mostraram uma redução do tempo nas extremidades (Figura 23E), indicando um aumento do comportamento tipo-ansioso nesse grupo. Porém esse resultado se difere dos dados obtidos no teste do campo aberto, onde vimos que os machos MS + SAL tiveram um leve aumento do tempo no centro em comparação com os machos SAL, indicando uma redução do comportamento tipo-ansioso (Figura 22E). Essa discrepância nos resultados pode ser devida justamente à variação dos testes que foram realizados, visto que o contexto é muito importante para a manifestação ou não de uma alteração comportamental (ANDRE, 2008).

No teste da alimentação suprimida pela novidade vimos que as fêmeas MS + SAL tiveram uma leve redução da quantidade de alimento ingerida durante o teste em relação às fêmeas SAL (Figura 23B) e as fêmeas MS + DOPA tiveram uma redução da ingestão alimentar em relação às fêmeas DOPA (Figura 23B). Esses dados sugerem que esse efeito de redução da ingestão de alimentos durante os 10 minutos após a latência se dá devido aos efeitos da MS juntamente com os efeitos da injeção. Ao avaliarmos os machos, vimos que machos DOPA tiveram um leve aumento da ingestão de comida em relação aos machos SAL e em contrapartida os machos MS + SAL mostraram uma pequena diferença, reduzindo a quantidade de comida ingerida em relação aos machos SAL (Figura 23E), o que pode indicar um aumento do comportamento tipo-ansioso, visto que esses animais evitaram se alimentar no ambiente mais aversivo da caixa mesmo após 18 horas de jejum. Esses dados sugerem que a interação entre dois fatores estressores, a injeção e a MS levou a uma redução da quantidade ingerida em 10 minutos e que a administração de L-Dopa protegeu os animais desse efeito.

No presente trabalho, analisamos os efeitos da administração de L-Dopa do P2 ao P14 em animais jovens e vimos que o aumento da dopamina em fêmeas proporcionou um aumento no tempo no ambiente claro, o que indica que o aumento da sinalização dopaminérgica durante o neurodesenvolvimento pode proporcionar uma menor aversão à ambientes mais aversivos para as fêmeas. Assim como nos machos, onde vimos que o aumento da sinalização dopaminérgica aumentou a quantidade de comida ingerida durante o teste da alimentação suprimida pela novidade o que também pode indicar que o aumento da sinalização dopaminérgica durante o neurodesenvolvimento proporciona uma menor aversão à ambientes mais aversivos para os machos. Além disso, observamos uma divergência entre os testes da caixa claro/escuro e campo aberto, onde os machos mostraram uma aversão ao ambiente claro, com uma redução da latência, o que sugere um comportamento de medo e maior ansiedade nesses animais e em contrapartida, no campo aberto, esses mesmos animais permaneceram mais

tempo no centro do aparato, ou seja, no lugar mais ansiogênico. Nossa hipótese se baseia no fato de que os aparatos são completamente diferentes, sendo que o campo aberto tem um fundo escuro e é menos iluminado do que o ambiente claro da caixa claro/escuro, o que pode proporcionar uma maior segurança aos animais para poder explorar os ambientes. Além disso, sabemos que contextos diferentes podem gerar respostas fisiológicas diferentes, mesmo ambos os contextos tendo características aversivas para os animais (ANDRE, 2008; MORME, 1998; PEREIRA et al., 2008).

Trabalhos anteriores do nosso grupo mostraram que a injeção intraperitoneal de 50mg/Kg de L-Dopa aumenta os níveis de dopamina e seus metabólitos no estriado de filhotes de camundongos swiss com 5 dias (DE MATOS et al., 2018). Além disso, vimos que a administração de L-Dopa nos 5 primeiros dias de vida aumentou o comportamento exploratório em fêmeas adolescentes e adultas. As fêmeas jovens não apresentaram comportamento tipo-ansioso e tipo-depressivo, mas vimos um aumento do comportamento tipo-ansioso em fêmeas adultas e redução do comportamento tipo-depressivo em machos adultos (MATOS et al., 2018; MATOS et al., 2020). Nossos dados anteriores sugerem que o aumento de dopamina nos cinco primeiros dias de vida em camundongos não gera muitas alterações no comportamento de animais jovens, porém, essas alterações são mais evidentes em animais adultos. No presente trabalho, vimos as consequências comportamentais do aumento do tônus dopaminérgico por um período mais longo do que 5 dias, onde pegamos uma janela desenvolvimental maior, e avaliamos os efeitos apenas em animais jovens. Nossa sugestão é de que ao avaliarmos o comportamento de animais adultos talvez possamos ver maiores efeitos nos animais machos e fêmeas.

Ao associarmos o estresse crônico por MS com a administração de L-Dopa, vimos que as fêmeas tiveram um aumento da distância total percorrida na caixa de atividade locomotora e um aumento dos cruzamentos na periferia no campo aberto, o que nos mostra que a interação entre a MS e a administração de L-Dopa aumentou o comportamento locomotor de fêmeas. Além disso, vimos que a L-Dopa reverteu os efeitos gerados pelo estresse por MS no tempo no claro mostrando através de uma pequena diferença uma redução do tempo de permanência no claro em relação ao grupo MS + SAL. Em machos, vimos que a administração de L-Dopa durante o protocolo de MS teve uma pequena diferença, aumentando do tempo no claro. Com isso, podemos concluir que, diferente da nossa hipótese, o aumento do tônus dopaminérgico durante o estresse pós-natal não ameniza os efeitos do estresse crônico pós-natal em todos os testes analisados, porém, é capaz de alterar os efeitos comportamentais do estresse.

Dados ainda não publicados do nosso grupo mostrou que tanto a injeção de salina intraperitoneal quanto a agulhada durante os cinco primeiros dias de vida de camundongos foram suficientes para alterar o comportamento dos animais jovens em relação ao grupo não manipulado, o que sugere que a injeção já seja um fator estressor para os animais (Moraes *et al.* dados não publicados). No presente estudo, em alguns comportamentos, observamos que houve uma interação entre dois fatores estressores, a MS e a injeção.

Existem diversas limitações em nosso trabalho, a administração de L-Dopa por via intraperitoneal durante 13 dias consecutivos pode levar a um processo inflamatório e essa ativação do sistema imunológico pode ter tido alguma influência em nossos resultados. Uma maneira de eliminar esse efeito seria através de uma outra via de administração do fármaco, porém, como se trata de filhotes recém-nascidos, as demais vias são inviáveis. Uma outra limitação é o fato de não sabermos ao certo quais os níveis dopaminérgicos durante a MS e durante o tratamento com L-Dopa. E a partir de então surgem diversas dúvidas: a partir de qual dia de MS podemos observar uma redução da ativação dos neurônios dopaminérgicos nas vias mesolímbica e mesocortical? No princípio, o organismo encararia a situação como um estresse agudo e depois de alguns dias que iria haver uma redução da sinalização dopaminérgica? Após a administração de L-Dopa, podemos observar um pico de dopamina nas primeiras horas após a injeção e posteriormente ela volta aos níveis basais ou devido ao pico depois de algum tempo ocorre uma redução na liberação de dopamina? Como a administração de L-Dopa é feita imediatamente antes do estresse, o pico de dopamina seria capaz de ultrapassar os níveis basais caso os animais não tenham passado pelo estresse ou os níveis chegariam apenas no valor basal? Em todos os dias de protocolo observaríamos esse mesmo perfil? Provavelmente não, pois o fato de ter um pico de dopamina pode levar a uma remodelação na expressão dos receptores D1 ou D2, o que poderia gerar um processo de plasticidade onde não veríamos mais o mesmo perfil de liberação do neurotransmissor.

São diferentes perguntas que nosso grupo de pesquisa pretende ainda responder. Além das já citadas, pretendemos, assim que possível, avaliar se a administração de L-Dopa é capaz de modular a expressão de receptores de glicocorticoides no hipocampo dos animais jovens através do western blot, e pretendemos avaliar os efeitos do estresse e da alteração da sinalização dopaminérgica na arborização neuronal através da técnica de golgi.

2.7 CONCLUSÃO

A partir dos nossos resultados podemos concluir que (I) a administração de L-Dopa proporcionou uma menor aversão a ambientes mais aversivos em fêmeas e um aumento do comportamento de medo em machos, (II) o aumento do tônus dopaminérgico durante o estresse pós-natal não amenizou os efeitos do estresse crônico pós natal em todos os testes analisados, mas foi capaz de alterar os efeitos comportamentais do estresse e (III) machos e fêmeas jovens apresentam respostas comportamentais distintas em resposta ao estresse juntamente com o aumento do tônus dopaminérgico.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

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

AISA, B. et al. Cognitive impairment associated to HPA axis hyperactivity after maternal separation in rats. **Psychoneuroendocrinology**, v. 32, n. 3, p. 256–66, abr. 2007.

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

ANDRE, R. Animal models of anxiety : do I need multiple tests ? **Trends in Pharmacological Sciences**, v. 29, n. August, p. 13–18, 2008.

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

ARAKI, K. Y.; SIMS, J. R.; BHIDE, P. G. Dopamine receptor mRNA and protein expression in the mouse corpus striatum and cerebral cortex during pre- and postnatal development. **Brain research**, v. 1156, p. 31–45, 2 jul. 2007.

BAIK, J.-H. Stress and the dopaminergic reward system. **Experimental & Molecular Medicine**, v. 52, n. 12, p. 1879–1890, 1 dez. 2020.

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

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

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

BIAGINI, G. et al. POSTNATAL MATERNAL SEPARATION DURING THE STRESS HYPORESPONSIVE PERIOD ENHANCES THE ADRENOCORTICAL RESPONSE TO NOVELTY IN ADULT RATS BY AFFECTING FEEDBACK REGULATION IN THE CA0 HIPPOCAMPAL FIELD. **International Journal of Developmental Neuroscience**, v. 16, p. 76–86, 1998.

BIAN, Y. et al. Repeated Three-Hour Maternal Separation Induces Depression-Like Behavior and Affects the Expression of Hippocampal Plasticity-Related Proteins in C57BL / 6N Mice. **Neural Plasticity**, v. 2015, p. 5–11, 2015.

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

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

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

BLASCHKO, H. The activity of l(—)-dopa decarboxylase. **The Journal**

of Physiology, v. 101, n. 3, p. 337–349, 1942.

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

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

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

BRUNTON, P. J.; RUSSELL, J. A. Prenatal Social Stress in the Rat Programmes Neuroendocrine and Behavioural Responses to Stress in the Adult Offspring: Sex-Specific Effects Neuroendocrinology. **Journal of Neuroendocrinology**, v. 22, n. 10, p. 258–271, 2010.

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

CABIB, S.; PUGLISI-ALLEGRA, S. The mesoaccumbens dopamine in coping with stress. **Neuroscience & Biobehavioral Reviews**, v. 36, n. 1, p. 79–89, jan. 2012.

CAJERO, M. et al. Periodic maternal separation decreases hippocampal neurogenesis without affecting basal corticosterone during the stress hyporesponsive period, but alters HPA axis and coping behavior in adulthood. **Psychoneuroendocrinology**, v. 37, p. 410–420, 2012.

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

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

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

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

COSTA, R. **Estresse infantil.**

CRANDALL, J. E. et al. Dopamine Receptor Activation Modulates GABA Neuron Migration from the Basal Forebrain to the Cerebral Cortex. **Journal of Neuroscience**, v. 27, n. 14, p. 3813–3822, 4 abr. 2007.

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

2005.

DE MATOS, L. O. et al. L-Dopa treatment during perinatal development leads to different behavioral alterations in female vs. male juvenile Swiss mice. **Pharmacology Biochemistry and Behavior**, v. 173, p. 1–14, out. 2018.

DIAZ, J. et al. Selective Expression of Dopamine D 3 Receptor mRNA in Proliferative Zones during Embryonic Development of the Rat Brain. v. 17, n. 11, p. 4282–4292, 1997.

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

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

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

GELBARD, H. A. et al. Postnatal development of dopamine D 1 and D 2 receptor sites in rat striatum. **Brain Research**, v. 49, p. 123–130, 1989.

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

GRACIA-RUBIO, I. et al. Maternal Separation Impairs Cocaine-Induced Behavioural Sensitization in Adolescent Mice. **Plos one**, p. 1–20, 2016.

GROSS, M. et al. Social dominance predicts hippocampal glucocorticoid receptor recruitment and resilience to prenatal adversity. **Scientific Reports**, n. June, p. 1–13, 2018.

HAN, Y. et al. Minocycline inhibits microglial activation and alleviates depressive-like behaviors in male adolescent mice subjected to maternal separation. **Psychoneuroendocrinology**, v. 107, n. April, p. 37–45, 2019.

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

HASCOËT, M.; BOURIN, M. A New Approach to the Light / Dark Test Procedure in Mice. v. 60, n. 3, p. 645–653, 1998.

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

HELLSTROM, I. C. et al. Maternal licking regulates hippocampal glucocorticoid receptor transcription through a thyroid hormone – serotonin – NGFI-A signalling cascade. **Philosophical Transactions of the Royal Society B**, p. 2495–2510, 2012.

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

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

HÖGLUND, E. et al. Contrasting Coping Styles Meet the Wall: A Dopamine Driven Dichotomy in Behavior and Cognition. **Frontiers in Neuroscience**, v. 11, 24 jul. 2017.

HOLMES, L. et al. Aberrant Epigenomic Modulation of Glucocorticoid Receptor Gene (NR3C1) in Early Life Stress and Major Depressive Disorder Correlation : Systematic Review and Quantitative Evidence Synthesis. **International Journal of Environmental Research and Public Health**, v. 16, 2019.

HU, D. et al. Bumetanide treatment during early development rescues maternal separation-induced susceptibility to stress. **Scientific Reports**, n. September, p. 1–16, 2017.

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

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

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

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

KESSLER, R. C. et al. Childhood adversities and adult psychopathology in the WHO World Mental Health Surveys. **The British journal of psychiatry : the**

journal of mental science, v. 197, n. 5, p. 378–85, nov. 2010.

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

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

LEHMANN, J. et al. The Maternal Separation Paradigm and Adult Emotionality and Cognition in Male and Female Wistar Rats. **Pharmacology Biochemistry and Behavior**, v. 64, n. 4, p. 705–715, 1999.

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

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

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

LIN, C. C. et al. Traumatic stress causes distinctive effects on fear circuit catecholamines and the fear extinction profile in a rodent model of posttraumatic stress disorder. **European Neuropsychopharmacology**, v. 26, n. 9, p. 1484–

1495, 2016.

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

LODGE, D. J.; GRACE, A. A. Developmental pathology, dopamine, stress and schizophrenia. **International Journal of Developmental Neuroscience**, v. 29, n. 3, p. 207–213, maio 2011.

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

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

MARSH, R.; GERBER, A. J. Neuroimaging Studies of Normal Brain Development and Their Relevance for Understanding Childhood Neuropsychiatric Disorders. **Journal of the American Academy of Child & Adolescent Psychiatry**, v. 47, n. 11, p. 1233–1251, 2008.

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

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

MEANEY, M. J.; SZYF, M. Environmental programming of stress responses through DNA methylation: life at the interface between a dynamic environment and a fixed genome. v. 3, p. 103–123, 2005.

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

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

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

MOORE, H. et al. Chronic Cold Stress Reduces the Spontaneous Activity of Ventral Tegmental Dopamine Neurons. **Neuropsychopharmacology**, v. 24, 2001.

MOORE, H. Chronic Cold Stress Reduces the Spontaneous Activity of Ventral Tegmental Dopamine Neurons. **Neuropsychopharmacology**, v. 24, n. 4, p. 410–419, abr. 2001.

MORME, P. Stress and Emotionality: a Multidimensional and Genetic Approach. **Neuroscience and Biobehavioral Reviews**, v. 22, n. 1, p. 33–57, 1998.

MUELLER, N. K. et al. Stressor-Selective Role of the Ventral Subiculum in Regulation of Neuroendocrine Stress Responses. **Endocrinology**, v. 145, n. 8, p. 3763–3768, 2004.

NELSON, M. D. et al. Hippocampal Volume Reduction in Schizophrenia

as Assessed by Magnetic Resonance Imaging. v. 55, n. May 1998, p. 433–440, 2011.

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

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

OWN, L. S.; PATEL, P. D. Maternal behavior and offspring resiliency to maternal separation in c57bl / 6 mice ☆. **Hormones and Behavior**, v. 63, n. 3, p. 411–417, 2013.

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

PEÑA, C. J. et al. Early life stress confers lifelong stress susceptibility in mice via ventral tegmental area OTX2. **Neurodevelopment**, v. 1188, n. June, p. 1185–1188, 2017.

PEREIRA, E. et al. Integrating the open field , elevated plus maze and light / dark box to assess different types of emotional behaviors in one single trial Andre idio. **Behavioral brain research**, v. 193, p. 277–288, 2008.

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

PLOTSKY, P. M.; MEANEY, M. J. Early , postnatal experience alters hypothalamic corticotropin-releasing factor (CRF) mRNA , median eminence CRF content and stress-induced release in adult rats. **Molecular Brain Research**, v. 18, p. 195–200, 1993.

POKORNY, J. et al. Prenatal stress in rats : effects on plasma corticosterone , hippocampal glucocorticoid receptors , and maze performance. **Physiology and Behavior**, v. 71, p. 353–362, 2000.

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

PRAKASH, N.; WURST, W. Development of dopaminergic neurons in the mammalian brain. **cell mol life**, v. 63, p. 187–206, 2006.

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

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

RIEM, M. M. E. et al. Beating the brain about abuse: Empirical and meta-analytic studies of the association between maltreatment and hippocampal volume across childhood and adolescence. **Development and Psychopathology**, v. 27, n. 02, p. 507–520, 2015.

RIGGS, L. M. et al. Social defeat stress induces a depression-like phenotype in adolescent male c57BL/6 mice. **Stress**, v. 17, n. 3, p. 247–255, 2014.

SANDSTROM, N. J.; HART, S. R. Isolation stress during the third postnatal week alters radial arm maze performance and corticosterone levels in adulthood. **Behavioral brain research**, v. 156, p. 289–296, 2005.

SAPOLSKY, R.; ROMERO, M. L.; MUNCK, A. U. How Do Glucocorticoids Influence Stress Responses? Preparative Actions *. **Endocrine Reviews**, v. 21, n. 1, p. 55–89, 2000.

SAWCHENKO, P. E.; LI, H.; ERICSSON, A. Circuits and mechanisms governing hypothalamic responses to stress : a tale of two paradigms. **Progress in Brain Research**, v. 122, 2000.

SCHAMBRA, U. B. et al. Ontogeny of D1A and D2 dopamine receptor subtypes in rat brain using in situ hybridization and receptor binding. **Neuroscience**, v. 62, n. 1, p. 65–85, 1994.

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

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

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

jun. 2012.

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

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

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

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

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

SHEPHARD, R. A.; BROADHURST, P. L. Psychopharmacology Hyponeophagia and Arousal in Rats : Effects of Diazepam , 5-Methoxy-N , N-dimethyltryptamine , d-Amphetamine and Food Deprivation. p. 368–372, 1982.

SHIN, S. Y. et al. Chronic administration of ketamine ameliorates the anxiety- and aggressive-like behavior in adolescent mice induced by neonatal. v. 23, n. 1, p. 81–87, 2019.

SHORS, T. J.; MIESEGAES, G. Testosterone in utero and at birth dictates how stressful experience will affect learning in adulthood. **PNAS**, v. 99, n. 21, p.

13955–13960, 2002.

SILLIVAN, S. E.; KONRADI, C. Expression and function of dopamine receptors in the developing medial frontal cortex and striatum. **Neuroscience**, v. 064913, p. 501–514, 2011.

SMITH, M. A. et al. Maternal Deprivation and Stress Induce Immediate Early Genes in the Infant Rat Brain. **Endocrinology**, v. 138, n. 11, p. 4622–4628, 1997.

SOUZA, B. R. et al. Dopaminergic intracellular signal integrating proteins: relevance to schizophrenia. **Dialogues in clinical neuroscience**, v. 8, n. 1, p. 95–100, 2006.

SOUZA, B. R.; ROMANO-SILVA, M. A.; TROPEPE, V. Dopamine D2 receptor activity modulates Akt signaling and alters GABAergic neuron development and motor behavior in zebrafish larvae. **The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience**, v. 31, n. 14, p. 5512–5525, 2011.

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

STANTON, M. E.; GUTIERREZ, Y. R.; LEVINE, S. Maternal Deprivation Potentiates Pituitary-Adrenal Stress Responses in Infant Rats. **Behavioral Neuroscience**, v. 102, n. 5, p. 692–700, 1988.

STEEL, Z. et al. The global prevalence of common mental disorders: a systematic review and meta-analysis 1980–2013. **International Journal of Epidemiology**, v. 43, n. 2, p. 476–493, abr. 2014.

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

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

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

SZYF, M. et al. Epigenetic regulation of the glucocorticoid receptor in human brain associates with childhood abuse. **Nature neuroscience**, v. 12, n. 3, p. 342–348, 2009.

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

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

TURRIN, N.; RIVEST, S. Unraveling the Molecular Details Involved. p. 996–1006, 2004.

VALENTI, O.; GILL, K. M.; GRACE, A. A. Different stressors produce

excitation or inhibition of mesolimbic dopamine neuron activity: Response alteration by stress pre-exposure Ornella. **European Journal Neuroscience**, v. 35, n. 8, p. 1312–1321, 2012.

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

WOOD, G. E.; BEYLIN, A. V.; SHORS, T. J. The Contribution of Adrenal and Reproductive Hormones to the Opposing Effects of Stress on Trace Conditioning in Males Versus Females. **Behavioral Neuroscience**, v. 115, n. 1, p. 175–187, 2001.

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

WORLD HEALTH ORGANIZATION. Depression and other common mental disorders: global health estimates. **World Health Organization**, p. 1–24, 2017.

ANEXOS

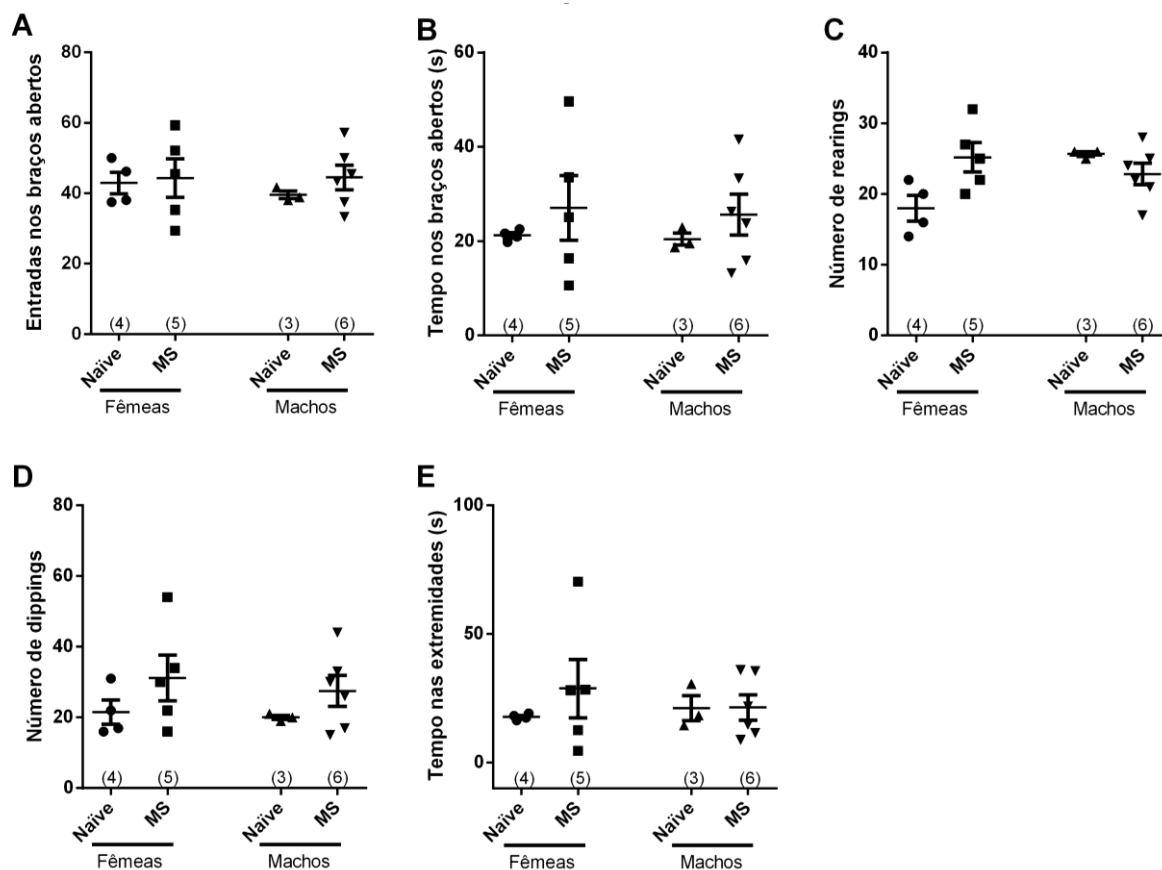


Figura 1: Efeito do estresse agudo após o estresse pós-natal por MS no comportamento tipo-ansioso. Animais que passaram pelo protocolo de separação maternal foram submetidos ao estresse agudo por contensão durante 30 minutos. Imediatamente após o estresse agudo os animais foram colocados no teste do labirinto em cruz elevado para análise do comportamento tipo ansioso. Os parâmetros entradas nos braços abertos (A), tempo nos braços abertos (B), número de rearings (C), número de dippings (D) e tempo nas extremidades (E) foram analisados. Média \pm SEM.

	Fêmeas MS	Machos MS
Caixa de atividade locomotora	↑ Comportamento locomotor e exploratório	X
Campo aberto	↑ Comportamento locomotor e exploratório	↑ Comportamento locomotor
Caixa claro-escuro	X	↑ Comportamento tipo ansioso ↓ Comportamento locomotor
Labirinto em cruz elevado	↑ Comportamento exploratório	↑ Comportamento tipo ansioso ↓ Comportamento locomotor
Alimentação suprimida pela novidade	X	X
Nado forçado	X	↑ Comportamento tipo depressivo

Tabela 1 – Resumo dos resultados apresentados no capítulo 1

	Fêmeas DOPA	Fêmeas MS + DOPA	Machos DOPA	Machos MS + DOPA
Caixa de atividade locomotora	X	↑ Comportamento locomotor	X	X
Campo aberto	X	↑ Comportamento exploratório	↓ Comportamento tipo ansioso	↑ Comportamento tipo ansioso
Caixa claro-escuro	↓ Comportamento tipo ansioso	↑ Comportamento tipo ansioso	↑ Comportamento de fuga	↓ Comportamento tipo ansioso
Labirinto em cruz elevado	X	X	X	X
Alimentação suprimida pela novidade	X	↑ Comportamento tipo ansioso	↓ Comportamento tipo ansioso	X

Tabela 2 – Resumo dos resultados apresentados no capítulo 2