

**KARINA KORES DORSA**

**ALTERAÇÕES DO COMPORTAMENTO DO TIPO-ANSIOSO E  
DAS CONCENTRAÇÕES DE SEROTONINA NA AMÍGDALA DE  
RATOS ADULTOS SUBMETIDOS À PRIVAÇÃO MATERNA**

Tese apresentada à Universidade  
Federal de São Paulo – Escola  
Paulista de Medicina, para obtenção  
do Título de Mestre em Ciências.

São Paulo  
2013

**KARINA KORES DORSA**

**ALTERAÇÕES DO COMPORTAMENTO DO TIPO-ANSIOSO E  
DAS CONCENTRAÇÕES DE SEROTONINA NA AMÍGDALA DE  
RATOS ADULTOS SUBMETIDOS À PRIVAÇÃO MATERNA**

Tese apresentada à Universidade Federal  
de São Paulo – Escola Paulista de  
Medicina, para obtenção do Título de  
Mestre em Ciências.

Orientadora: Prof. Dra. Deborah Suchecki

São Paulo  
2013

Dorsa, Karina Kores

Alterações do comportamento do tipo-ansioso e das concentrações de serotonina na amígdala de ratos adultos submetidos à privação materna / Karina Kores Dorsa. -- São Paulo, 2013.

xvi, 46f.

Tese de Mestrado – Universidade Federal de São Paulo. Escola Paulista de Medicina. Programa de Pós-graduação em Psicobiologia.

Changes in anxiety-like behaviors and serotonin levels in the amygdala of adult rats submitted to maternal deprivation.

1. Estresse neonatal. 2. Comportamento emocional. 3. Alojamento individual. 4. Corticosterona. 5. Serotonina. 6. Amígdala.

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO PAULO**

**ESCOLA PAULISTA DE MEDICINA**

**DEPARTAMENTO DE PSICOBIOLOGIA**

Chefe do Departamento: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Deborah Suchecki

Coordenadora do Curso de Pós-graduação: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Vânia D´Almeida

**KARINA KORES DORSA**

**ALTERAÇÕES DO COMPORTAMENTO DO TIPO-ANSIOSO E  
DAS CONCENTRAÇÕES DE SEROTONINA NA AMÍGDALA DE  
RATOS ADULTOS SUBMETIDOS À PRIVAÇÃO MATERNA**

**BANCA EXAMINADORA**

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Alessandra Mussi Ribeiro

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Claudia Maria Padovan

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Paula Ayako Tiba

**EXAMINADOR SUPLENTE**

Prof. Dr. Aldo Bolten Lucion

## DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho,

À minha mãe Angela, incondicional incentivadora.  
Seu apoio e carinho foram fundamentais.

Ao meu pai Renato, exemplo de vida.  
Seus ensinamentos edificaram minha formação.

À minha irmã Tatiana,  
Por me ensinar que para vencer na vida é preciso ousar.

Ao meu companheiro Cesar,  
Por todo amor, por estar sempre ao meu lado e, principalmente, por  
acreditar nas minhas escolhas.

## **AGRADECIMENTOS**

Ao Departamento de Psicobiologia da Universidade Federal de São Paulo – Escola Paulista de Medicina pela infraestrutura.

À Associação Fundo de Incentivo à Pesquisa (AFIP), ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pelo financiamento.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pela bolsa de mestrado.

À profa. Dra. Deborah Suchecki, pela amizade, incentivo, confiança e orientação.

Ao Prof. Dr. Ricardo Borges Machado pelo exemplo e disposição em ensinar, pelo apoio e colaboração.

Aos funcionários do Departamento de Psicobiologia, em especial ao Marcos Vinicius Bunscheit, por sua dedicação e presteza.

Às secretárias do Programa de Pós-Graduação em Psicobiologia, pela paciência e auxílio profissional.

Aos colegas do laboratório que direta ou indiretamente contribuíram para a realização desse trabalho.

Aos animais utilizados, por permitirem tantos trabalhos em prol da humanidade.

“Uma mente que se abre a uma nova ideia  
jamais voltará ao seu tamanho original”

**Albert Einstein**



## SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	1
1.1	Estresse .....	1
1.2	Estresse e Modelos Animais .....	5
1.2.1	Modelo do Estresse Crônico Moderado .....	7
1.2.2	Estresse neonatal .....	8
2	JUSTIFICATIVA.....	12
3	OBJETIVOS.....	13
4	MÉTODOS.....	14
4.1	Delineamento experimental.....	14
4.2	Sujeitos .....	14
4.3	Privação materna .....	15
4.4	Consumo de sacarose no modelo de estresse crônico moderado.....	15
4.5	Avaliação do comportamento tipo-ansioso.....	17
4.6	Coleta de sangue .....	18
4.7	Determinação das concentrações plasmáticas de corticosterona.....	18
4.8	Determinação de monoaminas cerebrais e seus metabólitos .....	18
4.9	Análise estatística .....	20
5	RESULTADOS .....	21
5.1	Peso corporal .....	21
5.2	Índice de preferência por sacarose (IPS) .....	22
5.3	Labirinto em cruz elevado (LCE) .....	23
5.4	Corticosterona plasmática.....	25
5.5	Monoaminas cerebrais .....	26
6	DISCUSSÃO.....	31
7	CONCLUSÕES.....	35
8	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	36
9	ANEXOS.....	44

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Diagrama esquemático do eixo hipotálamo-hipófise-adrenal (HPA) demonstrando sua regulação (+) e o feedback negativo (-) via glicocorticoides. .	3
Figura 2. Esquema ilustrativo do procedimento experimental .....	14
Figura 3. Peso corporal (g) dos grupos. ....	21
Figura 4. Índice de preferência por sacarose (IPS). ....	22
Figura 5. Porcentagem de tempo de permanência no braço aberto .....	24
Figura 6. Número de eventos de avaliação de risco no braço fechado.....	25
Figura 7. Concentração plasmática de corticosterona (ng/ml).....	26
Figura 8. Concentração de noradrenalina (ng/mg de proteína) na amígdala ...	28
Figura 9. Concentração de serotonina (ng/mg de proteína) na amígdala .....	29
Figura 10. Concentração de ácido 5-hidroxi-indolacético (ng/mg de proteína) na amígdala.....	30

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Comportamento analisados no labirinto em cruz elevado .....	23
Tabela 2. Concentração das monoaminas (ng/mg de proteína) nas diferentes regiões cerebrais.....	27

## LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

5-HT	5-Hidroxitriptamina (Serotonina)
5-HIAA	Ácido 5-Hidroxi-Indol-Acético
ACTH	Hormônio Adrenocorticotrófico
AMG	Amígdala
ANOVA	Análise de Variância
AVP	Vasopressina
CEDEME	Centro de Desenvolvimento de Modelos Experimentais
CEP	Comitê de Ética em Pesquisa
CORT	Corticosterona
CRH	Hormônio Liberador de Corticotrofina
CTL	Grupo Controle
DA	Dopamina
DHBA	Diidroxibenzilamina
DOPAC	Ácido 3,4-Di-Hidroxifenilacético
d.p.	Desvio Padrão
DPN	Dia Pós-Natal
ECM	Estresse Crônico Moderado
EDTA	Ácido Etilenodiamino Tetra-Acético
e.p.	Erro Padrão
FPM	Feixe Prosencefálico Medial
GABA	Ácido Gama-Aminobutírico
HPA	Hipotálamo-Hipófise-Adrenal
HPC	Hipocampo
HPCd	Hipocampo Dorsal
HPCv	Hipocampo Ventral
HPLC	Cromatografia Líquida de Alta Performance
HPT	Hipotálamo
HVA	Ácido Homovanílico
IPS	Índice de Preferência por Sacarose
LC	Locus Coeruleus
LCE	Labirinto em Cruz Elevado
NA	Noradrenalina
NECM	Não-Estresse Crônico Moderado
NPV	Núcleo Paraventricular
PHRE	Período de Hiporresponsividade ao Estresse
PM	Privação Materna
PM3	Grupo Privado no 3º Dia Pós Natal
PM11	Grupo Privado no 11º Dia Pós Natal
RF	Região Frontal
SNA	Sistema Nervoso Autônomo
SNC	Sistema Nervoso Central
UNIFESP	Universidade Federal de São Paulo

## RESUMO

O estresse precoce representa um importante fator de risco para transtornos psiquiátricos, incluindo ansiedade e depressão. Suas consequências tardias dependem, entre outros fatores, do período de desenvolvimento em que o evento adverso ocorre, em um fenômeno conhecido como *timing effect*. O objetivo do presente estudo foi avaliar a influência da privação materna (PM) em dois momentos do desenvolvimento neonatal sobre os comportamentos do tipo-depressivo e do tipo-ansioso, em ratos machos adultos, correlacionando esses dados com o perfil monoaminérgico desses animais. Após o nascimento, um terço das ninhadas foi submetido à PM no 3º dia pós-natal (PM3); outro terço, submetido à PM no 11º dia (PM11) e o último terço não foi submetido a nenhuma manipulação neonatal (CTL). Na idade adulta os ratos machos foram alojados individualmente e avaliados primeiramente quanto ao comportamento tipo-depressivo, realizada pela medida do consumo de sacarose durante o paradigma do estresse crônico moderado (ECM). Para tanto, metade dos animais de cada ninhada foi submetida ao paradigma do ECM enquanto que a outra metade foi utilizada como controle deste paradigma (NECM), totalizando-se seis subgrupos: CTL-NECM, PM3-NECM, PM11-NECM, CTL-ECM, PM3-ECM e PM11-ECM. O comportamento-tipo ansioso foi avaliado, ao final deste paradigma, no labirinto em cruz elevado (LCE). O perfil de liberação de corticosterona (CORT) foi avaliado imediatamente antes da exposição ao LCE e 30 e 60 minutos após o teste. Por fim, foi realizada a determinação das concentrações de monoaminas cerebrais por HPLC. Os resultados mostraram que: 1) a PM11 produziu menor ganho de peso ao longo do período avaliado; 2) embora o ECM tenha resultado em comportamento anedônico, a PM não modificou esse efeito; 3) os grupos PM3 e PM11 apresentaram redução de comportamento ansioso quando alojados individualmente na idade adulta, mas não submetidos ao ECM; 4) o ECM induziu aumento da resposta de CORT ao LCE; 5) os animais PM3 e PM11, alojados individualmente e não submetidos ao ECM, apresentaram redução das concentrações de serotonina na amígdala. Esses resultados podem ser interpretados à luz da hipótese *match/mismatch*, que postula que respostas comportamentais, neuroendócrinas e neuroquímicas adaptativas resultariam de uma consonância entre as experiências neonatais e

experiências na idade adulta. Segundo essa hipótese, indivíduos submetidos a estressores na infância poderiam exibir comportamentos mais adaptativos em situações de estresse na idade adulta.

**Palavras-chave:** Estresse neonatal. Comportamento emocional. Alojamento individual. Corticosterona. Serotonina. Amígdala.

## ABSTRACT

Early stress is an important risk factor for psychiatric disorders, including anxiety and depression. Its late consequences depend, among other factors, the developmental period in which the adverse event occurs, a phenomenon known as timing effect. The aim of this study was to evaluate the influence of maternal deprivation (DEP) at two moments in neonatal development on depressive- and anxious-like behaviors, in adult male rats, correlating these data with the monoaminergic profile of these animals. After birth, a third of litters underwent DEP on the 3rd postnatal day (DEP3); another third, underwent DEP at day 11 (DEP11) and the last third was not subjected to any neonatal handling (CTL). In adult male rats were housed individually and evaluated primarily for the depressive-like behavior, performed by measuring the sucrose consumption during moderate chronic stress paradigm (CMS). For this, half of the animals from each litter were submitted to a CMS while the other half was used as control in this paradigm (NCMS), totalizing six subgroups: CTL-NCMS, DEP3-NCMS, DEP11-NCMS, CTL-CMS, DEP3-CMS and DEP11-CMS. The anxious-like behavior was assessed at the end of this paradigm, in the elevated plus maze (EPM). The release profile of corticosterone (CORT) was measured immediately before exposure to EPM and 30 and 60 minutes after the test. Finally, the determination of the concentration of brain monoamine was performed by HPLC. The results showed that: 1) DEP11 produced less weight gain over the study period; 2) although the CMS resulted in anhedonic behavior, DEP did not change this effect; 3) DEP3 and DEP11 groups showed reduction of anxious-like behavior when housed individually in adulthood, but not subject to the CMS; 4) CMS induced increase in CORT response to EPM; 5) DEP3 and DEP11 animals, housed individually and not subject to the CMS, decreased concentrations of serotonin in the amygdala. These results can be interpreted in light of the match/mismatch hypothesis, which postulates that behavioral, neuroendocrine and neurochemical adaptive responses result from a consonance between neonatal and adulthood experiences. According to this hypothesis, individuals subjected to stressors in childhood could display more adaptive behaviors in stressful situations in adulthood.

**Key-Words:** Neonatal stress. Emotional behavior. Individual housing. Corticosterone. Serotonin. Amygdala.



# 1 INTRODUÇÃO

As teorias etiopatogênicas dos transtornos psiquiátricos estiveram quase sempre polarizadas entre causas inteiramente psicológicas, por um lado, e inteiramente genético-constitucionais, por outro. O que ambos modelos apresentam de semelhantes – o intrapsíquico e o genético-molecular – é uma continuada relação ambivalente com os fatores ambientais externos, de forma que estes podem ser considerados como parceiros de igual valor e importância na constituição das desordens mentais e comportamentais. Uma quantidade cada vez maior de dados reforça esse conceito e aponta atualmente para uma interação fundamental entre fatores genéticos e experiências ambientais atuando como determinantes da vulnerabilidade à doenças psiquiátricas (Plotsky et al., 1998, Caspi et al., 2003).

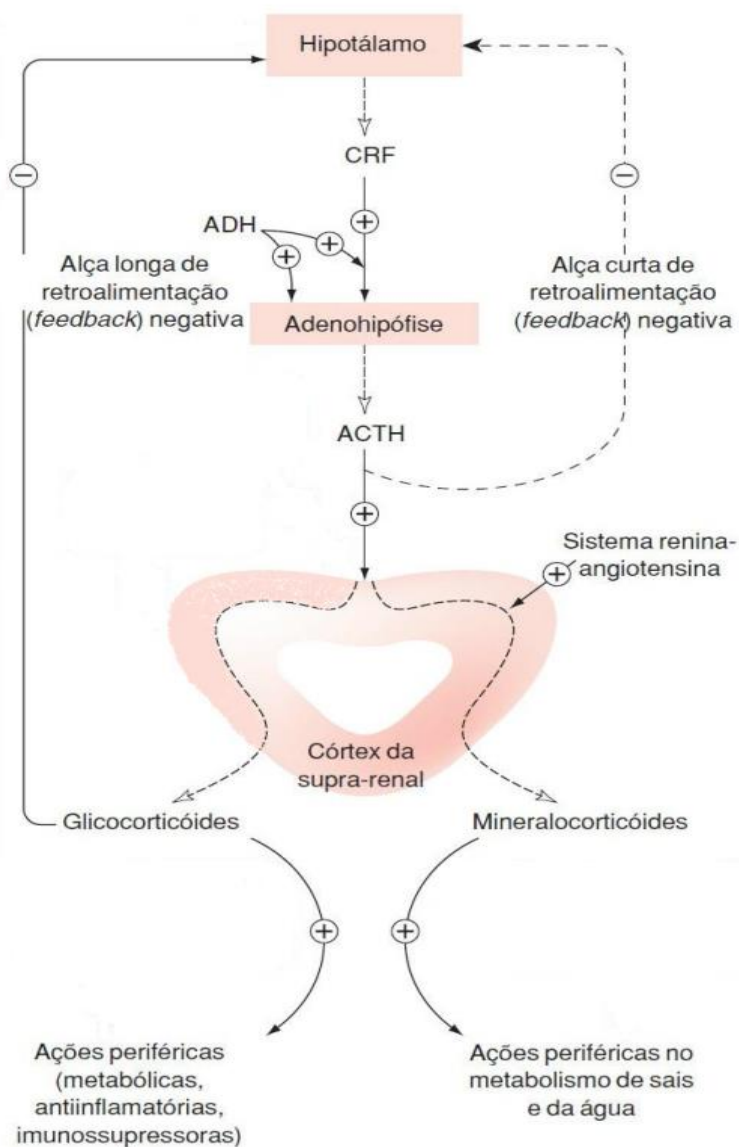
## 1.1 Estresse

O estresse é definido como "uma condição mental ou emocionalmente perturbadora que ocorre em resposta às influências externas adversas", bem como "um estímulo ou situação que causa essa condição" (Mello et al., 2003).

A resposta de seres humanos e de animais à exposição a um agente estressor consiste da mobilização de sistemas neurais, neuroendócrinos e metabólicos. Um estressor pode ser visto como um estímulo que perturba a homeostase, produzindo uma resposta inespecífica, que inclui a liberação de glicocorticoides, hipertrofia das glândulas adrenais e atrofia do timo (Lindenboim et al., 2010). Um estímulo estressor desencadeia uma resposta adaptativa que envolve diversas regiões cerebrais, incluindo, entre outras, o *locus coeruleus* (LC) no tronco cerebral, o núcleo paraventricular (NPV) do hipotálamo (HPT), a amígdala (AMG) e o hipocampo (HPC) no sistema límbico. A ativação dessas regiões regula a resposta ao estresse, induzindo ou inibindo o aumento da atividade do sistema nervoso autônomo (SNA) e do eixo hipotálamo-hipófise-adrenal (HPA). Essas respostas representam mecanismos homeostáticos que permitem ao indivíduo lidar com o estímulo e, subsequentemente “desligar” essa resposta através de um sistema de *feedback* negativo (Pacak, 2000).

O SNA fornece um mecanismo de resposta rápida ao estressor para o controle de atividades relacionadas à vida vegetativa, que envolve as atividades respiratória, cardiovascular, gastrointestinal, renal, endócrina e diversas outras. Essas atividades podem ser influenciadas pelas divisões simpática, parassimpática ou duas (Boehm et al., 2009).

Por outro lado, a ativação do eixo HPA faz com que neurônios do NPV do HPT secretem o hormônio liberador de corticotrofina (CRH) no sistema porta da hipófise. O CRH age então na adenohipófise induzindo a liberação do hormônio adenocorticotrófico (ACTH). O ACTH atua no córtex da glândula suprarrenal ou adrenal iniciando a produção de glicocorticoides (cortisol em seres humanos e corticosterona em roedores). Os glicocorticoides, então, interagem com seus receptores em múltiplos tecidos-alvo, incluindo o eixo HPA, onde são responsáveis pela inibição da secreção do ACTH pela pituitária e do CRH a partir do HPT por *feedback* negativo. A vasopressina ou hormônio antidiurético (ADH) atua em sinergia com o CRH, estimulando também a produção de ACTH, porém ele exerce pouca influência quando atua sozinho (Adell et al., 1988, Finlay et al., 1995) (Figura 1).



Adaptado de Juruena e colaboradores, 2004.

**Figura 1. Diagrama esquemático do eixo hipotálamo-hipófise-adrenal (HPA) demonstrando sua regulação (+) e o feedback negativo (-) via glicocorticóides.**

Vários fatores regulam a atividade do eixo HPA. Há evidência de inervação GABAérgica, glutamatérgica, catecolaminérgica, serotoninérgica e dopaminérgica direta sobre os neurônios produtores de CRF no HPT, influenciando a liberação desse neuropeptídeo (Andersen et al., 2009, Fincham et al., 2009, Mercken et al., 2009, Simmons et al., 2009). Por exemplo, a serotonina (5-HT) exerce influência estimuladora nos neurônios de CRF, por meio dos subtipos de receptores 5-HT<sub>1A</sub>, 5-

HT<sub>1B</sub>, 5-HT<sub>1C</sub> e 5-HT<sub>2</sub>, enquanto que a noradrenalina (NA) possui um efeito mais variável, sendo estimuladora em doses baixas (por sua ação sobre receptores  $\alpha_1$ ) e inibitória em doses altas (pela ativação de receptores  $\beta$ ) (Adell et al., 1988).

Anormalidades nesse sistema de resposta ao estresse parecem ser a principal causa para o desenvolvimento de episódios de transtornos psiquiátricos em indivíduos predispostos (Checkley, 1996). Essas anormalidades parecem estar relacionadas, por um lado, às mudanças na capacidade dos glicocorticoides circulantes em exercer sua retroalimentação negativa na secreção dos hormônios do eixo HPA por meio da ligação aos receptores mineralocorticoides e glicocorticoides (Adell et al., 1988, Gold et al., 1988, Nemeroff, 1996, De Kloet et al., 1998, Pariante and Miller, 2001). Na depressão melancólica, por exemplo, ocorre desregulação da retroalimentação negativa no eixo HPA resultando em hipercortisolemia (Gold et al., 1988, Nemeroff, 1996).

Por outro lado, a exposição prolongada ao estresse está associada a numerosas alterações em monoaminas cerebrais (5-HT e NA) (Roth et al., 1982, Adell et al., 1988, Finlay et al., 1995, Stein and McAllister, 2009). Neurônios serotoninérgicos se projetam do núcleo dorsal da rafe para o córtex cerebral, o HPT, o tálamo, os núcleos da base, o septo pelúcido e o HPC. Suas vias têm funções inibitórias e facilitadoras no cérebro. A liberação de 5-HT é modulada de maneira diferente em situações específicas de estresse, com aumento transitório de sua liberação relacionado ao estresse agudo e à redução de atividade eventualmente relacionada ao estresse crônico. Existe considerável evidência sugerindo que distúrbios na neurotransmissão serotoninérgica desempenham papel importante no desenvolvimento da depressão. Alterações no sistema serotoninérgico, tais como redução das concentrações plasmáticas de triptofano, redução do metabólito da 5-HT, o ácido 5-hidroxi-indol-acético (5-HIAA) no líquido cerebrospinal, redução da recaptção de 5-HT plaquetária e respostas neuroendócrinas “achatadas” em estudos de desafio de diferentes receptores serotoninérgicos, sugerem redução na responsividade serotoninérgica, e têm sido relatadas em pacientes depressivos, quando comparados com controles saudáveis (Steines et al., 2009). Os corpos celulares dos neurônios noradrenérgicos cerebrais, por sua vez, ficam situados no LC e se projetam rostralmente para o HPT, gânglios da base, sistema límbico e córtex cerebral (Steinbuechel et al., 2009). O feixe prosencefálico medial (FPM) é a

principal via ascendente para o córtex anterior e sua estimulação induz comportamento direcionado de busca por recompensa. O estresse crônico resulta em redução da atividade do FPM, levando a anergia, anedonia e redução da libido, alterações comportamentais classicamente descritas em estados depressivos (Tanti and Belzung, 2010).

## **1.2 Estresse e Modelos Animais**

Os transtornos psiquiátricos são caracterizados por um amplo espectro de alterações, as quais não são reproduzíveis em sua totalidade em modelos animais (MacMillan et al., 2009). Diversos modelos tentam reproduzir os endofenótipos patológicos, apresentando uma razoável analogia com a patologia humana, sua sintomatologia e mudanças comportamentais que podem ser monitoradas objetivamente (Holt et al., 2009).

Na ausência de causas genéticas claras e definidas, parte significativa das pesquisas sobre transtornos psiquiátricos em modelos animais baseou-se na influência do estresse e dos eventos emocionais como potentes fatores de risco. Diversos paradigmas de estresse têm sido empregados, destacando-se, entre eles, modelos de estresse agudo, estresse crônico e estresse precoce (Stein et al., 2009a).

Os modelos para avaliação de drogas antidepressivas que se valem de estressores agudos incluem o teste do nado forçado e da suspensão pela cauda. Estes testes também são utilizados na aferição do comportamento tipo-depressivo (Castagne et al., 2011). No teste do nado forçado, o animal é colocado em um cilindro de água, que representa uma situação inescapável e, após um período inicial de tentativas de escape, representado pelos comportamentos de natação e escalada, o animal finalmente mostra uma postura flutuante ou imóvel (Borsini and Meli, 1988, Petit-Demouliere et al., 2005). O teste de suspensão pela cauda, por sua vez, avalia o tempo de imobilidade do animal mantido suspenso pela cauda, sendo que a redução deste parâmetro indica atividade antidepressiva. (Steru et al., 1985, Vaugeois et al., 1997, Cryan et al., 2005).

Entre os modelos de estresse crônico, o primeiro foi o de desamparo aprendido, no qual após um estresse incontrolável e inevitável, como a exposição a

choques elétricos inescapáveis, os animais desenvolvem um estado de "abandono" de tal forma que, quando reexpostos aos mesmos choques, mesmo com possibilidade de fuga, os animais não o fazem, denotando uma dificuldade de aprendizagem (Maier and Seligman, 1976). Atualmente, os mais utilizados envolvem estressores psicossociais e o estresse crônico moderado. O modelo de estresse psicossocial inclui paradigmas como a derrota social crônica e o isolamento social prolongado. Enquanto submeter os roedores a repetidos episódios de subordinação social os leva a exibir uma variedade de sintomas tipo-depressivos como redução de interação social e anedonia, o isolamento social prolongado durante a idade adulta tem resultado em menor consumo de sacarose e alterações na busca de recompensa sexual (Koolhaas et al., 1997). O modelo do estresse crônico moderado, por sua vez, consiste em submeter os animais a uma série de estressores físicos e psicológicos de forma crônica e imprevisível (Willner, 1997) e será detalhado mais adiante.

Não menos importante, o estresse precoce, usualmente aplicado sob a forma de interrupções ou perturbações da relação mãe-filhote, está relacionado a numerosas alterações cognitivas, emocionais e metabólicas que podem persistir até a idade adulta. Alterações da atividade do eixo HPA, aumento da imobilidade no teste do nado forçado, enfraquecimento da inibição pré-pulso e déficits de aprendizagem espacial decorrentes desse estresse têm sido associadas a uma variedade de transtornos neuropsiquiátricos (Graham et al., 1999). Segundo estudos conduzidos por Llorente e colaboradores, na idade adulta, animais privados da mãe mostram um notório prejuízo cognitivo e alterações neurobiológicas sugestivas de perda de plasticidade sináptica e hipofuncionalidade do sistema glutamatérgico hipocampal, deficiências recentemente relacionadas à etiopatogenia da esquizofrenia (Llorente-Berzal et al., 2012). Metabolicamente, Viveros e colaboradores evidenciaram redução do peso corporal, durante a puberdade, em animais privados da mãe, além de diminuição das concentrações de leptina circulante na vida adulta. Ainda segundo Viveros e colaboradores a privação materna tem um efeito sexual dimórfico, com redução das concentrações de testosterona em ratos adultos machos submetidos à privação materna (Viveros et al., 2010).

### 1.2.1 Modelo do Estresse Crônico Moderado

O estresse crônico moderado (ECM) é um modelo experimental de depressão que tem por objetivo verificar a relação entre a exposição de animais, comumente ratos, a um conjunto de estímulos aversivos crônicos e de intensidade moderada por um período ininterrupto de tempo (no máximo seis semanas) e o desenvolvimento de anedonia (Leibowitz et al., 1994). A anedonia, ou insensibilidade ao reforço em modelos experimentais, é uma característica comportamental similar à perda de interesse ou prazer e sintomas de melancolia apresentados por pacientes deprimidos (Germann et al., 1999).

Nesse modelo de depressão, a anedonia é avaliada por meio da ingestão (em volume) de pelo menos duas substâncias, geralmente água e solução de sacarose, antes, durante e depois da exposição ao protocolo de estresse. Quando os animais apresentam redução no consumo de solução adocicada durante o protocolo de estresse, comparado com o consumo medido antes da exposição ao ECM, diz-se que eles apresentam anedonia ou que apresentam redução da sensibilidade ao reforço (Contarino et al., 1999, Germann et al., 1999, Kim et al., 1999, Zakzanis and Heinrichs, 1999). Com o objetivo de reverter esse sintoma de depressão (anedonia), os sujeitos foram tratados com um antidepressivo tricíclico (desmetilimipramina) por um período de quatro semanas e os aqueles que receberam a droga apresentaram aumento no consumo de solução de sacarose, chegando próximo aos valores obtidos antes da exposição ao protocolo (linha de base). Esse resultado validou a anedonia como uma característica de depressão, e o ECM como um modelo experimental para aferir essa psicopatologia (Germann et al., 1999). Esse modelo é sensível a outros tratamentos antidepressivos clássicos como imipramina (Stein et al., 2009b) e inibidores seletivos da receptação de serotonina (Surget et al., 2011), além de tratamentos em fase experimental, como o *deep brain stimulation* (Hamani et al., 2012b).

Inúmeros trabalhos foram realizados nas últimas duas décadas utilizando o ECM. Uma revisão realizada por Willner em 2005 mostrou, em linhas gerais, que a submissão de animais a um conjunto de estímulos aversivos crônicos e moderados, além de alterar a sensibilidade à recompensa, também provoca alterações em outras características presentes no diagnóstico de depressão (Brambrink et al., 1999), incluindo variação na ingestão de alimentos (Eberle et al., 1999, Ehlert et al.,

1999, Lammers et al., 1999), perda de peso corporal (Stenson and McIntosh, 1999), redução de atividade motora (Li et al., 2010), entre outros. Na maioria desses estudos, foram administradas drogas antidepressivas a fim de reverter os sintomas produzidos pelo procedimento de ECM. Os tratamentos medicamentosos proporcionaram aumento no consumo da solução de sacarose, restabelecimento do peso corporal, diminuição na variação do padrão alimentar e aumento na locomoção (Brambrink et al., 1999, Stenson and McIntosh, 1999, Strekalova and Steinbusch, 2010)

### **1.2.2 Estresse neonatal**

O período neonatal e a adolescência representam fases durante as quais há intensa formação do sistema nervoso central (SNC), com a superprodução e poda de sinapses. Estes períodos de rápido desenvolvimento constituem janelas de vulnerabilidade (Andersen and Teicher, 2008), em que o estresse pode afetar permanentemente o funcionamento do cérebro, aumentando a probabilidade de ocorrência de comportamentos anormais na idade adulta.

Durante o período neonatal, em ratos e camundongos, o eixo HPA, apresenta um padrão peculiar de atividade, que é diferente daquele encontrado no adulto. Esse período que se estende entre o 4º e 14º dias de vida é caracterizado por uma insensibilidade das adrenais ao ACTH (Witek-Janusek, 1988, Rosenfeld et al., 1991), de modo que a maioria dos estressores que normalmente desencadeariam uma resposta de estresse, não o faz nesse período (Walker et al., 1991). Esse período de hiporresponsividade ao estresse (PHRE) é altamente adaptativo, uma vez que, como os glicocorticoides são hormônios catabólicos, sua secreção prolongada é prejudicial para desenvolvimento do neonato. Ademais, neste período, a maior parte da corticosterona (CORT) circulante encontra-se livre, pois a quantidade de globulina de ligação aos corticoides é muito baixa, de modo que mesmo em baixas concentrações, toda a CORT circulante pode agir em seus receptores (Viau et al., 1996; Walker et al., 1990).

Os mecanismos de indução do PHRE ainda não foram definitivamente esclarecidos. Alguns achados sugerem que sinais metabólicos periféricos poderiam induzir a insensibilidade das adrenais. Assim, mostrou-se que em ratos neonatos, a



leptina inibe a esteroidogênese induzida por ACTH (Laxton et al., 2012), enquanto que em camundongos, a Ghrelina e glicose inibem o aumento da secreção de ACTH e de CORT induzida por privação materna (Schmidt et al., 2006). Porém, é certo que o PHRE está sob o controle inibitório dos comportamentos maternos (Stanton and Levine, 1990, Rosenfeld et al., 1993, Suchecki et al., 1993b, van Oers et al., 1998b). Segundo Levine, a simples separação do animal da mãe por um período de 8 horas já é suficiente para sensibilizar a adrenal neonatal ao ACTH e desencadear a liberação de CORT em resposta a um estressor moderado (Levine et al., 1991). Após 24 horas de privação materna, ratos neonatos mostram elevadas concentrações basais de CORT no plasma e apresentam uma resposta aumentada de CORT e de ACTH ao estresse (Levine et al., 1991, Suchecki et al., 1993a). A expressão do RNA mensageiro para *c-fos* no NPV também está aumentada em filhotes que foram separados da mãe (Smith et al., 1997). Dentre os comportamentos realizados pela mãe que contribuem para a regulação do eixo HPA durante o desenvolvimento, a estimulação tátil parece ser capaz de prevenir a maior parte das alterações no SNC que ocorrem após a privação materna (van Oers et al., 1998b). Por outro lado, a amamentação é essencial para a manutenção da insensibilidade da glândula adrenal ao ACTH, enquanto que o contato passivo com a ninhada suprime a resposta ao estresse (Rosenfeld et al., 1993, Suchecki et al., 1993b).

Segundo Schmidt e colaboradores, a privação materna promove mudanças dinâmicas em todos os componentes do eixo HPA do neonato que parecem responder à separação materna em diferentes tempos. A principal ativação do HPT, por exemplo, ocorre entre 4 e 8 h da ausência materna. Por outro lado, durante a segunda metade do período de privação, verifica-se uma contenção no aumento da liberação de ACTH e CORT pelo mecanismo de *feedback* negativo (Schmidt et al., 2004). Em condições normais de interação entre a mãe e os filhotes, as respostas de ACTH e CORT ao estresse estão suprimidas (Akabayashi et al., 1994; Levine et al., 1991; Vazquez et al., 2006; Witek-Janucek, 1988).

Estímulos aparentemente inofensivos, como a manipulação neonatal, ou mais intensos, como o frio e choque elétrico, quando aplicados durante o período de hiporresponsividade ao estresse, podem resultar em alterações comportamentais e endócrinas na vida adulta (Stewart et al., 1994). Sendo assim, o estresse precoce

pode representar um importante fator de risco para transtornos psiquiátricos, incluindo ansiedade e depressão (Kessler and Magee, 1993, Zavaschi et al., 2002). Dois dos modelos mais utilizados de adversidade no período neonatal envolvem perturbações da relação mãe-filhote, incluindo períodos repetidos de separação materna (3-6 h/dia) ou um único período de 24 h de privação materna - PM (Rosenfeld et al., 1992a, Oomen et al., 2009), que é o foco deste trabalho.

Entre os dias pós-natais (DPN) 3 e 15, episódios únicos de PM induzem aumento nas concentrações basais de CORT e secreção sustentada de ACTH e CORT em resposta a um estressor moderado (Rosenfeld et al., 1991, Rosenfeld et al., 1992b, Suchecki et al., 1993a, Cirulli et al., 1994, Suchecki et al., 1995, Levine, 2001, Schmidt et al., 2004, Vazquez et al., 2006, Dent et al., 2007, Oomen et al., 2009); uma vez desencadeada, a resposta de CORT a um estresse tem duração de pelo menos 2 horas (Suchecki et al., 1995), período este muito maior do que aquele observado em ratos adultos estressados (Suchecki et al., 2002).

Os efeitos tardios da separação materna estão bem caracterizados em ratos e camundongos e incluem alterações dos comportamentos tipo-ansioso e depressivo (Kalinichev et al., 2002, Daniels et al., 2004, Lee et al., 2007, Marais et al., 2008) e abuso de drogas (Huot et al., 2001, Kikusui et al., 2005, Moffett et al., 2007, Cruz et al., 2008). Entretanto, os efeitos da PM são mais bem caracterizados em ratos neonatais e juvenis em relação à resposta ao estresse (Rosenfeld et al., 1991, Rosenfeld et al., 1992b, Suchecki et al., 1993a, Cirulli et al., 1994, Suchecki et al., 1995, Levine, 2001, Schmidt et al., 2004, Vazquez et al., 2006, Dent et al., 2007, Oomen et al., 2009), sendo poucos os estudos que se dedicaram a avaliar o comportamento desses animais na idade adulta.

Entre as consequências tardias da PM na resposta ao estresse e no funcionamento do eixo HPA, relata-se hiperresponsividade ou hiporresponsividade ao estresse em animais submetidos à PM no 3<sup>o</sup> – PM3 (van Oers et al., 1998a) ou PM no 11<sup>o</sup> dia de vida – PM 11 (Suchecki and Tufik, 1997, van Oers et al., 1998a), respectivamente. Do ponto de vista comportamental, a PM3 resulta em aumento da reatividade em tarefas de memória com conteúdo emocional (Oomen et al., 2010, Oomen et al., 2011), enquanto que a PM9 resulta em alterações que se assemelham a sintomas de esquizofrenia na prole adulta (Ellenbroek et al., 2000, Husum et al., 2002, Ellenbroek et al., 2005), além de comportamentos-tipo ansioso e

depressivo em ratos adolescentes (Rees et al., 2006, Llorente et al., 2007, Rentesi et al., 2010). Ratos adolescentes submetidos à PM11 apresentam redução do comportamento tipo-ansioso medido no campo aberto (Suchecki et al., 2000), enquanto que em ratos adultos, a PM11 produz aumento do comportamento tipo-ansioso no teste de transição claro-escuro (Faturi et al., 2010b) e no labirinto em cruz elevado (LCE) (Barbosa Neto et al., 2012).

Do ponto de vista neuroquímico, poucos estudos avaliaram a neurotransmissão de animais privados da mãe por 24 horas. Entre os estudos publicados verifica-se aumento da responsividade de receptores dopaminérgicos na substância negra de animais adultos submetidos a PM3 (Rots et al., 1996), além de aumento das concentrações de dopamina (DA) no córtex pré-frontal e no estriado e redução do *turnover* de DA no estriado em ratos adolescentes submetidos a PM9 (Choy et al., 2009), além de aumento das concentrações de 5-HT no córtex pré-frontal, mesencéfalo, estriado e HPC (Llorente et al., 2010). Além disso, animais adultos submetidos à PM11 apresentam aumento das concentrações de aspartato e glutamato e redução das concentrações de taurina e ácido gama-aminobutírico (GABA) quando comparados aos não manipulados, alterações essas que podem mediar o comportamento tipo-ansioso observado (Barbosa Neto et al., 2012).

Com base em estudos prévios publicados por nosso e outros grupos, nos quais a privação materna produz aumento de comportamentos emocionais, o presente estudo visou avaliar a influência dessa manipulação em dois momentos distintos do desenvolvimento cerebral (PM3 e PM11) sobre os comportamentos do tipo-depressivo e tipo-ansioso em ratos machos adultos e avaliar as concentrações de monoaminas em estruturas encefálicas relacionadas a esses comportamentos.

## **2 JUSTIFICATIVA**

Visto que o estresse precoce aumenta a vulnerabilidade individual para o desenvolvimento de transtornos psiquiátricos induzidos pelo estresse na idade adulta e a grande co-morbidade entre os transtornos ansiosos e de humor, a proposta do presente estudo foi avaliar a influência da privação materna em diferentes idades sobre os comportamentos tipo-depressivo e tipo-ansioso de ratos machos adultos e sobre as concentrações de monoaminas em regiões do SNC envolvidas com transtornos depressivo e ansioso.

### 3 OBJETIVOS

1. Avaliar a influência da privação materna em diferentes momentos do desenvolvimento cerebral na instalação do comportamento tipo-depressivo induzido pelo paradigma de estresse crônico moderado pela quantificação do consumo de sacarose;
2. Avaliar a influência da privação materna em diferentes momentos do desenvolvimento cerebral no comportamento tipo-ansioso, medido no labirinto em cruz elevado;
3. Determinar as concentrações plasmáticas basais de corticosterona e em resposta à exposição ao labirinto em cruz elevado (desafio) em animais privados da mãe nos dias pós-natais 3 ou 11;
4. Determinar as concentrações de monoaminas em regiões cerebrais envolvidas com a emocionalidade e a resposta ao estresse (região pré-frontal, hipotálamo, amígdala, hipocampo dorsal e hipocampo ventral) em animais privados da mãe nos dias pós-natais 3 ou 11.

## 4 MÉTODOS

### 4.1 Delineamento experimental

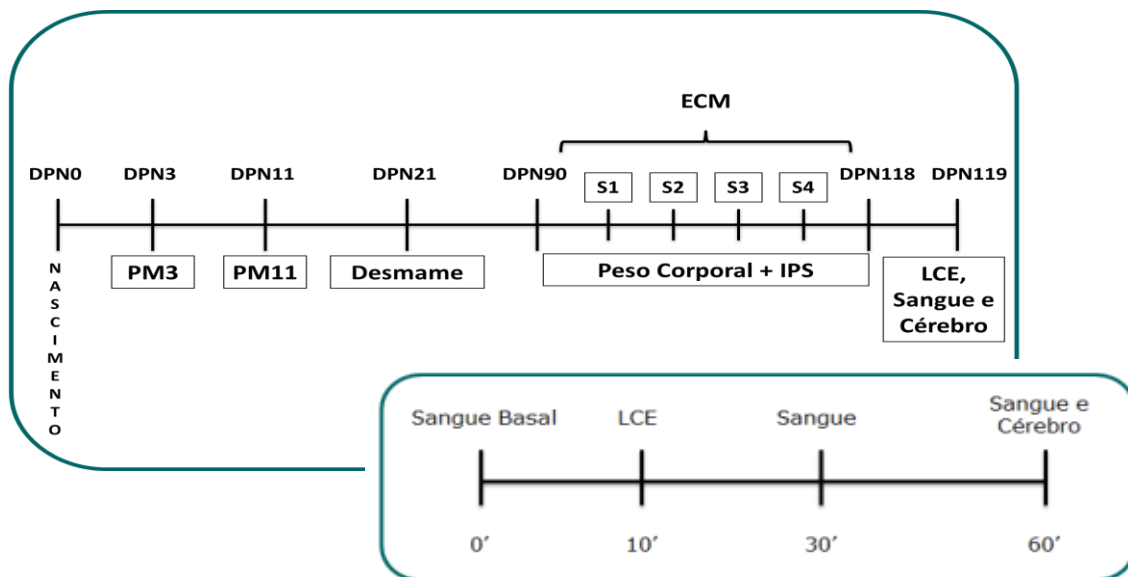


Figura 2. Esquema ilustrativo do procedimento experimental

### 4.2 Sujeitos

Os animais utilizados para os cruzamentos foram ratos Wistar, machos e fêmeas, com três meses de idade, provenientes do Centro de Desenvolvimento de Modelos Experimentais para Medicina e Biologia (CEDEME) da Universidade Federal de São Paulo (UNIFESP). Os cruzamentos e manutenção das mães e de suas ninhadas foram realizados no Departamento de Psicobiologia. Brevemente, duas fêmeas virgens foram alojadas com um macho experiente por um período de cinco dias, após os quais, os machos foram trocados de caixa, permanecendo por mais cinco dias com as fêmeas. Após esse período, os machos foram retirados e as fêmeas permaneceram juntas na gaiola por mais uma semana, quando, então, foram alojadas individualmente. Ao se completarem 20 dias desde o início dos cruzamentos, as gaiolas foram inspecionadas diariamente, às 9:00 h e às 17:00 h para a detecção de filhotes.

Na execução do projeto foi realizado o cruzamento de 33 fêmeas, das quais 26 engravidaram. O dia do nascimento foi designado dia pós-natal 0 (DPN 0). No DPN

1, as ninhadas foram padronizadas para quatro fêmeas e quatro machos, sempre que possível.

O desmame foi realizado no DPN 21, quando as ninhadas foram separadas por sexo e alojadas em gaiolas plásticas (30 x 16 x 18 cm) com comida (Nuvilab) e água à vontade, num ambiente de temperatura controlada ( $22 \pm 2^\circ\text{C}$ ) e ciclo claro-escuro de 12 horas (luzes acesas a partir das 7:00 h). Apenas os filhotes machos foram utilizados nos experimentos.

Todos os procedimentos estão de acordo com a legislação Brasileira que rege a experimentação animal e foram aprovados pelo Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) da UNIFESP, de acordo com as diretrizes internacionais para o cuidado com animais de pesquisas (Protocolo 1418/10) (Anexo I).

### **4.3 Privação materna**

No DPN 3 ou 11 as ninhadas foram retiradas da gaiola-moradia, alojadas em nova gaiola contendo maravalha da gaiola-moradia, transportadas para outra sala, e mantidas sobre uma manta térmica com temperatura ajustada para  $30\text{-}33^\circ\text{C}$  onde permaneceram por 24 horas antes de retornar aos cuidados da mãe. A PM teve início sempre pela manhã, entre 09:00 h – 10:00 h.

Do total de ninhadas, um terço foi submetido à privação materna no DPN 3 (grupo PM3); outro terço, submetido à privação materna no DPN 11 (grupo PM11) e o último terço não foi submetido a nenhuma manipulação durante a infância (grupo controle, CTL).

Os animais foram desmamados aos 21 dias de vida e alojados em grupo, de acordo com sua ninhada, em gaiolas plásticas.

### **4.4 Consumo de sacarose no modelo de estresse crônico moderado**

Em cada ninhada composta por quatro machos, dois foram submetidos ao paradigma do ECM, enquanto que os outros dois foram utilizados como controle deste paradigma (não ECM - NECM), sendo que todos os animais foram alojados individualmente a partir do início do período de testes (DPN90). Deste modo, foram compostos seis subgrupos: 1) controle sem ECM (CTL-NECM); 2) PM3 sem ECM

(PM3-NECM); 3) PM11 sem ECM (PM11-NECM); 4) controle submetido ao ECM (CTL-ECM); 5) PM3 submetido ao ECM (PM3-ECM); 6) PM11 submetido ao ECM (PM11-ECM).

Aos 90 dias, os animais foram inicialmente treinados, por duas semanas, a beber uma solução de sacarose a 1%, com livre escolha entre duas garrafas (uma contendo a solução de sacarose e a outra, água). A relação entre o consumo de sacarose e o consumo total de líquido (solução de sacarose + água = índice de preferência pela sacarose - IPS) serviu como critério para a exclusão de animais *outliers*, ou seja, aqueles que consumiam muita ou pouca sacarose (determinado pelo teste Z-escore).

Após o descarte dos *outliers*, foi realizado o balanceamento entre os animais, de modo que o consumo de sacarose fosse equivalente entre os animais do grupo NECM e os do ECM, estabelecendo-se uma linha de base igual para os dois grupos. Na sequência, deu-se início ao ECM, que consistiu na exposição diária dos animais a estressores apresentados de maneira imprevisível ao longo de uma semana: dois períodos de privação total de água e alimento (por 15 horas), dois períodos de 18 horas em gaiola com maravalha molhada, dois períodos em gaiolas inclinadas (45° a 60° de inclinação), um período de pareamento com outro animal (18 horas), dois períodos de 5 horas e um período de 4 horas de ruído constante (85 dB), três períodos de 1 hora de exposição a uma flanela com odor de predador (gato ou raposa, a escolher), três períodos de 12 horas de iluminação contínua, dois períodos de 16 horas de privação parcial de alimento (30 g de ração), dois períodos de 1 hora com uma garrafa de água vazia e dois períodos de 2 horas com luz estroboscópica (Stein et al., 2009b). A exposição dos animais a esse esquema de estresse imprevisível repetiu-se por quatro semanas.

Os animais foram pesados semanalmente e o IPS foi determinado, também semanalmente, durante um período de 1 hora (entre 13:00 h e 14:00 h), para todos os animais, incluindo os NECM (Stein et al., 2009b, Hamani et al., 2012b). O IPS serviu como parâmetro de avaliação do comportamento tipo-depressivo nesses animais (anedonia).



#### 4.5 Avaliação do comportamento tipo-ansioso

A avaliação do comportamento tipo-ansioso foi realizada no LCE. O aparelho consiste em um labirinto de madeira elevado 50 cm acima do solo; apresenta quatro braços na forma de uma cruz e uma área central (10 x 10 cm) cercada por uma beirada de madeira de 0,5 cm de altura com a função de guia tátil para os animais. São denominados braços fechados aqueles com paredes (50 x 10 x 50 cm) e os braços abertos (50 x 10 cm) aqueles sem as paredes. O chão do labirinto é marcado com linhas que se espaçam em 10 cm umas das outras, a fim de se registrar o número de segmentos percorridos pelo animal (atividade motora nos braços abertos e fechados). Os testes foram realizados no período da manhã entre 9:00 h e 12:00 h.

O teste teve duração de cinco minutos e cada rato foi colocado individualmente no segmento central, sempre voltado para um dos braços abertos. O labirinto foi limpo com uma solução de 20% etanol/água (v:v) e seco entre as sessões de teste. O teste foi realizado sob luz branca e filmado para posterior análise.

Os comportamentos mensurados foram: (i) % de tempo despendido nos braços abertos (BA); (ii) % de tempo despendido no centro; (iii) frequência de mergulhos da cabeça na borda dos BA (comportamento de *head dipping*); (iv) frequência de *grooming* (quando o animal utilizava as patas para limpeza do focinho e cabeça) nos BF; (v) frequência de *rearing* (quando o animal se elevava e se equilibrava na cauda e membros posteriores) nos BF, BA e no centro; (vi) frequência de avaliações do ambiente (*scanning*) (quando animal eleva somente a cabeça para explorar o ambiente) nos BF, BA e no centro; (vii) frequência de posturas estiradas (*stretching*) (quando o animal exibia uma postura corporal alongada) nos BF, BA e no centro). Os comportamentos *head dipping*, *scanning* e *stretching* também foram analisados conjuntamente, configurando um comportamento conhecido como *risk assessment* (avaliação de risco). Esses parâmetros foram selecionados com base nos trabalhos de Weiss e colaboradores (Weiss et al., 1998) e Rodgers e Dalvi (Rodgers and Dalvi, 1997).

#### **4.6 Coleta de sangue**

No dia seguinte ao fim do período de ECM, os animais foram submetidos à coleta de sangue por meio de uma pequena incisão na extremidade da cauda, seguindo-se de ordenha das veias e artérias da cauda (entre 8:00 h e 10:00 h). Esse procedimento permitiu a coleta de, aproximadamente, 200 µl de sangue e foi realizada em sala diferente daquela em que foi realizada a avaliação comportamental. Em seguida, esses animais foram expostos, por cinco minutos, ao LCE, para avaliação do comportamento do tipo-ansioso e que também induz reatividade do HPA (Suchecki et al., 2002, Barbosa Neto et al., 2012), de modo que 30 minutos após a exposição ao labirinto os animais foram submetidos a uma nova coleta de sangue pela cauda e 60 minutos após o LCE os animais foram eutanasiados por decapitação, sendo o sangue e o cérebro coletados para posteriores avaliações.

O sangue foi coletado em tubos Eppendorf contendo ácido etilenodiamino tetra-acético (EDTA) (60 mg/ml; 0,1 ml/tubo), resfriados em isopor contendo gelo, e centrifugados a 2300 rpm a 4°C por 20 minutos, para a obtenção do plasma. O plasma foi armazenado em freezer -20°C até a realização das dosagens hormonais.

#### **4.7 Determinação das concentrações plasmáticas de corticosterona**

As concentrações plasmáticas de CORT foram determinadas pelo método de radioimunoensaio, utilizando-se um kit comercial específico para ratos e camundongos (ICN Biomedicals, Costa Mesa, CA, USA), com uma modificação do método original, em que o volume da amostra é reduzido para 5 µl (Thrivikraman et al., 1997). A sensibilidade do método é de 3,125 ng/ml e variações intra- e entre-ensaios são de 7,1% e 10,3%, respectivamente.

#### **4.8 Determinação de monoaminas cerebrais e seus metabólitos**

Os cérebros foram obtidos por decapitação e dissecados para a determinação das concentrações de NA, 5-HT, ácido homovanílico (HVA), 5-HIAA, DA e ácido 3,4-di-hidroxifenilacético (DOPAC). A dissecação foi realizada pela técnica de *punch*, sendo obtidas as seguintes regiões: LC, HPT, hipocampo dorsal (HPCd), hipocampo ventral (HPCv), AMG e região frontal (RF).

A determinação das monoaminas e seus metabólitos foi realizada pela técnica de *High Performance Liquid Chromatography* (HPLC), com detecção e quantificação eletroquímica, como descrito em Machado e colaboradores (Stein and McAllister, 2009). Brevemente, os tecidos foram individualmente pesados e homogenizados por sonda ultrasônica em 500 µL de solução ácido perclórico (0,1M de ácido perclórico, 0,4mM de metabissulfito de sódio como agente antioxidante e 0,2mM de EDTA). Os homogenatos foram centrifugados a 20.000 g por 15 min a 4°C, filtrados em membranas de acetato de celulose (tubos para microcentrífuga com filtro acoplado de 0,22 µm, Corning Spin-x® centrifuge tube filters) e estocados a -80°C para análises posteriores.

O precipitado foi diluído em uma solução de hidróxido de sódio a 0,1 N e avaliado para proteínas utilizando a quantificação colorimétrica em microplaca, pelo ácido bicinônico (Pierce Chemical, Rockford, IL). Alíquotas de 20 µL dos sobrenadantes foram injetados em um circuito fechado de alta pressão de um aparelho de cromatografia líquida (Auto-injetor SIL-10A; Bomba LC-10AD; Shimadzu, Japão) e submetidos à separação isocrática rápida de fase reversa por um sistema de colunas baseadas em sílica C18 (coluna Spheri-5, C18, ODS, 5 µm, 25 cm x 4,6 mm, conectadas a uma pré-coluna NewGuard Cartridge Column, RP-18, 7 µm; PerkinElmer Brownlee Columns, EUA). A fase móvel foi constituída de um tampão de 0,163 M de ácido cítrico e de 0,06 M de fosfato de sódio dibásico anidro, com 0,69 mM de octil-sulfato de sódio como agente pareador de íons, adicionados com 12 mM de EDTA e ácido ortofosfórico, o suficiente para estabilizar o pH em 2,85. A polaridade da fase foi previamente ajustada adicionando-se 4% de acetonitrila e 1,7% de tetrahidrofurano em veículo aquoso (água bidestilada). A fase móvel foi então filtrada em uma membrana de acetato de celulose de 0,2 µm, degaseificada por meio do borbulhamento de gás hélio e circulada no sistema a um fluxo de 1,4 mL/minuto. As monoaminas foram detectadas eletroquimicamente utilizando um detector amperométrico (L-ECD-6A, Shimadzu, Japão), por oxidação em um eletrodo de vidro/carbono a um potencial de 850 mV positivos em relação a outro eletrodo de referência Ag-AgCl. Cada amostra foi analisada em duplicata para as concentrações de NA, HVA, 5-HT, 5-HIAA, DA e DOPAC. A taxa de recuperação dos analitos foi determinada pela adição de uma quantidade pré-determinada do padrão interno diidroxibenzilamina (DHBA) no momento da homogeneização dos

tecidos. As áreas dos picos das amostras foram comparadas com as áreas dos picos dos padrões de cada neurotransmissor ou metabólito, injetados em concentrações conhecidas, de forma intervalada entre as corridas.

#### **4.9 Análise estatística**

Os resultados de peso corporal e IPS foram analisados por Análise de Variância (ANOVA) de três vias para medidas repetidas, com fatores grupo (CTL, PM3 e PM11) x condição (NECM, ECM) x tempo (medida repetida – Basal, semana 1, semana 2, semana 3, semana 4). As concentrações de CORT também foram analisadas por ANOVA de três vias para medidas repetidas, com fatores grupo (CTL, PM3 e PM11) x condição (NECM, ECM) x tempo (medida repetida – Basal, 30 min e 60 min). Os comportamentos no LCE e as concentrações de monoaminas e de seus metabólitos por região foram analisadas, separadamente, por ANOVA de duas vias com fatores grupo (CTL, PM3 e PM11) x condição (NECM, ECM). Quando a análise mostrou ausência de interação, os grupos foram comparados, separadamente, em cada condição, por ANOVA de uma via. A análise *a posteriori* foi feita pelo teste de Newman-Keuls e em todos os casos, o nível de significância foi estabelecido em  $p < 0,05$ .

## 5 RESULTADOS

### 5.1 Peso corporal

A ANOVA detectou efeito principal do grupo [ $F_{(2,110)} = 6,28, p < 0,005$ ]. A análise *a posteriori* revelou redução significativa do peso corporal do grupo PM11 comparado ao do grupo CTL ( $p < 0,005$ ). Verificou-se ainda uma tendência dos animais do grupo PM3 pesarem menos que os animais do grupo CTL ( $p = 0,058$ ) (Figura 3).

A ANOVA detectou ainda interação entre condição e tempo [ $F_{(4,440)} = 3,57, p < 0,01$ ]. A análise *a posteriori* revelou um aumento significativo do peso dos animais ao longo das semanas tanto para a condição NECM quanto para ECM. Para os animais NECM a variação de peso ao longo do tempo foi a seguinte: basal < semana 1 < semana 2 < semana 3 < semana 4 ( $p$ 's < 0,05). Para os animais ECM a variação ocorreu da seguinte forma: (basal = semana 1) < semana 2 < semana 3 < semana 4 ( $p$ 's < 0,0001). A análise estatística não revelou diferença entre as condições.

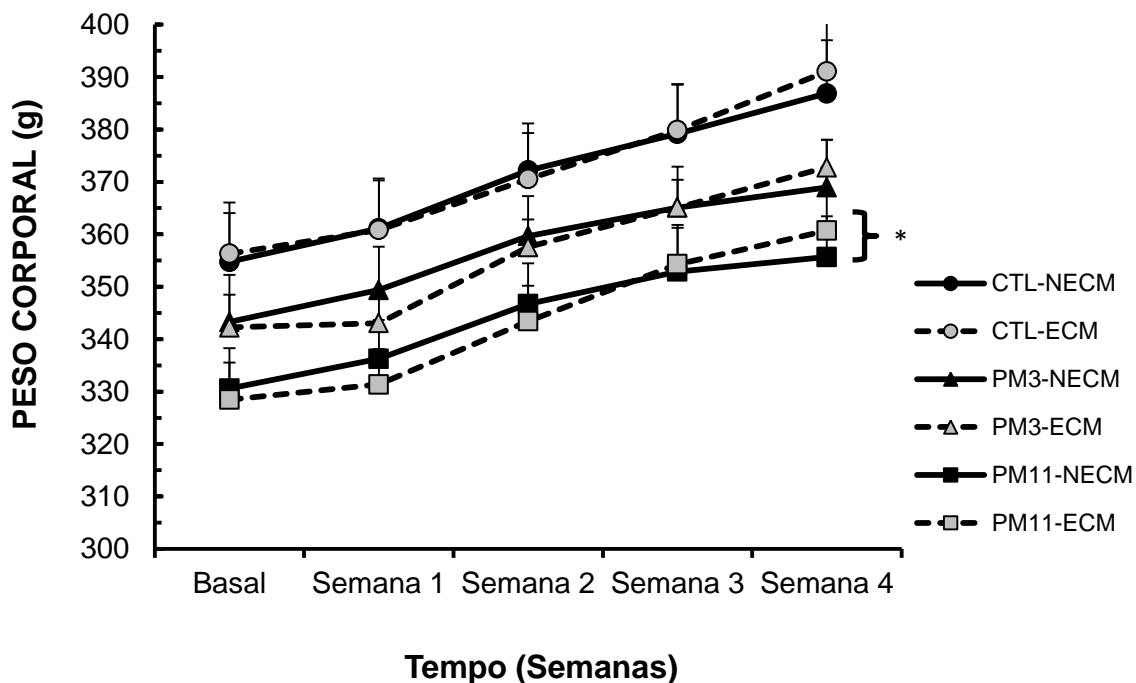


Figura 3. Peso corporal (g) dos grupos CTL-NECM (n=16), CTL-ECM (n=19), PM3-NECM (n=18), PM3-ECM (n=21), PM11-NECM (n=19) e PM11-ECM (n=21) ao longo de quatro semanas. Dados apresentados em média  $\pm$  e.p. \* - Diferença em relação ao respectivo grupo CTL.

## 5.2 Índice de preferência por sacarose (IPS)

A ANOVA detectou efeito principal da condição [ $F_{(1,110)} = 885,007$   $p < 0,0001$ ]. A análise *a posteriori* revelou que os animais ECM apresentaram preferência por sacarose significativamente menor do que os animais NECM ( $p < 0,0001$ ) (Figura 4).

A ANOVA detectou ainda interação entre a condição e o tempo [ $F_{(4,440)} = 232,047$ ,  $p < 0,0001$ ]. A análise *a posteriori* revelou que, para ambas as condições, o IPS foi equivalente no basal, diferenciando-se para nas demais semanas, de modo que os animais ECM consumiram menos sacarose. Para os animais NECM: IPS basal < (IPS semana 1 = IPS semana 2) < (IPS semana 3 = IPS semana 4) ( $p$ 's < 0,05). Para os animais ECM: IPS basal < IPS semana 1 < IPS semana 2 < (IPS semana 3 = IPS semana 4) ( $p$ 's < 0,05).

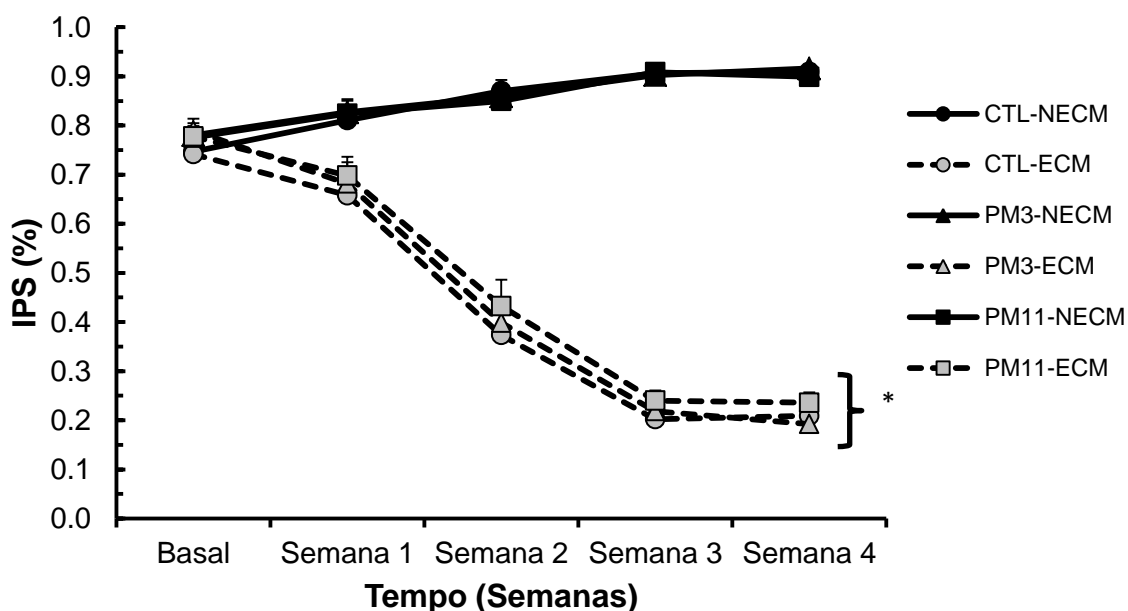


Figura 4. Índice de preferência por sacarose (IPS) dos grupos CTL-NECM (n=16), CTL-ECM (n=19), PM3-NECM (n=18), PM3-ECM (n=21), PM11-NECM (n=19) e PM11-ECM (n=21) ao longo de quatro semanas. Dados apresentados em média  $\pm$  e.p. \* - Diferença em relação aos respectivos grupos NECM.

### 5.3 Labirinto em cruz elevado (LCE)

Os comportamentos analisados no LCE estão resumidos na tabela 1.

Tabela 1. Comportamento analisados no labirinto em cruz elevado de animais CTL-NECM (n=11), CTL-ECM (n=13), PM3-NECM (n=13), PM3-ECM (n=13), PM11-NECM (n=13) e PM11-ECM (n=13). Dados apresentados em média  $\pm$  d.p.

	CTL-NECM	CTL-ECM	PM3-NECM	PM3-ECM	PM11-NECM	PM11-ECM
% Entrada BF	71,41 $\pm$ 7,71	61,24 $\pm$ 9,31	64,67 $\pm$ 10,71	64,53 $\pm$ 8,50	62,52 $\pm$ 12,00	63,81 $\pm$ 11,09
% Entrada BA	28,59 $\pm$ 7,71	38,76 $\pm$ 9,31	35,33 $\pm$ 10,71	35,47 $\pm$ 8,50	37,48 $\pm$ 12,00	36,19 $\pm$ 11,09
% Tempo BF	74,44 $\pm$ 8,84	63,67 $\pm$ 13,85	66,58 $\pm$ 14,10	65,61 $\pm$ 8,96	61,09 $\pm$ 10,57	64,91 $\pm$ 13,53
% Tempo BA	11,88 $\pm$ 4,20	19,54 $\pm$ 10,32	17,18 $\pm$ 9,00	19,72 $\pm$ 6,22	22,05 $\pm$ 12,18	18,57 $\pm$ 9,17
% Tempo Centro	13,67 $\pm$ 6,16	16,79 $\pm$ 4,28	16,24 $\pm$ 8,04	14,68 $\pm$ 5,15	16,86 $\pm$ 5,52	16,52 $\pm$ 5,71
Dipping BF	1,36 $\pm$ 0,81	1,08 $\pm$ 0,95	0,54 $\pm$ 0,78	1,15 $\pm$ 1,41	1,15 $\pm$ 1,14	1,15 $\pm$ 0,99
Dipping BA	2,82 $\pm$ 1,94	4,08 $\pm$ 3,17	3,92 $\pm$ 2,87	3,85 $\pm$ 2,19	5,69 $\pm$ 4,66	4,62 $\pm$ 3,38
Dipping Total	6,45 $\pm$ 3,50	7,23 $\pm$ 3,65	6,54 $\pm$ 3,95	6,69 $\pm$ 2,98	9,15 $\pm$ 4,98	8,31 $\pm$ 5,74
Grooming BF	2,09 $\pm$ 1,51	2,38 $\pm$ 2,06	2,38 $\pm$ 1,94	2,46 $\pm$ 1,61	2,46 $\pm$ 1,05	2,54 $\pm$ 1,51
Grooming Total	2,18 $\pm$ 1,60	2,38 $\pm$ 2,06	2,38 $\pm$ 1,94	2,46 $\pm$ 1,61	2,54 $\pm$ 0,97	2,85 $\pm$ 1,34
Rearing BF	13,36 $\pm$ 7,07	13,31 $\pm$ 5,25	12,85 $\pm$ 5,97	14,92 $\pm$ 3,30	12,92 $\pm$ 3,59	15,77 $\pm$ 4,53
Rearing BA	0,09 $\pm$ 0,30	0,92 $\pm$ 0,95	0,77 $\pm$ 1,54	0,46 $\pm$ 0,78	0,23 $\pm$ 0,60	0,46 $\pm$ 0,88
Rearing Centro	1,27 $\pm$ 2,00	1,85 $\pm$ 1,91	1,08 $\pm$ 1,19	1,00 $\pm$ 1,29	1,23 $\pm$ 1,09	2,15 $\pm$ 2,44
Rearing Total	14,73 $\pm$ 8,78	16,08 $\pm$ 6,06	14,69 $\pm$ 5,94	16,38 $\pm$ 4,37	14,38 $\pm$ 3,99	18,38 $\pm$ 6,01
Scanning BF	6,73 $\pm$ 2,49	3,77 $\pm$ 1,96	4,46 $\pm$ 2,76	4,08 $\pm$ 2,87	3,08 $\pm$ 1,85	4,54 $\pm$ 1,66
Scanning BA	2,73 $\pm$ 1,42	4,54 $\pm$ 2,96	3,92 $\pm$ 3,86	3,77 $\pm$ 2,24	3,92 $\pm$ 3,07	3,62 $\pm$ 2,69
Scanning Centro	1,64 $\pm$ 1,63	2,69 $\pm$ 2,18	3,00 $\pm$ 3,14	2,62 $\pm$ 1,80	3,62 $\pm$ 2,14	3,08 $\pm$ 2,22
Scanning Total	11,09 $\pm$ 2,43	11,00 $\pm$ 4,42	11,38 $\pm$ 6,51	10,46 $\pm$ 3,41	10,62 $\pm$ 3,52	11,23 $\pm$ 4,21
Stretching BF	3,55 $\pm$ 1,69	2,23 $\pm$ 1,92	2,77 $\pm$ 1,24	3,46 $\pm$ 2,63	3,00 $\pm$ 2,24	2,46 $\pm$ 1,56
Stretching BA	0,18 $\pm$ 0,40	0,00 $\pm$ 0,00	0,00 $\pm$ 0,00	0,08 $\pm$ 0,28	0,00 $\pm$ 0,00	0,00 $\pm$ 0,00
Stretching Centro	0,09 $\pm$ 0,30	0,31 $\pm$ 0,48	0,69 $\pm$ 1,03	0,46 $\pm$ 0,66	0,46 $\pm$ 0,66	0,69 $\pm$ 0,75
Stretching Total	3,82 $\pm$ 1,89	2,54 $\pm$ 2,03	3,46 $\pm$ 1,33	4,00 $\pm$ 3,03	3,46 $\pm$ 2,60	3,15 $\pm$ 2,15

A análise global da porcentagem de tempo de permanência dos animais no braço aberto não revelou diferenças significativas. Considerando-se as condições separadamente, para os animais NECM, a ANOVA detectou efeito principal do grupo [ $F_{(2,34)} = 3,5805$ ,  $p < 0,05$ ]. A análise *a posteriori* revelou que os animais PM11 permaneceram significativamente mais tempo no braço aberto, quando comparados aos animais CTL ( $p < 0,05$ ). Para a condição ECM, a ANOVA não detectou diferenças significativas entre os grupos (Figura 5).

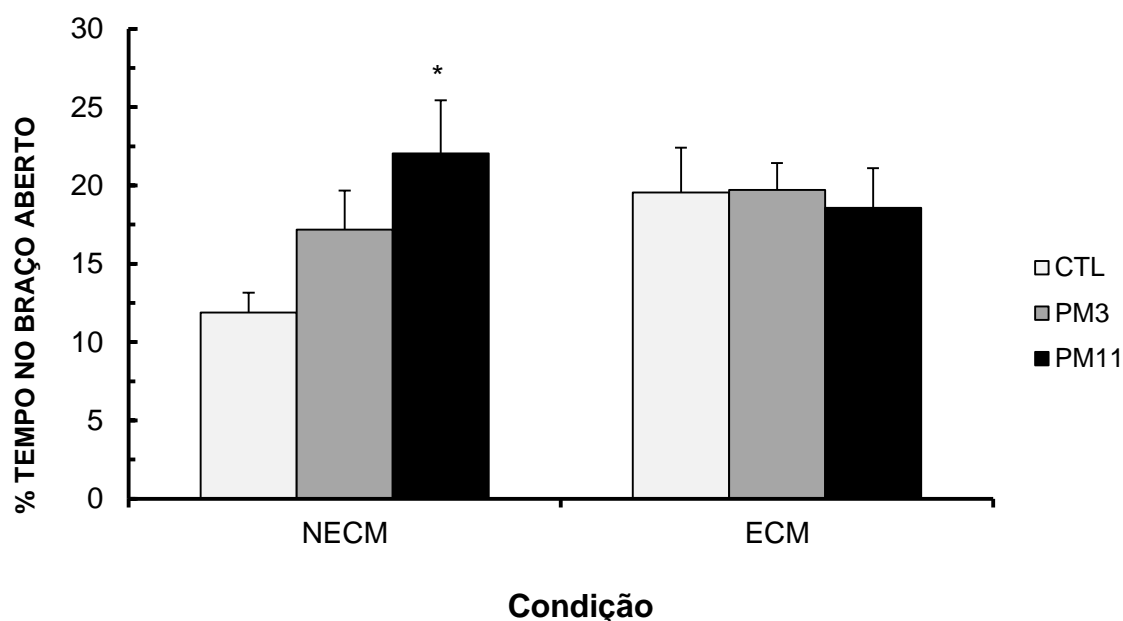


Figura 5. Porcentagem de tempo de permanência no braço aberto de animais CTL-NECM (n=11), CTL-ECM (n=13), PM3-NECM (n=13), PM3-ECM (n=13), PM11-NECM (n=13) e PM11-ECM (n=13). Dados apresentados em média  $\pm$  e.p. da %TBA. \* - Diferença em relação ao respectivo grupo CTL.

A ANOVA detectou interação entre o grupo e a condição para o comportamento de avaliação de risco (*risk assessment*) no braço fechado [ $F_{(2,70)} = 4,5895$ ,  $p < 0,05$ ]. A análise *a posteriori* evidenciou que os animais CTL-ECM, PM3-NECM e PM11-NECM realizaram menos avaliação de risco do que os animais CTL-NECM ( $p = 0,05$ ) (Figura 6).



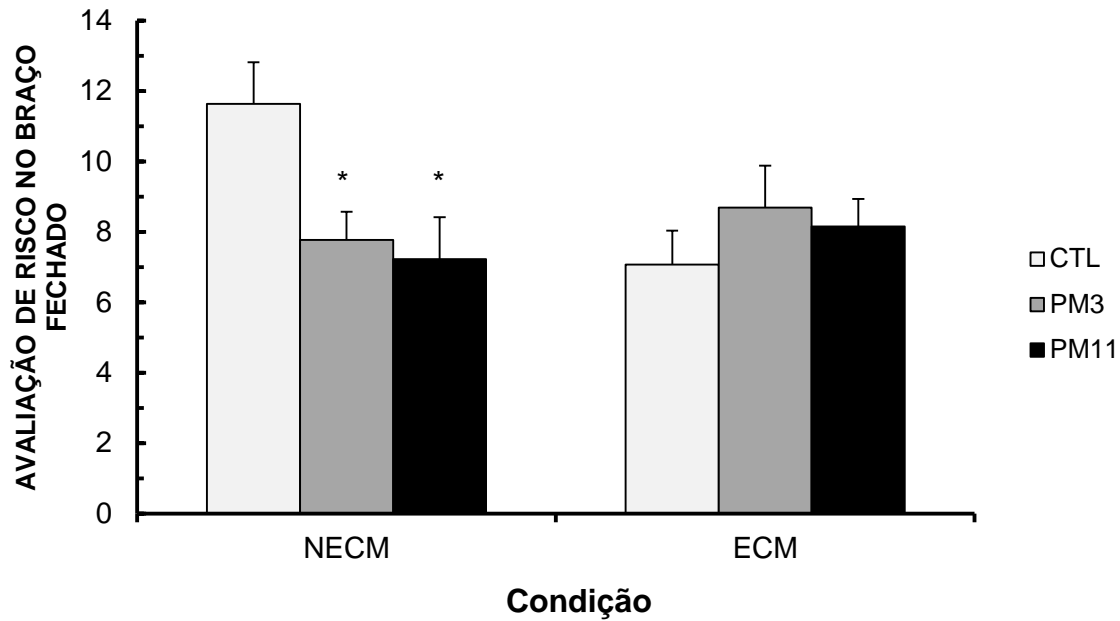


Figura 6. Número de eventos de avaliação de risco no braço fechado de animais CTL-NECM (n=11), CTL-ECM (n=13), PM3-NECM (n=13), PM3-ECM (n=13), PM11-NECM (n=13) e PM11-ECM (n=13). Dados apresentados em média  $\pm$  e.p. \* - Diferença em relação ao respectivo grupo CTL.

#### 5.4 Corticosterona plasmática

A análise estatística das concentrações plasmáticas de CORT ao longo do tempo revelou efeito principal da condição [ $F_{(1,142)} = 4,2621, p < 0,05$ ], do tempo [ $F_{(2,142)} = 65,8740, p < 0,0001$ ] e interação entre grupo e tempo [ $F_{(4,142)} = 3,1167, p < 0,05$ ]. A análise *a posteriori* do fator condição evidenciou que os animais ECM apresentaram concentrações de CORT mais elevadas do que os animais NECM ( $p < 0,05$ ). A análise *a posteriori* da interação evidenciou que para o grupo CTL [Basal] < ([30 minutos] = [60 minutos]); para o grupo PM3 [Basal] < ([30 minutos] = [60 minutos]) e para o grupo PM11 [Basal] < [30 minutos] < [60 minutos] ( $p < 0,05$ ) (Figura 7).

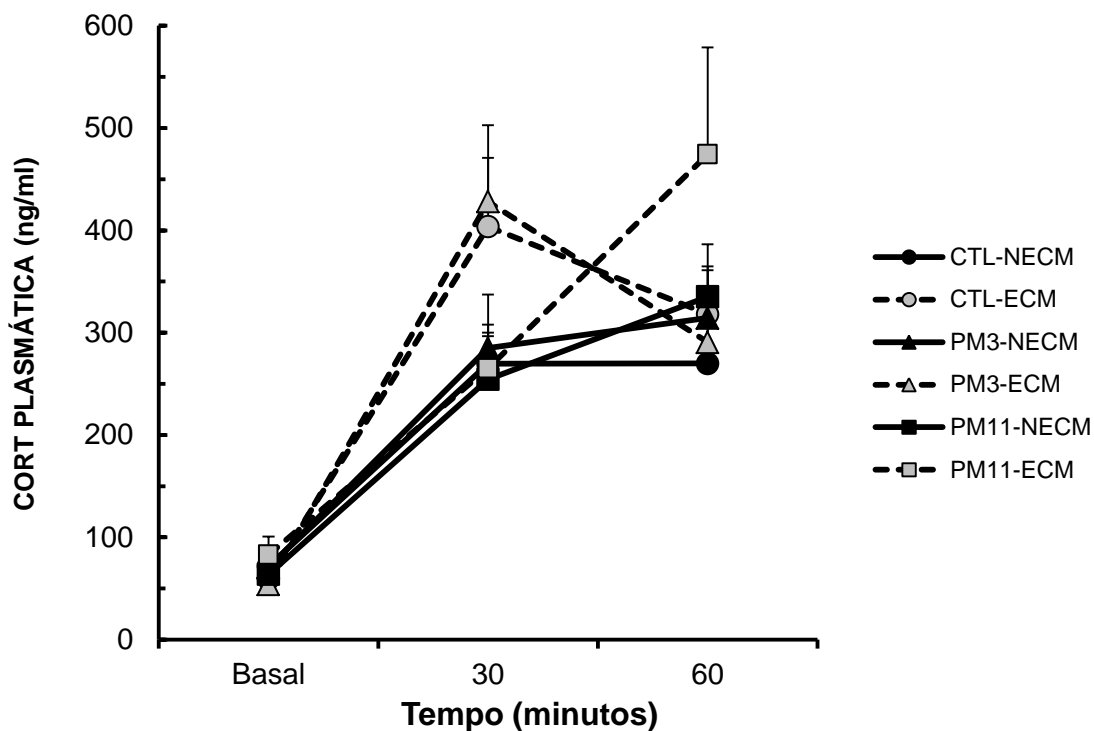


Figura 7. Concentração plasmática de corticosterona (ng/ml) dos grupos CTL-NECM (n=12), PM3-NECM (n=13) e PM11-NECM (n=13) e CTL-ECM (n=13), PM3-ECM (n=13) e PM11-ECM (n=13) ao longo de sessenta minutos. Dados apresentados em média  $\pm$  e.p. As diferenças encontradas estão descritas no texto.

## 5.5 Monoaminas cerebrais

A Tabela 2 mostra os resultados das concentrações de monoaminas e seus metabólitos nas diferentes regiões cerebrais.

Tabela 2. Concentração das monoaminas (ng/mg de proteína), nas diferentes regiões cerebrais, de animais CTL-NECM (n=11), CTL-ECM (n=12), PM3-NECM (n=13), PM3-ECM (n=11), PM11-NECM (n=10) e PM11-ECM (n=13). Os valores são apresentados como média ± d.p.

		CTL-NECM	CTL-ECM	PM3-NECM	PM3-ECM	PM11-NECM	PM11-ECM
RF	NA	1,85 ± 0,65	1,57 ± 0,50	1,94 ± 1,21	1,83 ± 1,17	1,83 ± 0,46	1,92 ± 0,73
	DA	0,79 ± 0,39	0,73 ± 0,38	0,46 ± 0,55	0,71 ± 0,65	0,69 ± 0,41	0,78 ± 0,52
	DOPAC	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00
	5-HT	6,91 ± 1,88	5,90 ± 1,63	5,73 ± 2,40	6,67 ± 1,91	5,94 ± 2,29	6,14 ± 2,50
	5-HIAA	1,91 ± 0,62	1,75 ± 0,41	1,96 ± 0,82	1,96 ± 0,80	1,76 ± 0,47	1,74 ± 0,64
HPT	NA	20,75 ± 4,90	20,47 ± 7,09	18,35 ± 5,39	21,03 ± 5,50	16,77 ± 2,42	18,14 ± 4,11
	DA	3,20 ± 1,32	2,67 ± 1,29	3,14 ± 2,59	2,92 ± 1,49	2,98 ± 2,21	2,54 ± 0,87
	DOPAC	0,00 ± 0,00	0,02 ± 0,07	0,12 ± 0,30	0,02 ± 0,08	0,04 ± 0,14	0,09 ± 0,24
	5-HT	8,00 ± 1,20	6,85 ± 2,05	5,71 ± 1,95	6,84 ± 2,93	7,11 ± 1,96	6,72 ± 2,07
	5-HIAA	2,44 ± 0,70	2,31 ± 0,76	2,01 ± 0,80	2,30 ± 0,83	2,51 ± 0,53	2,61 ± 1,12
AMG	NA	2,99 ± 0,75	3,14 ± 1,21	2,34 ± 0,95	2,90 ± 1,11	2,31 ± 0,82	2,92 ± 0,82
	DA	14,97 ± 8,82	14,60 ± 9,68	14,99 ± 4,79	17,70 ± 12,52	12,08 ± 6,89	11,96 ± 5,80
	DOPAC	0,96 ± 0,57	0,88 ± 0,65	0,88 ± 0,29	1,11 ± 0,67	0,73 ± 0,48	0,85 ± 0,58
	5-HT	7,48 ± 2,02	6,82 ± 2,02	5,24 ± 2,28	6,58 ± 2,03	5,55 ± 1,44	5,29 ± 1,57
	5-HIAA	2,69 ± 0,67	2,67 ± 1,00	2,06 ± 0,65	2,69 ± 0,60	2,18 ± 0,45	2,32 ± 0,58
	HVA	0,31 ± 0,57	0,59 ± 0,88	0,15 ± 0,26	0,29 ± 0,52	0,09 ± 0,28	0,14 ± 0,36
HPCd	NA	1,63 ± 0,38	2,01 ± 1,15	1,86 ± 0,75	1,76 ± 0,79	1,54 ± 0,41	2,21 ± 1,56
	DA	3,16 ± 3,00	2,93 ± 5,04	1,30 ± 1,04	0,95 ± 1,42	2,65 ± 2,35	1,52 ± 1,49
	DOPAC	0,07 ± 0,17	0,08 ± 0,29	0,00 ± 0,00	0,02 ± 0,07	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00
	5-HT	2,74 ± 0,72	2,59 ± 1,30	2,56 ± 0,98	2,09 ± 0,61	2,36 ± 0,65	3,02 ± 2,64
	5-HIAA	1,66 ± 0,53	1,76 ± 0,71	1,64 ± 0,43	1,76 ± 0,45	1,47 ± 0,41	1,83 ± 1,02
HPCv	NA	3,80 ± 1,12	3,54 ± 0,83	2,99 ± 0,99	3,42 ± 0,97	3,18 ± 0,92	3,31 ± 1,23
	DA	0,95 ± 0,66	0,38 ± 0,54	1,03 ± 0,83	0,67 ± 1,16	1,10 ± 1,45	0,87 ± 1,32
	DOPAC	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,02 ± 0,08
	5-HT	6,95 ± 1,57	5,40 ± 1,36	5,86 ± 2,33	6,64 ± 3,01	5,55 ± 2,39	5,22 ± 1,67
	5-HIAA	3,39 ± 1,13	2,86 ± 0,80	2,63 ± 0,49	3,34 ± 0,91	2,93 ± 0,92	2,89 ± 0,76

No que tange as monoaminas cerebrais, as diferenças significativas bem como as tendências encontradas ficaram restritas à AMG. Para a NA, a ANOVA detectou tendência de efeito da condição [ $F_{(1,64)} = 3,6807$ ;  $p = 0,06$ ], sendo que os animais

ECM apresentaram maiores concentrações de NE na AMG do que os animais NECM ( $p = 0,05$ ) (Figura 8).

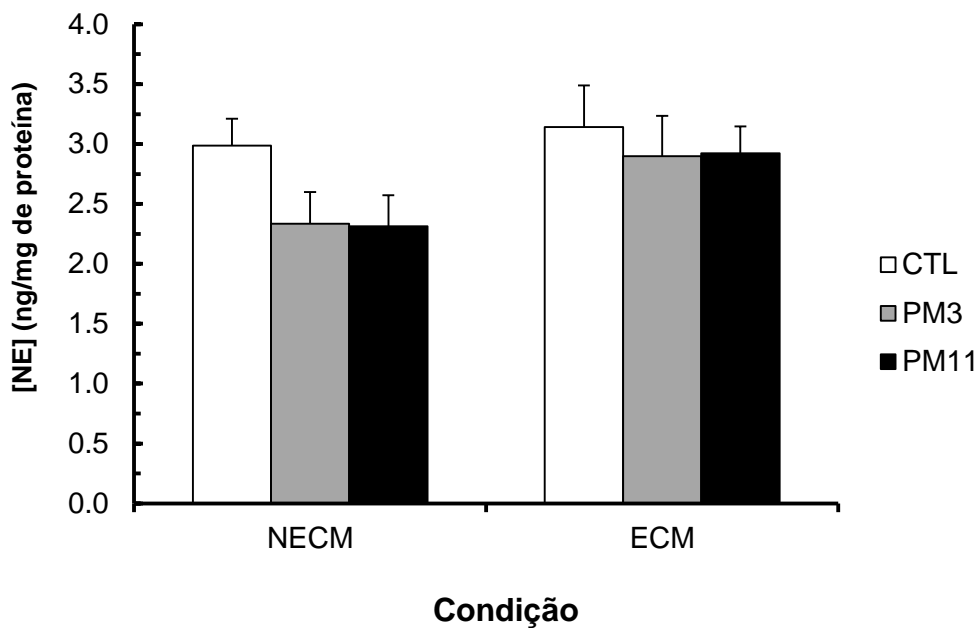


Figura 8. Concentração de noradrenalina (ng/mg de proteína) na amígdala de animais CTL-NECM ( $n=11$ ), CTL-ECM ( $n=12$ ), PM3-NECM ( $n=13$ ), PM3-ECM ( $n=11$ ), PM11-NECM ( $n=10$ ) e PM11-ECM ( $n=13$ ). Dados apresentados em média  $\pm$  e.p. da concentração.

A ANOVA detectou efeito principal do grupo para as concentrações de 5-HT na AMG [ $F_{(2, 64)} = 4,922$ ;  $p < 0,05$ ]. A análise *a posteriori* revelou que os grupos PM3 e PM11 apresentaram menores concentrações do neurotransmissor na AMG do que o grupo CTL ( $p < 0,05$ ) (Figura 9). Considerando-se as condições separadamente, a ANOVA detectou diferenças significativas entre os grupos na condição NECM [ $F_{(2, 31)} = 4,27$ ;  $p < 0,05$ ], sendo que os grupos PM3 e PM11 apresentaram menores concentrações desse neurotransmissor do que o grupo CTL. Entretanto, nenhuma diferença foi detectada para a condição ECM.

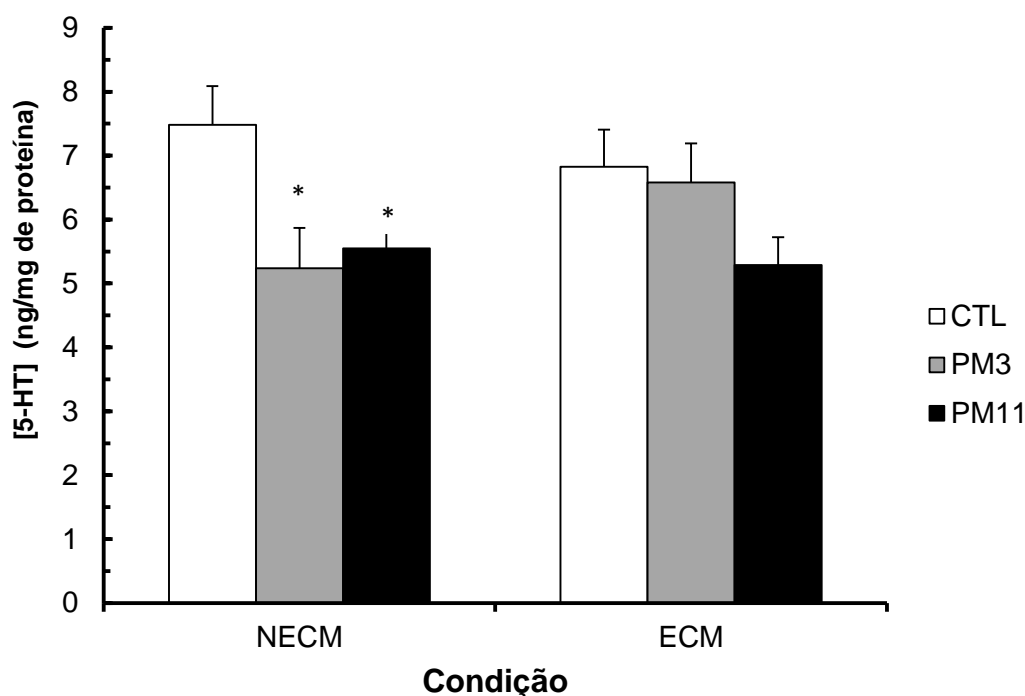


Figura 9. Concentração de serotonina (ng/mg de proteína) na amígdala de animais CTL-NECM (n=11), CTL-ECM (n=12), PM3-NECM (n=13), PM3-ECM (n=11), PM11-NECM (n=10) e PM11-ECM (n=13). Dados apresentados em média  $\pm$  e.p. da concentração. \* -Diferença em relação ao respectivo grupo CTL.

A análise global das concentrações de 5-HIAA na AMG não revelou diferenças significativas. Considerando-se as condições separadamente, para os animais NECM, a ANOVA detectou efeito principal do grupo [ $F_{(2,31)} = 3,3751, p < 0,05$ ]. A análise *a posteriori* revelou uma tendência dos animais PM3 e PM11 apresentarem menores concentrações do metabólito na AMG, quando comparados aos animais CTL ( $p = 0,06$ ). Para os animais ECM, a ANOVA não detectou diferenças significativas entre os grupos (Figura 10).

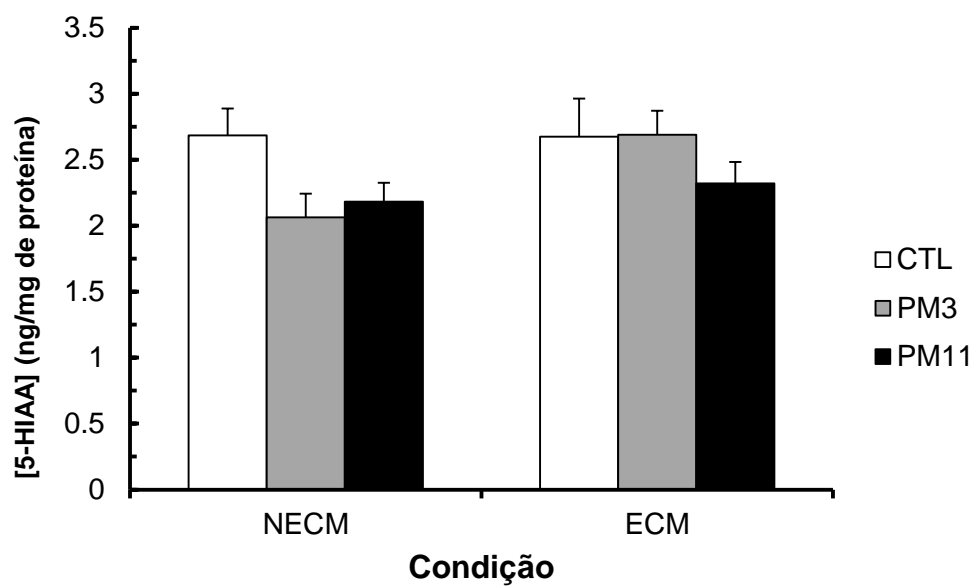


Figura 10. Concentração de ácido 5-hidroxi-indolacético (ng/mg de proteína) na amígdala de animais CTL-NECM (n=11), CTL-ECM (n=12), PM3-NECM (n=13), PM3-ECM (n=11), PM11-NECM (n=10) e PM11-ECM (n=13). Dados apresentados em média  $\pm$  e.p. da concentração.

## 6 DISCUSSÃO

Os principais achados do presente estudo mostraram que: 1) a PM no 11o dia de vida produziu menor ganho de peso ao longo do período avaliado em comparação com o grupo controle; 2) embora o ECM tenha resultado em comportamento anedônico, a privação materna não modificou esse efeito; 3) os grupos submetidos à privação materna, tanto no 3o quanto no 11o dias de vida apresentaram redução de comportamento ansioso quando alojados individualmente na idade adulta; 4) o ECM induziu um aumento da resposta de CORT ao LCE; 5) os animais dos grupos PM3 e PM11, alojados individualmente, também apresentaram redução das concentrações de 5-HT na AMG.

O eixo HPA desempenha um papel central tanto na regulação da resposta ao estresse quanto no controle do comportamento alimentar e metabolismo energético (Tempel and Leibowitz, 1994, Heinrichs and Richard, 1999). Algumas evidências demonstram que os receptores glicocorticoides no NPV do HPT, responsáveis, em parte, pelo término da resposta de estresse, também participariam na determinação da ingestão de alimentos e escolha dos macronutrientes, de modo que alteração nesse sistema pode modificar o comportamento alimentar (Tempel and Leibowitz, 1994, De Kloet et al., 1998). Segundo Penke e colaboradores, a privação materna seria responsável por uma redução no padrão de ingestão de alimentos pelos animais, bem como pela mudança da preferência alimentar, com a redução da ingestão de carboidratos por animais privados da mãe no quinto dia pós-natal (Penke et al., 2001). Viveros e colaboradores, por sua vez, verificaram redução do peso corporal, durante a puberdade, em animais privados da mãe no 9º dia pós-natal, ou seja, durante o período de hiporresponsividade ao estresse (Viveros et al., 2010), padrão esse também encontrado por nosso grupo em estudo com animais privados no 11º dia pós-natal (Suchecki and Tufik, 1997). Outros estudos atribuem essas alterações no comportamento alimentar e no peso corporal em resposta ao estresse neonatal à peptídeos: colecistoquinina e bombesina símile (McIntosh et al., 1999), neuropeptídeo Y e peptídeo relacionado ao gene da calcitonina (Husum et al., 2002). Independentemente das razões ou do mecanismo, as evidências demonstram que existe alguma relação entre o estresse neonatal e desordens

alimentares (Suchecki and Tufik, 1997, McIntosh et al., 1999, Penke et al., 2001, Husum et al., 2002, Viveros et al., 2010).

A anedonia induzida pelo modelo do ECM é um comportamento constante entre os estudos publicados em nosso laboratório, fazendo deste um paradigma confiável e replicável (Stein et al., 2009b, Hamani et al., 2012b). Essa replicabilidade nos permite afirmar que a PM não acelera nem influencia o comportamento anedônico verificado no presente estudo.

A análise do comportamento do tipo-ansioso demonstrou, *a priori*, uma contradição em relação aos resultados publicados anteriormente por nosso grupo. Segundo Barbosa Neto e colaboradores a privação materna seria responsável pelo aumento do comportamento tipo-ansioso nos animais, efeito esse evidenciado pelo aumento do tempo de permanência no quadrante central do LCE e pelo aumento do comportamento de avaliação de risco (Barbosa Neto et al., 2012). Em nossos resultados verificamos, contudo, um aumento do tempo de permanência nos braços abertos do LCE, o que é interpretado como redução do comportamento do tipo-ansioso. Essa aparente contradição, no entanto, pode ser explicada por uma diferença metodológica crucial entre o presente estudo e o de Barbosa Neto e colaboradores: neste estudo os animais NECM foram alojados individualmente por seis semanas (duas semanas de habituação e quatro semanas para avaliação da preferência por sacarose). O alojamento individual é considerado um estressor moderado (Giralt and Armario, 1989, Mormède et al., 1990, Bartolomucci et al., 2003) e, de acordo com a hipótese *match/mismatch* poderia ter favorecido os animais submetidos ao estresse neonatal, que estariam, dessa forma, mais aptos a enfrentar situações de estresse na idade adulta (caso do LCE, que representa estresse de novidade). Segundo a hipótese *match/mismatch*, respostas comportamentais, neuroendócrinas e neuroquímicas adaptativas resultariam de uma consonância entre as experiências neonatais e na idade adulta, como, por exemplo, estresse na infância e estresse na idade adulta, ou pouco estresse na infância e pouco estresse na idade adulta (Nederhof and Schmidt, 2012). No entanto, essa possibilidade é ainda especulativa e carece de confirmação experimental, pela comparação de animais alojados em grupo ou individualmente. Alternativamente, o resultado em questão poderia ser explicado como aumento de comportamento impulsivo; entretanto, os resultados neuroquímicos reforçam a primeira alternativa,



pois numerosos estudos demonstram que a redução de 5-HT na AMG é um substrato neuronal para o efeito ansiolítico de vários compostos utilizados para essa finalidade (Carli et al., 1989, Dringenberg et al., 1998). Reforçando os resultados comportamentais encontrados, a análise das monoaminas nos permite inferir que a redução de 5-HT na AMG seria o substrato neuronal do comportamento ansiolítico observado. Segundo a teoria dualista proposta por Deakin & Graeff (Graeff, 1993, Graeff et al., 1996) a liberação de 5-HT na AMG pelos terminais originados no núcleo dorsal da rafe aumenta a ansiedade, enquanto que sua liberação na substância cinzenta periaquedutal inibe o medo condicionado. Evidências adicionais sobre a relação das concentrações de 5-HT na AMG e o comportamento ansioso incluem estudos em que a infusão intra-núcleo dorsal da rafe de 8-OH-DPAT, um agonista do receptor 5-HT<sub>1A</sub>, reduz a evitação do braço aberto no labirinto em T (efeito ansiolítico), semelhante ao que é observado com a administração de diazepam (Graeff et al., 1996) e aumenta a porcentagem de tempo despendido nos braços abertos do LCE (File and Gonzalez, 1996). Os receptores 5-HT<sub>1A</sub> localizados no núcleo dorsal da rafe e no núcleo mediano da rafe são auto-receptores que, quando ativados, produzem redução das concentrações de 5-HT na AMG ou no HPT (Graeff, 1993), respectivamente. Evidências adicionais a respeito da função mediadora de 5-HT no controle da ansiedade vêm de estudos em que a lesão eletrolítica do núcleo mediano da rafe produz efeito ansiolítico (Andrade et al., 2004); estudos de infusão aguda de fluoxetina na AMG, que, produzindo aumento das concentrações de 5-HT pela inibição da recaptação do neurotransmissor, aumenta comportamento tipo-ansioso (Ravinder et al., 2011) e estudo que relata que ratos mais ansiosos no LCE apresentam aumento das concentrações de 5-HT na AMG direita (Andersen and Teicher, 1999).

No que tange os resultados hormonais existem duas formas possíveis de interpretação: os animais PM11 exibem deficiência na regulação da atividade do eixo HPA, pois aos 60 min os valores de CORT ainda são maiores do que nos outros tempos, ao passo que em animais CTL esses valores parecem iniciar o retorno ao basal. No entanto, o teste de supressão à dexametasona, realizado em ratos machos PM3 e PM11 mostra que a PM não altera a capacidade do glicocorticoide sintético em inibir o eixo HPA (Faturi et al., 2010a), o que refuta essa hipótese. A segunda possibilidade é que os animais PM11 sejam mais reativos à

coleta de sangue pela cauda, que pode representar um estressor adicional. Esta explicação parece ser mais aceitável, em vista do perfil de secreção obtido em animais que foram eutanasiados em cada tempo avaliado e que apresentaram retorno às concentrações basais 60 min após o estressor (Faturi et al., 2010).

## 7 CONCLUSÕES

Em conclusão, os resultados do presente estudo evidenciaram que o isolamento social favoreceu os animais submetidos à privação materna no 3º ou 11º dias de vida, de modo a reduzir o comportamento tipo-ansioso desses animais. A base neuroquímica para este comportamento consistiu em redução das concentrações de 5-HT na amígdala. Esses resultados podem ser explicados pela hipótese *match/mismatch*, que afirma que indivíduos submetidos ao estresse na infância podem apresentar comportamentos adaptativos em situações estressoras na idade adulta.

## 8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Adell A, Garcia-Marquez C, Armario A, Gelpi E (1988) Chronic stress increases serotonin and noradrenaline in rat brain and sensitizes their responses to a further acute stress. *J Neurochem* 50:1678-1681.
- Akabayashi A, Watanabe Y, Wahlestedt C, McEwen BS, Paez X, Leibowitz SF (1994) Hypothalamic neuropeptide Y, its gene expression and receptor activity: relation to circulating corticosterone in adrenalectomized rats. *Brain Res* 665:201-212.
- Andersen K, Steinhorsdottir SD, Haraldsdottir S, Gudnason T (2009) Clinical evaluation and stress test have limited value in the diagnosis of in-stent restenosis. *Scand Cardiovasc J* 43:402-407.
- Andersen SL, Teicher MH (1999) Serotonin laterality in amygdala predicts performance in the elevated plus maze in rats. *Neuroreport* 10:3497-3500.
- Andersen SL, Teicher MH (2008) Stress, sensitive periods and maturational events in adolescent depression. *Trends in neurosciences* 31:183-191.
- Andrade TG, Macedo CE, Zangrossi H, Graeff FG (2004) Anxiolytic-like effects of median raphe nucleus lesion in the elevated T-maze. *Behav Brain Res* 153:55-60.
- Barbosa Neto JB, Tiba PA, Faturi CB, de Castro-Neto EF, da Graca Naffah-Mazacoratti M, de Jesus Mari J, de Mello MF, Suchecki D (2012) Stress during development alters anxiety-like behavior and hippocampal neurotransmission in male and female rats. *Neuropharmacology* 62:518-526.
- Bartolomucci A, Palanza P, Sacerdote P, Ceresini G, Chirieleison A, Panerai AE, Parmigiani S (2003) Individual housing induces altered immuno-endocrine responses to psychological stress in male mice. *Psychoneuroendocrinology* 28:540-558.
- Boehm A, Steiner S, Zaehring F, Casanova A, Hamburger F, Ritz D, Keck W, Ackermann M, Schirmer T, Jenal U (2009) Second messenger signalling governs *Escherichia coli* biofilm induction upon ribosomal stress. *Mol Microbiol* 72:1500-1516.
- Borsini F, Meli A (1988) Is the forced swimming test a suitable model for revealing antidepressant activity? *Psychopharmacology (Berl)* 94:147-160.
- Brambrink AM, Brachlow J, Weiler N, Eberle B, Elich D, Joost T, Koller M, Huth R, Heinrichs W (1999) Successful treatment of a patient with ARDS after pneumonectomy using high-frequency oscillatory ventilation. *Intensive Care Med* 25:1173-1176.
- Carli M, Prontera C, Samanin R (1989) Evidence that central 5-hydroxytryptaminergic neurones are involved in the anxiolytic activity of buspirone. *Br J Pharmacol* 96:829-836.
- Caspi A, Sugden K, Moffitt TE, Taylor A, Craig IW, Harrington H, McClay J, Mill J, Martin J, Braithwaite A, Poulton R (2003) Influence of life stress on depression: moderation by a polymorphism in the 5-HTT gene. *Science* 301:386-389.
- Castagne V, Moser P, Roux S, Porsolt RD (2011) Rodent models of depression: forced swim and tail suspension behavioral despair tests in rats and mice. *Curr Protoc Neurosci Chapter 8:Unit 8 10A*.
- Checkley S (1996) The neuroendocrinology of depression and chronic stress. *Br Med Bull* 52:597-617.

- Choy KH, de Visser YP, van den Buuse M (2009) The effect of 'two hit' neonatal and young-adult stress on dopaminergic modulation of prepulse inhibition and dopamine receptor density. *Br J Pharmacol* 156:388-396.
- Cirulli F, Santucci D, Laviola G, Alleva E, Levine S (1994) Behavioral and hormonal responses to stress in the newborn mouse: effects of maternal deprivation and chlordiazepoxide. *Dev Psychobiol* 27:301-316.
- Contarino A, Heinrichs SC, Gold LH (1999) Understanding corticotropin releasing factor neurobiology: contributions from mutant mice. *Neuropeptides* 33:1-12.
- Cruz FC, Quadros IM, Planeta Cda S, Miczek KA (2008) Maternal separation stress in male mice: long-term increases in alcohol intake. *Psychopharmacology* 201:459-468.
- Cryan JF, Mombereau C, Vassout A (2005) The tail suspension test as a model for assessing antidepressant activity: review of pharmacological and genetic studies in mice. *Neurosci Biobehav Rev* 29:571-625.
- Daniels WM, Pietersen CY, Carstens ME, Stein DJ (2004) Maternal separation in rats leads to anxiety-like behavior and a blunted ACTH response and altered neurotransmitter levels in response to a subsequent stressor. *Metab Brain Dis* 19:3-14.
- De Kloet ER, Vreugdenhil E, Oitzl MS, Joels M (1998) Brain corticosteroid receptor balance in health and disease. *Endocr Rev* 19:269-301.
- Dent G, Choi DC, Herman JP, Levine S (2007) GABAergic circuits and the stress hyporesponsive period in the rat: ontogeny of glutamic acid decarboxylase (GAD) 67 mRNA expression in limbic-hypothalamic stress pathways. *Brain Res* 1138:1-9.
- Dringenberg HC, Kornelsen RA, Pacelli R, Petersen K, Vanderwolf CH (1998) Effects of amygdaloid lesions, hippocampal lesions, and buspirone on black-white exploration and food carrying in rats. *Behav Brain Res* 96:161-172.
- Eberle B, Weiler N, Vogel N, Kauczor HU, Heinrichs W (1999) Computed tomography-based tracheobronchial image reconstruction allows selection of the individually appropriate double-lumen tube size. *J Cardiothorac Vasc Anesth* 13:532-537.
- Ehlert U, Wagner D, Heinrichs M, Heim C (1999) [Psychobiological aspects of posttraumatic stress disorder]. *Nervenarzt* 70:773-779.
- Ellenbroek BA, Derks N, Park HJ (2005) Early maternal deprivation retards neurodevelopment in Wistar rats. *Stress* 8:247-257.
- Ellenbroek BA, Sluyter F, Cools AR (2000) The role of genetic and early environmental factors in determining apomorphine susceptibility. *Psychopharmacology* 148:124-131.
- Faturi CB, Tiba PA, Kawakami SE, Catallani B, Kerstens M, Suchecki D (2010a) Disruptions of the mother-infant relationship and stress-related behaviours: Altered corticosterone secretion does not explain everything. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews* 34:821-834.
- Faturi CB, Tiba PA, Kawakami SE, Catallani B, Kerstens M, Suchecki D (2010b) Disruptions of the mother-infant relationship and stress-related behaviours: altered corticosterone secretion does not explain everything. *Neurosci Biobehav Rev* 34:821-834.
- File SE, Gonzalez LE (1996) Anxiolytic effects in the plus-maze of 5-HT<sub>1A</sub>-receptor ligands in dorsal raphe and ventral hippocampus. *Pharmacol Biochem Behav* 54:123-128.

- Fincham DS, Altes LK, Stein DJ, Seedat S (2009) Posttraumatic stress disorder symptoms in adolescents: risk factors versus resilience moderation. *Compr Psychiatry* 50:193-199.
- Finlay JM, Zigmond MJ, Abercrombie ED (1995) Increased dopamine and norepinephrine release in medial prefrontal cortex induced by acute and chronic stress: effects of diazepam. *Neuroscience* 64:619-628.
- Germann PG, Heinrichs M, Puschner H, Hellmann J, Kohler M, Ernst H (1999) RITA/Registry of Industrial Toxicology Animal data: a comparative immunohistochemical study of 77 islet cell carcinomas in Sprague-Dawley and Wistar rats using antibodies against insulin, glucagon, somatostatin and gastrin. *Exp Toxicol Pathol* 51:477-487.
- Giralt M, Armario A (1989) Individual housing does not influence the adaptation of the pituitary-adrenal axis and other physiological variables to chronic stress in adult male rats. *Physiol Behav* 45:477-481.
- Gold PW, Goodwin FK, Chrousos GP (1988) Clinical and biochemical manifestations of depression. Relation to the neurobiology of stress (2). *N Engl J Med* 319:413-420.
- Graeff FG (1993) Role of 5-HT in defensive behavior and anxiety. *Rev Neurosci* 4:181-211.
- Graeff FG, Viana MB, Mora PO (1996) Opposed regulation by dorsal raphe nucleus 5-HT pathways of two types of fear in the elevated T-maze. *Pharmacol Biochem Behav* 53:171-177.
- Graham YP, Heim C, Goodman SH, Miller AH, Nemeroff CB (1999) The effects of neonatal stress on brain development: implications for psychopathology. *Dev Psychopathol* 11:545-565.
- Hamani C, Machado DC, Hipolide DC, Dubiela FP, Suchecki D, Macedo CE, Tescarollo F, Martins U, Covolan L, Nobrega JN (2012) Deep brain stimulation reverses anhedonic-like behavior in a chronic model of depression: role of serotonin and brain derived neurotrophic factor. *Biol Psychiatry* 71:30-35.
- Heinrichs SC, Richard D (1999) The role of corticotropin-releasing factor and urocortin in the modulation of ingestive behavior. *Neuropeptides* 33:350-359.
- Holt EM, Steffen LM, Moran A, Basu S, Steinberger J, Ross JA, Hong CP, Sinaiko AR (2009) Fruit and vegetable consumption and its relation to markers of inflammation and oxidative stress in adolescents. *J Am Diet Assoc* 109:414-421.
- Huot RL, Thirivikraman KV, Meaney MJ, Plotsky PM (2001) Development of adult ethanol preference and anxiety as a consequence of neonatal maternal separation in Long Evans rats and reversal with antidepressant treatment. *Psychopharmacology* 158:366-373.
- Husum H, Termeer E, Mathe AA, Bolwig TG, Ellenbroek BA (2002) Early maternal deprivation alters hippocampal levels of neuropeptide Y and calcitonin-gene related peptide in adult rats. *Neuropharmacology* 42:798-806.
- Kalinichev M, Easterling KW, Plotsky PM, Holtzman SG (2002) Long-lasting changes in stress-induced corticosterone response and anxiety-like behaviors as a consequence of neonatal maternal separation in Long-Evans rats. *Pharmacology, biochemistry, and behavior* 73:131-140.
- Kessler RC, Magee WJ (1993) Childhood adversities and adult depression: basic patterns of association in a US national survey. *Psychol Med* 23:679-690.

- Kikusui T, Faccidomo S, Miczek KA (2005) Repeated maternal separation: differences in cocaine-induced behavioral sensitization in adult male and female mice. *Psychopharmacology* 178:202-210.
- Kim E, Rohaly G, Heinrichs S, Gimnopoulos D, Meissner H, Deppert W (1999) Influence of promoter DNA topology on sequence-specific DNA binding and transactivation by tumor suppressor p53. *Oncogene* 18:7310-7318.
- Koolhaas JM, De Boer SF, De Rutter AJ, Meerlo P, Sgoifo A (1997) Social stress in rats and mice. *Acta Physiol Scand Suppl* 640:69-72.
- Lammers BP, Heinrichs AJ, Kensinger RS (1999) The effects of accelerated growth rates and estrogen implants in prepubertal Holstein heifers on growth, feed efficiency, and blood parameters. *J Dairy Sci* 82:1746-1752.
- Laxton AW, Sankar T, Lozano AM, Hamani C (2012) Deep brain stimulation effects on memory. *J Neurosurg Sci* 56:341-344.
- Lee JH, Kim HJ, Kim JG, Ryu V, Kim BT, Kang DW, Jahng JW (2007) Depressive behaviors and decreased expression of serotonin reuptake transporter in rats that experienced neonatal maternal separation. *Neurosci Res* 58:32-39.
- Leibowitz G, Eliakim R, Amir G, Rachmilewitz D (1994) Dermatomyositis associated with Crohn's disease. *J Clin Gastroenterol* 18:48-52.
- Levine S (2001) Primary social relationships influence the development of the hypothalamic--pituitary--adrenal axis in the rat. *Physiol Behav* 73:255-260.
- Levine S, Huchton DM, Wiener SG, Rosenfeld P (1991) Time course of the effect of maternal deprivation on the hypothalamic-pituitary-adrenal axis in the infant rat. *Dev Psychobiol* 24:547-558.
- Li J, Solus J, Chen Q, Rho YH, Milne G, Stein CM, Darbar D (2010) Role of inflammation and oxidative stress in atrial fibrillation. *Heart Rhythm* 7:438-444.
- Lindenboim L, Blacher E, Borner C, Stein R (2010) Regulation of stress-induced nuclear protein redistribution: a new function of Bax and Bak uncoupled from Bcl-x(L). *Cell Death Differ* 17:346-359.
- Llorente-Berzal A, Mela V, Borcel E, Valero M, Lopez-Gallardo M, Viveros MP, Marco EM (2012) Neurobehavioral and metabolic long-term consequences of neonatal maternal deprivation stress and adolescent olanzapine treatment in male and female rats. *Neuropharmacology* 62:1332-1341.
- Llorente R, Arranz L, Marco EM, Moreno E, Puerto M, Guaza C, De la Fuente M, Viveros MP (2007) Early maternal deprivation and neonatal single administration with a cannabinoid agonist induce long-term sex-dependent psychoimmunoendocrine effects in adolescent rats. *Psychoneuroendocrinology* 32:636-650.
- Llorente R, O'Shea E, Gutierrez-Lopez MD, Llorente-Berzal A, Colado MI, Viveros MP (2010) Sex-dependent maternal deprivation effects on brain monoamine content in adolescent rats. *Neurosci Lett* 479:112-117.
- MacMillan HL, Georgiades K, Duku EK, Shea A, Steiner M, Niec A, Tanaka M, Gensey S, Spree S, Vella E, Walsh CA, De Bellis MD, Van der Meulen J, Boyle MH, Schmidt LA (2009) Cortisol response to stress in female youths exposed to childhood maltreatment: results of the youth mood project. *Biol Psychiatry* 66:62-68.
- Maier SF, Seligman MEP (1976) Learned helplessness: Theory and evidence. *Journal of Experimental Psychology: General* 105:3-46.
- Marais L, van Rensburg SJ, van Zyl JM, Stein DJ, Daniels WM (2008) Maternal separation of rat pups increases the risk of developing depressive-like

- behavior after subsequent chronic stress by altering corticosterone and neurotrophin levels in the hippocampus. *Neurosci Res* 61:106-112.
- McIntosh J, Anisman H, Merali Z (1999) Short- and long-periods of neonatal maternal separation differentially affect anxiety and feeding in adult rats: gender-dependent effects. *Brain Res Dev Brain Res* 113:97-106.
- Mello AdAFd, Mello MFd, Carpenter LL, Price LH (2003) Update on stress and depression: the role of the hypothalamic-pituitary-adrenal (HPA) axis. *Revista Brasileira de Psiquiatria* 25:231-238.
- Mercken EM, Calvert LD, Singh SJ, Hageman GJ, Schols AM, Steiner MC (2009) Dichloroacetate modulates the oxidative stress and inflammatory response to exercise in COPD. *Chest* 136:744-751.
- Moffett MC, Vicentic A, Kozel M, Plotsky P, Francis DD, Kuhar MJ (2007) Maternal separation alters drug intake patterns in adulthood in rats. *Biochemical pharmacology* 73:321-330.
- Mormède P, Lemaire V, Castanon N, Dulluc J, Laval M, Le Moal M (1990) Multiple neuroendocrine responses to chronic social stress: interaction between individual characteristics and situational factors. *Physiol Behav* 47:1099-1105.
- Nederhof E, Schmidt MV (2012) Mismatch or cumulative stress: toward an integrated hypothesis of programming effects. *Physiol Behav* 106:691-700.
- Nemeroff CB (1996) The corticotropin-releasing factor (CRF) hypothesis of depression: new findings and new directions. *Molecular psychiatry* 1:336-342.
- Oomen CA, Girardi CE, Cahyadi R, Verbeek EC, Krugers H, Joels M, Lucassen PJ (2009) Opposite effects of early maternal deprivation on neurogenesis in male versus female rats. *PLoS One* 4:e3675.
- Oomen CA, Soeters H, Audureau N, Vermunt L, van Hasselt FN, Manders EM, Joels M, Krugers H, Lucassen PJ (2011) Early maternal deprivation affects dentate gyrus structure and emotional learning in adult female rats. *Psychopharmacology (Berl)* 214:249-260.
- Oomen CA, Soeters H, Audureau N, Vermunt L, van Hasselt FN, Manders EM, Joels M, Lucassen PJ, Krugers H (2010) Severe early life stress hampers spatial learning and neurogenesis, but improves hippocampal synaptic plasticity and emotional learning under high-stress conditions in adulthood. *J Neurosci* 30:6635-6645.
- Pacak K (2000) Stressor-specific activation of the hypothalamic-pituitary-adrenocortical axis. *Physiol Res* 49 Suppl 1:S11-17.
- Pariante CM, Miller AH (2001) Glucocorticoid receptors in major depression: relevance to pathophysiology and treatment. *Biological psychiatry* 49:391-404.
- Penke Z, Felszeghy K, Fernette B, Sage D, Nyakas C, Burlet A (2001) Postnatal maternal deprivation produces long-lasting modifications of the stress response, feeding and stress-related behaviour in the rat. *Eur J Neurosci* 14:747-755.
- Petit-Demouliere B, Chenu F, Bourin M (2005) Forced swimming test in mice: a review of antidepressant activity. *Psychopharmacology (Berl)* 177:245-255.
- Plotsky PM, Owens MJ, Nemeroff CB (1998) Psychoneuroendocrinology of depression. Hypothalamic-pituitary-adrenal axis. *Psychiatr Clin North Am* 21:293-307.
- Ravinder S, Pillai AG, Chattarji S (2011) Cellular correlates of enhanced anxiety caused by acute treatment with the selective serotonin reuptake inhibitor fluoxetine in rats. *Front Behav Neurosci* 5:88.



- Rees SL, Steiner M, Fleming AS (2006) Early deprivation, but not maternal separation, attenuates rise in corticosterone levels after exposure to a novel environment in both juvenile and adult female rats. *Behav Brain Res* 175:383-391.
- Rentesi G, Antoniou K, Marselos M, Fotopoulos A, Alboycharali J, Konstandi M (2010) Long-term consequences of early maternal deprivation in serotonergic activity and HPA function in adult rat. *Neurosci Lett* 480:7-11.
- Rodgers RJ, Dalvi A (1997) Anxiety, defence and the elevated plus-maze. *Neurosci Biobehav Rev* 21:801-810.
- Rosenfeld P, Ekstrand J, Olson E, Suchecki D, Levine S (1993) Maternal regulation of adrenocortical activity in the infant rat: effects of feeding. *Dev Psychobiol* 26:261-277.
- Rosenfeld P, Gutierrez YA, Martin AM, Mallett HA, Alleva E, Levine S (1991) Maternal regulation of the adrenocortical response in preweanling rats. *Physiol Behav* 50:661-671.
- Rosenfeld P, Suchecki D, Levine S (1992a) Multifactorial regulation of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis during development. *Neuroscience and biobehavioral reviews* 16:553-568.
- Rosenfeld P, Wetmore JB, Levine S (1992b) Effects of repeated maternal separations on the adrenocortical response to stress of preweanling rats. *Physiol Behav* 52:787-791.
- Roth KA, Mefford IM, Barchas JD (1982) Epinephrine, norepinephrine, dopamine and serotonin: differential effects of acute and chronic stress on regional brain amines. *Brain Res* 239:417-424.
- Rots NY, de Jong J, Workel JO, Levine S, Cools AR, De Kloet ER (1996) Neonatal maternally deprived rats have as adults elevated basal pituitary-adrenal activity and enhanced susceptibility to apomorphine. *Journal of neuroendocrinology* 8:501-506.
- Schmidt M, Enthoven L, van Woezik JH, Levine S, de Kloet ER, Oitzl MS (2004) The dynamics of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis during maternal deprivation. *J Neuroendocrinol* 16:52-57.
- Schmidt MV, Levine S, Alam S, Harbich D, Sterlemann V, Ganea K, de Kloet ER, Holsboer F, Muller MB (2006) Metabolic signals modulate hypothalamic-pituitary-adrenal axis activation during maternal separation of the neonatal mouse. *J Neuroendocrinol* 18:865-874.
- Simmons A, Strigo IA, Matthews SC, Paulus MP, Stein MB (2009) Initial evidence of a failure to activate right anterior insula during affective set shifting in posttraumatic stress disorder. *Psychosom Med* 71:373-377.
- Smith MA, Kim SY, van Oers HJ, Levine S (1997) Maternal deprivation and stress induce immediate early genes in the infant rat brain. *Endocrinology* 138:4622-4628.
- Stanton ME, Levine S (1990) Inhibition of infant glucocorticoid stress response: specific role of maternal cues. *Developmental psychobiology* 23:411-426.
- Stein DJ, Cloitre M, Nemeroff CB, Nutt DJ, Seedat S, Shalev AY, Wittchen HU, Zohar J (2009a) Cape Town consensus on posttraumatic stress disorder. *CNS Spectr* 14:52-58.
- Stein EJ, da Silveira Filho NG, Machado DC, Hipolide DC, Barlow K, Nobrega JN (2009b) Chronic mild stress induces widespread decreases in thyroid hormone alpha1 receptor mRNA levels in brain--reversal by imipramine. *Psychoneuroendocrinology* 34:281-286.

- Stein MB, McAllister TW (2009) Exploring the convergence of posttraumatic stress disorder and mild traumatic brain injury. *Am J Psychiatry* 166:768-776.
- Steinbuechel PH, Wilens TE, Adamson JJ, Sgambati S (2009) Posttraumatic stress disorder and substance use disorder in adolescent bipolar disorder. *Bipolar Disord* 11:198-204.
- Steines D, Liew SW, Arnaud C, Vargas-Voracek R, Nazarian A, Muller R, Snyder B, Hess P, Lang P (2009) Radiographic trabecular 2D and 3D parameters of proximal femoral bone cores correlate with each other and with yield stress. *Osteoporos Int* 20:1929-1938.
- Stenson B, McIntosh N (1999) Some ethical considerations in the neonatal intensive care area. *Eur J Pediatr* 158 Suppl 1:S13-17.
- Steru L, Chermat R, Thierry B, Simon P (1985) The tail suspension test: a new method for screening antidepressants in mice. *Psychopharmacology (Berl)* 85:367-370.
- Stewart MJ, Cox G, Reifel-Miller A, Kim SY, Westbrook CA, Leibowitz DS (1994) A novel transcriptional suppressor located within a downstream intron of the BCR gene. *J Biol Chem* 269:10820-10829.
- Strekalova T, Steinbusch HW (2010) Measuring behavior in mice with chronic stress depression paradigm. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* 34:348-361.
- Suchecki D, Duarte Palma B, Tufik S (2000) Pituitary-adrenal axis and behavioural responses of maternally deprived juvenile rats to the open field. *Behavioural brain research* 111:99-106.
- Suchecki D, Mozaffarian D, Gross G, Rosenfeld P, Levine S (1993a) Effects of maternal deprivation on the ACTH stress response in the infant rat. *Neuroendocrinology* 57:204-212.
- Suchecki D, Nelson DY, Van Oers H, Levine S (1995) Activation and inhibition of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis of the neonatal rat: effects of maternal deprivation. *Psychoneuroendocrinology* 20:169-182.
- Suchecki D, Rosenfeld P, Levine S (1993b) Maternal regulation of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis in the infant rat: the roles of feeding and stroking. *Brain Res Dev Brain Res* 75:185-192.
- Suchecki D, Tiba PA, Tufik S (2002) Hormonal and behavioural responses of paradoxical sleep-deprived rats to the elevated plus maze. *J Neuroendocrinol* 14:549-554.
- Suchecki D, Tufik S (1997) Long-term effects of maternal deprivation on the corticosterone response to stress in rats. *The American journal of physiology* 273:R1332-1338.
- Surget A, Tanti A, Leonardo ED, Laugeray A, Rainer Q, Touma C, Palme R, Griebel G, Ibarguen-Vargas Y, Hen R, Belzung C (2011) Antidepressants recruit new neurons to improve stress response regulation. *Mol Psychiatry* 16:1177-1788.
- Tanti A, Belzung C (2010) Open questions in current models of antidepressant action. *British journal of pharmacology* 159:1187-1200.
- Tempel DL, Leibowitz SF (1994) Adrenal steroid receptors: interactions with brain neuropeptide systems in relation to nutrient intake and metabolism. *J Neuroendocrinol* 6:479-501.
- Thrivikraman KV, Su Y, Plotsky PM (1997) Patterns of Fos-Immunoreactivity in the CNS Induced by Repeated Hemorrhage in Conscious Rats: Correlations with Pituitary-Adrenal Axis Activity. *Stress (Amsterdam, Netherlands)* 2:145-158.

- van Oers HJ, de Kloet ER, Levine S (1998a) Early vs. late maternal deprivation differentially alters the endocrine and hypothalamic responses to stress. *Brain Res Dev Brain Res* 111:245-252.
- van Oers HJ, de Kloet ER, Whelan T, Levine S (1998b) Maternal deprivation effect on the infant's neural stress markers is reversed by tactile stimulation and feeding but not by suppressing corticosterone. *J Neurosci* 18:10171-10179.
- Vaugeois JM, Passera G, Zuccaro F, Costentin J (1997) Individual differences in response to imipramine in the mouse tail suspension test. *Psychopharmacology (Berl)* 134:387-391.
- Vazquez DM, Bailey C, Dent GW, Okimoto DK, Steffek A, Lopez JF, Levine S (2006) Brain corticotropin-releasing hormone (CRH) circuits in the developing rat: effect of maternal deprivation. *Brain Res* 1121:83-94.
- Viau V, Sharma S, Meaney MJ (1996) Changes in plasma adrenocorticotropin, corticosterone, corticosteroid-binding globulin, and hippocampal glucocorticoid receptor occupancy/translocation in rat pups in response to stress. *J Neuroendocrinol* 8:1-8.
- Viveros MP, Llorente R, Diaz F, Romero-Zerbo SY, Bermudez-Silva FJ, Rodriguez de Fonseca F, Argente J, Chowen JA (2010) Maternal deprivation has sexually dimorphic long-term effects on hypothalamic cell-turnover, body weight and circulating hormone levels. *Horm Behav* 58:808-819.
- Walker CD, Akana SF, Cascio CS, Dallman MF (1990) Adrenalectomy in the neonate: adult-like adrenocortical system responses to both removal and replacement of corticosterone. *Endocrinology* 127:832-42.
- Walker CD, Scribner KA, Cascio CS, Dallman MF (1991) The pituitary-adrenocortical system of neonatal rats is responsive to stress throughout development in a time-dependent and stressor-specific fashion. *Endocrinology* 128:1385-1395.
- Weiss SM, Wadsworth G, Fletcher A, Dourish CT (1998) Utility of ethological analysis to overcome locomotor confounds in elevated maze models of anxiety. *Neurosci Biobehav Rev* 23:265-271.
- Willner P (1997) Validity, reliability and utility of the chronic mild stress model of depression: a 10-year review and evaluation. *Psychopharmacology (Berl)* 134:319-329.
- Witek-Janusek L (1988) Pituitary-adrenal response to bacterial endotoxin in developing rats. *The American journal of physiology* 255:E525-530.
- Zakzanis KK, Heinrichs RW (1999) Schizophrenia and the frontal brain: a quantitative review. *J Int Neuropsychol Soc* 5:556-566.
- Zavaschi MLS, Satler F, Poester D, Vargas CF, Piazenski R, Rohde LAP, Eizirik CL (2002) Association between childhood loss trauma and depression in adulthood. *Rev Bras Psiquiatr* 24:189-195.

## 9 ANEXOS

Anexo 1. Carta de aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa da UNIFESP.

São Paulo, 26 de Novembro de 2010.  
CEP 1418/10

Ilmo(a). Sr(a).  
Pesquisador(a) DEBORAH SUCHECKI  
Co-Investigadores: Karina Kores Dorsa, Deborah Suchecki (orientadora)  
Disciplina/Departamento: Psicofarmacologia/Psicobiologia da Universidade Federal de São Paulo/Hospital São Paulo  
Patrocinador: AFIP/FAPESP.

### PARECER DO COMITÊ DE ÉTICA INSTITUCIONAL

Ref: Projeto de pesquisa intitulado: "O impacto da privação materna no comportamento-tipo depressivo induzido pelo estresse crônico moderado: relação com as monoaminas cerebrais".

CARACTERÍSTICA PRINCIPAL DO ESTUDO: Experimental, categoria D - estudo crônico.

RISCOS ADICIONAIS PARA O PACIENTE: Não se aplica.

OBJETIVOS: Avaliar a instalação do comportamento-tipo depressivo induzido pelo paradigma de estresse crônico moderado (ECM) pela quantificação do consumo de sacarose. Determinar as concentrações plasmáticas de CORT durante o ECM. Determinar as concentrações de monoaminas em regiões cerebrais envolvidas com emocionalidade (hipocampo ventral, amígdala e córtex pré-frontal) e resposta ao estresse (hipotálamo) e em seus respectivos núcleos (noradrenalina= locus coeruleus; serotonina = núcleos da Rafe).

RESUMO: Estudo com 72 ratos Wistar, machos, com 3 meses. Anestésico: pentobarbital. Eutanásia: perfusão. Os animais serão acasalados e analisadas as crias. O dia pós natal (DPN) 3 ou 11, as ninhadas serão retiradas da gaiola moradia e transportadas para outra sala para privação materna por 24 horas. O regime de estresse crônico moderado (ECM) consiste em expor os animais diariamente a um dos 11 estressores : dois períodos de privação total de água e alimento (por 15 h), dois períodos de 18h em gaiola com maravalha molhada, dois períodos em gaiolas inclinadas (45 a 60° de inclinação) um período de pareamento com outro animal (18h) , dois períodos de 5h e um período de 4h de ruído constante (85dB), 3 períodos de 1h de exposição a uma flanela com odor de predador , 3 períodos de 13h de iluminação contínua, dois períodos de 16h de privação parcial de alimento, dois períodos de 1h com uma garrafa de água vazia e dois períodos de 2h com luz estroboscópica. Os estressores serão aplicados de forma aleatória por 21 dias. O índice de preferência por sacarose será determinado, semanalmente, durante um período de 1h, para todos os animais. Aos 50 dias, os animais serão submetidos ao paradigma de ECM, que consiste na exposição diária dos animais a um estressor, de maneira imprevisível. Será coletado sangue para determinar concentrações plasmáticas de corticosterona. Os animais serão sacrificados e os cérebros serão retirados para determinação das concentrações de Noradrenalina e Serotonina e seus metabólitos, ácido homovanílico e ácido-5-hidroindolacético..

**FUNDAMENTOS E RACIONAL:** Visto que o estresse precoce aumenta a vulnerabilidade individual para o desenvolvimento de transtornos psiquiátricos induzidos pelo estresse na idade adulta e a grande co-morbidade entre os transtornos ansiosos e de humor, a proposta do presente estudo é avaliar a influência da privação materna em diferentes idades sobre o comportamento tipo depressivo de ratos machos adultos e avaliar as concentrações de monoaminas em regiões do sistema nervoso central envolvidas no transtorno depressivo.

**MATERIAL E MÉTODO:** Estão descritos os procedimentos do estudo, apresentando parecer do Núcleo de Proteção Radiológica para manuseio de material radiativo..

**DETALHAMENTO FINANCEIRO:** AFIP e FAPESP - R\$ 10254,00.

**CRONOGRAMA:** 24 meses.

**OBJETIVO ACADÊMICO:** Mestrado.

**ENTREGA DE RELATÓRIOS PARCIAIS AO CEP PREVISTOS PARA:** 21/11/2011 e 20/11/2012.

O Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal de São Paulo/Hospital São Paulo **ANALISOU** e **APROVOU** o projeto de pesquisa referenciado.

1. Comunicar toda e qualquer alteração do projeto.
2. Comunicar imediatamente ao Comitê qualquer evento adverso ocorrido durante o desenvolvimento do estudo.
3. Os dados individuais de todas as etapas da pesquisa devem ser mantidos em local seguro por 5 anos para possível auditoria dos órgãos competentes.

Atenciosamente,



Prof. Dr. José Osmar Medina Pestana  
Coordenador do Comitê de Ética em Pesquisa da  
Universidade Federal de São Paulo/ Hospital São Paulo

1418/10