CLAUDIA DE BRITO FATURI

CONSEQUÊNCIAS DA PRIVAÇÃO MATERNA PARA O COMPORTAMENTO TIPO-ANSIOSO: participação do eixo Hipotálamo-Pituitária-Adrenal e do Sistema de Neurotransmissão GABAérgico

Tese apresentada à Universidade Federal de São Paulo – Escola Paulista de Medicina, para a obtenção do título de doutor em Ciências

Orientadora: Prof[a] Dr[a] Deborah Suchecki

São Paulo

2009

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO PAULO

DEPARTAMENTO DE PSICOBIOLOGIA

Chefe do Departamento: Profa. Dra. Maria Lucia Oliveira de Souza Formigoni

Coordenadora do Curso de Pós-graduação: Profa. Dra. Maria Gabriela Menezes de Oliveira

DEDICATÓRIA

À minha querida Avó Palmyra (*in memoriam*),

Guardo comigo muitas lembranças doces da sua presença, do seu caráter e dos mimos que dedicava a todos que amava.

AGRADECIMENTOS

À minha Mãe Nanci e ao meu Pai Luis Carlos (*in memoriam*) por tudo... tudo que sou foi moldado pelos valores que vocês me passaram, obrigada!

Ao André, pelo amor, pela paciência, pela compreensão, pela cumplicidade e por tudo o que temos construído e sonhado juntos.

Aos queridos amigos Thaís e Fábio Oliveira, Ruliene Lanini, Silvinha Margente, Paulinha Cassulino, Letícia Andrade, Débora Tobias, Deinha Bezerra, Andrea Borges, Rômulo e Karine Zamberlan, Karin e Quim Alcântara, Flávia Teixeira-Silva e Christopher Lloyd, Homer Nunes, Letícia, Mix Frantz e Winvers, Kiki, Cuzcuz Foelkel e Ramón. Agradeço a amizade sincera que me dedicam, pelo apoio que me dão frente aos desafios e por celebrarem comigo cada conquista.

À Valéria Tronci, Leo e Taiza Stump por todos os momentos de alegria, de frustação e de saudade que compartilhamos lá "na gringa". À Sarah Mizielinska e Liz Mitchell, que os laços da nossa amizade não se limitem às distâncias que a geografia impõe.

Aos meus irmãos André e Biba e as cunhadas Vanessa e Nanda pelos laços de amizade que reforçamos a cada dia. Agradeço também a minha família "in law" Sr Zanone e Dna Maria

Helena, Dudu, Bia, Lule, Fábio, Gisele e Dudinha, pela amizade e as alegrias compartilhadas.

Agradeço à Lú de Souza, à Bethe Borsonelo, à Rosana Alvez, à Vivi Ceschim, Vanessa e à Lia por tudo de bom que o convívio diário pode trazer: amizade.

À todos os colegas do Departamento de Psicobiologia, pelas conversas de corredor e pelo convívio amistoso.

À Nereide, Julio e Mara da Psicobiologia e Marcelo da Pró-reitoria pela ajuda com os aspectos burocráticos da pós-graduação e cordialidade com que sempre me atenderam.

À Deborah Suchecki, minha orientadora, obrigada pela oportunidade, pelas broncas e pelos puxões de orelha, pois afinal de contas é assim que nós crescemos!

Aos componentes do Grupo de Estudos sobre Estresse, Ricardo Machado, Suzi Kawakami, Paula Tiba, Jair Barbosa, Vinícius Buncheit, Mara Raboni, e a tantos outros, pela contribuição significativa que têm dado à minha formação em geral e a este trabalho em particular.

Aos Professores Jerry J Lambert, Delia Belleli e David Balfour, meus orientadores durante o doutorado sanduíche, pelo seu empenho em terem feito com que a minha curta estada na Escócia tenha tido o máximo de aprendizagem científica e cultural.

Aos meus colegas de laboratório na Dundee University, Lori-Ann, Michelle, Lindsay, Janna, Gregg, Murray, Ed, Adam, Benn, Nicola, Sara, e Taslin, pela sua amizade.

Aos Professores Telma Gonçalves Carneiro Spera de Andrade, Luciano Felicio, Milena Viana e Aldo Lucion pelas valiosas contribuições para a elaboração da versão final deste trabalho.

APOIO FINANCEIRO

AFIP, CAPES e FAPESP (Auxílio Pesquisa 2006/06415-4)

Índice

DEDICATÓRIA iii

AGRADECIMENTOS iv

LISTAS DE FIGURAS x

LISTA DE TABELAS xi

LISTA DE ABREVIATURAS xii

RESUMO xiv

INTRODUÇÃO GERAL 1

CAPÍTULO 1 8

O estresse e o funcionamento do eixo HPA durante o período neonatal 8
Animais, Materiais, Métodos e Resultados 20
Discussão 24

CAPÍTULO 2 30

Alterações duradouras decorrentes da privação materna: participação do eixo HPA 30
Animais, Materiais, Métodos e Resultados 36
Discussão 43

CAPÍTULO 3 47

Alterações duradouras decorrentes da privação materna: comportamento tipo ansioso 47
Animais, Materiais, Métodos e Resultados 52
Discussão 60

CAPÍTULO 4 65

Conseqüências da Privação Materna na ligação do flunitrazepam ao sítio alostérico Benzodiazepínico do receptor $GABA_A$ 65
Animais, Materiais, Métodos e Resultados 70
Discussão 75

DISCUSSÃO GERAL 78

CONCLUSÕES 85

ANEXO 1 88

Pareceres do Comitê de Ética 88

ANEXO 2 92

Estágio de Doutorado Sanduíche na Universidade de Dundee, Escócia 92
RECEPTORES GABAERGICOS EXTRASINÁPTICOS: UM IMPORTANTE ALVO AÇÃO PARA OS NEUROESTERÓIDES 93
Animais, Materiais e Métodos 100
RESULTADOS 106
DISCUSSÃO 110

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS 113

ABSTRACT 145

Bibliografia consultada 147

LISTAS DE FIGURAS

Figura 1. Concentrações plasmáticas de CORT em situação basal e 30, 60 e 90 min depois da administração de salina hipertônica (3%) em neonatos.....22

Figura 2. Concentrações plasmáticas de ACTH de machos adultos submetidos à Privação Materna por 24 h do 3º ao 4º dia de vida (PM 3-4) e do 11º ao 12º dia de vida (PM 11-12) e do grupo não-privado (NPM).....38

Figura 3. Concentrações plasmáticas de CORT de machos adultos submetidos à Privação Materna por 24 h do 3º ao 4º dia de vida (PM 3-4) e do 11º ao 12º dia de vida (PM 11-12) e do grupo não-privado (NPM).....39

Figura 4. Foto do aparato utilizado para o experimento do Paradigma da Exploração Livre. A figura "A" mostra o aparato quando a porta deslizante ainda está fechada. Já na figura "B" a porta foi retirada e o animal pode explorar o ambiente novo livremente.....53

Figura 5. Exemplo de aparato usado no teste da Caixa de Transição Claro/Escuro.....57

Figura 6. Porcentagem de tempo gasto no Compartimento Claro no Teste da Caixa de Transição Claro/Escuro (média±ep). O grupo PM 3-4 foi privado da mãe do 3º ao 4º dia de vida, enquanto que o PM11-12 foi privado da mãe do 11º ao 12º. O grupo NPM não foi manipulado em nenhum momento.....59

Figura 7. Fotos das seções em que a leitura das estruturas de interesse foi realizada.....73

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Concentrações plasmáticas de CORT (ng/ml) em resposta ao Teste de Supressão à Dexametasona (TSD) em animais Privados das Mães entre os dias 3 e 4 de vida (PM 3-4), os 11 e 12 (PM 11-12) e animais controle não privados (NPM).....42

Tabela 2. Análise do comportamento tipo-ansioso pelo Paradigma da Exploração Livre. Entre os grupos testados estavam animais Privados das Mães entre os dias 3 e 4 de vida (PM 3-4), os 11 e 12 (PM 11-12) e animais controle não privados (NPM).....55

Tabela 3. Concentrações plasmáticas de CORT (ng/ml) antes e depois do Paradigma de Exploração Livre de animais Privados das Mães entre os dias 3 e 4 de vida (PM 3-4), os 11 e 12 (PM 11-12) e animais controle não privados (NPM).....56

Tabela 4. Concentrações plasmáticas de CORT (ng/ml) antes e depois do Teste da Caixa de Transição Claro/escuro. Os animais testados foram Privados das Mães entre os dias 3 e 4 de vida (PM 3-4), os 11 e 12 (PM 11-12) e animais controle não privados (NPM).....58

Tabela 5. Densidade de marcação do filme pelo trítio (µCi/g). Três grupos experimentais foram analisados, dois deles foram privados das mães do dia 3 ao 4 (PM 3-4), do 11 ao 12 (PM 11-12) e um terceiro grupo foi mantido com as mães (NPM).....72

LISTA DE ABREVIATURAS

ACTH	Hormônio Adrenocorticotrófico
ACTH-R	Receptor do Hormônio Adrenocorticotrófico
ANOVA	Análise de Variância
ASC	Área sob a curva
AVP	Arginina-Vasopressina
BZD	Benzodiazepínico (s)
GLC	Globulina Ligadora de Corticosterona
CORT	Corticosterona
CRH	Hormônio Liberador de Corticotrofina
CRH-1	Receptor tipo 1 de Hormônio Liberador de Corticotrofina
CSFa	Líquido Cefaloraquidiano Artificial
DEXA	Dexametasona
DPN	Dia pós natal
e.p.	Erro padrão
♀	Fêmeas
GABA	Ácido Gama-aminobutírico
$GABA_A$	Receptor tipo A do Ácido Gama-aminobitírico
GC	Glicocorticóide
GR	Receptor Glicocorticóide

HPA	Hipotálamo-Pituitária-Adrenal
i.p.	Intraperitoneal
LPS	Lipopolissacarídeos
♂	Machos
MR	Receptor Mineralocorticóide
NPM	Não Privado da Mãe
PHRE	Período de Hiporresponsividade ao Estresse
PM	Privação Materna/Privado da Mãe
POMC	Pró-opiomielanocortina
RIA	Radioimunoensaio
SNC	Sistema Nervoso Central
TSD	Teste da Supressão à Dexametasona
β-E	β-endorfina

RESUMO

Alguns estudos pré-clínicos têm demostrado que eventos adversos na infância e adolescência representam um fator de vulnerabilidade para o surgimento de transtornos psiquiátricos na idade adulta, e que a redução da resiliência à eventos estressantes deve desempenhar um papel importante neste fenômeno. As manipulações em animais de laboratório, como a privação materna (PM) por 24 h durante o período de hiporresposividade ao estresse (PHRE), podem ser um instrumento útil para a compreensão de como os eventos no período precoce do desenvolvimento resultam em alterações comportamentais e da atividade do eixo Hipotálamo-Pituitária-Adrenal (HPA) na idade adulta. Alguns autores têm observado que a PM, quando imposta no 3° dia de vida (antes do início) ou no 11° dia (no vale) do PHRE, resulta em padrões de atividade do eixo HPA distintos. A PM no 3° dia induz à hiperatividade do eixo, enquanto que no 11° dia, resulta na hipoatividade, alterações estas observadas em animais jovens. Assim, os principais objetivos do presente trabalho foram os de estudar como a PM afetaria a atividade do eixo HPA durante o PHRE, e verificar se essas alterações teriam conseqüências duradouras. Os resultados mostraram que os efeitos da PM na liberação de ACTH mantiveram o mesmo padrão de atividade relatado na adolescência, ou seja, hiperresponsividade no grupo submetido à PM no 3^{o} dia de vida e hiporresponsividade no grupo submetido à mesma manipulação no 11^{o} dia de vida. No entanto, essa alteração não se refletiu na liberação da corticosterona (CORT), pois não se observou diferença na secreção deste hormônio entre os grupos. Além disso, a PM não alterou a liberação de

CORT em resposta ao Teste de supressão à Dexametasona, indicando que não houve alterações no sistema de retroalimentação negativa no nível hipofisário do eixo HPA. A PM afetou o comportamento do tipo ansioso nos animais de ambos os grupos PM, sendo que tal alteração parece não ter sido mediada por mudanças na densidade do sítio benzodiazepínico do receptor $GABA_A$. Os resultados indicaram que, embora a PM não leve a alterações permanentes na secreção da corticosterona, este pode ser um modelo animal interessante para se estudar o substrato neurobiológico que faz com que um evento adverso durante o desenvolvimento aumente a vulnerabilidade aos transtornos relacionados à ansiedade.

INTRODUÇÃO GERAL

A capacidade de observação do jovem médico Hans Selye fez dele um cientista pioneiro no estudo das reações fisiológicas em resposta ao estresse. Já na primeira aproximação da prática clínica, ainda na Universidade Carlos, em Praga, Selye apresentava questionamentos que destoavam do foco que os seus professores desejavam dar para a sua formação médica. Embora seus tutores estivessem interessados em relacionar o agente etiológico com as características específicas manifestadas pelos pacientes, Selye, ao contrário, estava mais interessado nos sintomas comuns aos doentes que apresentavam patologias diferentes. Assim, os primeiros estudos de Selye mostraram que os pacientes que apresentavam doenças que afetavam diferentes sistemas, como por exemplo, a artrite reumatóide, a hipertensão e a necrose cardíaca, respondiam com um mecanismo de defesa unificado, caracterizado por mudanças estruturais e bioquímicas específicas. Tais reações foram por ele denominadas de estresse ou "síndrome de adaptação geral" (Selye, 1965).

O termo estresse tem origem na física, sendo uma condição existente em materiais elásticos que, sob pressão externa sofrem alteração na forma (Selye, 1965). Assim, o estressor é o agente que causa estresse, podendo ser, no contexto médico, o fator responsável por aumentar a vulnerabilidade do organismo ao processo de adoecimento. No entanto, a diversidade e a complexidade dos eventos fisiológicos provocados pelo estresse não são somente danosos, eles também são responsáveis por uma série de reações capazes de adaptar o organismo a situações adversas e também de reparar o dano provocado pelas mesmas (Selye, 1937).

Os primeiros estudos dedicados à descrição da fisiopatologia subjacente às características clínicas de indivíduos com um histórico de experiências estressantes prévias ao adoecimento mostraram que, o hipotálamo, a Pituitária anterior e as glândulas adrenais, estavam integrados e liberavam hormônios que mediavam as principais alterações centrais e periféricas durante o estresse.

Sapolsky e cols. (2000) descreveram o curso temporal em que a resposta central se integra à periférica durante o estresse. Assim, imediatamente após a exposição ao estresse ocorre: 1) ativação autonômica simpática com aumento da liberação da adrenalina e da noradrenalina (NOR); 2) liberação do Hormônio Liberador da Corticotrofina (CRH) pelo núcleo Paraventricular no Hipotálamo (PVN) no sistema porta-hipofisário e, 10 segundos mais tarde, a liberação do ACTH pela Pituitária anterior; 3) há também diminuição na liberação do GnRH (Hormônio Liberador de Gonadotrofinas) e, logo em seguida, diminuição das gonadotrofinas; 4) Caso haja lesão e hemorragia, a liberação da Arginina-Vasopressina (AVP) pelo Hipotálamo, que age sinergicamente com o CRH (Joëls & Baram, 2009; Wigger e cols., 2004), e a renina pelos rins também é importante para que não haja hipovolemia, isto em contraste à liberação moderada da AVP que pode ser desencadeada por estressores leves. Em uma segunda etapa, cujos efeitos são consequentemente mais tardios, ocorre aumento nas concentrações plasmáticas dos glicocorticóides (GCs), a qual é provocada pela ação do ACTH sobre as adrenais e pela diminuição da liberação dos esteróides gonadais como consequência da redução da liberação do GnRH.

Há uma terceira etapa que inclui a chegada dos GCs aos seus órgãos-alvo. Como muitos dos efeitos dos GCs são exercidos genomicamente, os mesmos não ocorrem imediatamente após o evento estressor e também apresentam efeitos mais duradouros. Desde os primeiros estudos até aos mais atuais, muitos dos efeitos destes esteróides já foram descritos (Sapolsky e cols., 2000) e muitas das características clássicas observadas durante o estresse têm sido atribuídas à sua ação. As principais consequências imediatas da reação ao estresse são provocadas pela liberação do CRH pelo PVN e pela ativação simpática, que em última instância mantém o indivíduo alerta e aumentam o aporte sanguíneo para as regiões que elaborarão e executarão as estratégicas de defesa, como o SNC e a musculatura esquelética. Essas reações interferem no funcionamento basal de diversos órgãos e sistemas e, somadas às reações tardias provocadas pela atuação dos GCs, podem levar a um prejuízo de função dos mesmos, se desencadeadas cronicamente. Assim, com o objetivo de controlar os possíveis danos provocados pela exposição prolongada aos GCs, o organismo apresenta mecanismos de balanço fisiológico como a alostase.

O conceito de alostase foi recentemente introduzido na disciplina de fisiologia para substituir o termo homeostase (homeo=igual; stasis=estável), criado por Claude Bernard para explicar os mecanismos que mantinham um determinado sistema funcionando em nível ótimo e relativamente estável, mesmo quando submetidos a variações ambientais. Assim, o principal conceito implícito na palavra homeostase é “estabilidade”. No entanto, muitos estudos têm mostrado que o meio externo pode causar alterações no meio interno, mas para que o sistema possa funcionar satisfatoriamente, existe uma faixa de variação

aceitável. Para contemplar essa nova visão sobre a interação entre as adaptações do meio interno frente à influência ambiental, Sterling & Eyer (1988, apud McEwen, 1998) introduziram o conceito de alostase (alo=variável; stasis=estável), o que significa que o sistema varia para se manter estável.

Com efeito, na presença de um desafio, físico ou psicológico, o organismo lança mão do sistema de estresse, que provoca alterações hormonais, imunológicas e bioquímicas, além de alterar a excitabilidade neuronal. Tais reações deslocam o funcionamento do organismo da sua situação basal. Esse desequilíbrio foi denominado por Selye de "Síndrome de Adaptação Geral", apresentando três fases que são, respectivamente, reação de alarme quando o sistema neuroendócrino de estresse é recrutado; resistência quando a adaptação é ótima e exaustão, quando a adaptação é perdida (Selye, 1965). Assim, quando ocorre perda da adaptação, o desequilíbrio dos sistemas vitais acontece, impedindo a alostase. É por isso que, tão importante quanto a ativação desse sistema, está a eficiência para desativá-lo, principalmente quando o estímulo que o provocou não se faz mais presente. Assim, quando o sistema de estresse é ativado cronicamente ou apresenta alguma falha no mecanismo que o controla, o organismo mantém os GCs em altas concentrações plasmáticas, podendo levar à exaustão das reservas energéticas e limitar a capacidade de produzir reações fisiológicas adaptativas para lidar adequadamente com outros estímulos estressantes. Tal situação foi definida por Bruce McEwen como carga alostática e, no caso da carga alostática se estender por um período muito prolongado, o organismo pode ficar vulnerável a doenças

físicas e psicológicas, de modo que a história de vida do indivíduo e a natureza do estressor são fatores importantes para determinar essa vulnerabilidade.

As discussões entre os filósofos e os psicólogos sobre a importância relativa das experiências vividas ao longo do desenvolvimento, assim como das características hereditárias para a determinação da inteligência e do perfil comportamental do indivíduo, dividiu opiniões em determinado momento da história da Ciência. De um lado, acreditava-se que a herança genética tinha um peso maior em determinar essas características, do outro defendia-se que as experiências vividas durante o período neonatal, a infância e a adolescência poderiam ter um impacto mais importante. No entanto, os avanços conquistados nas áreas da biologia celular e molecular dão suporte à idéia de que a expressão gênica pode ser regulada pelo ambiente (McEwen, 1998) e não apenas o contrário, e que essa interação acontece durante toda a vida do indivíduo. Com isso, a ciência vem traçando um novo paradigma no estudo das bases biológicas do comportamento, fazendo com que essas duas vertentes, outrora divergentes, passassem a ser complementares.

O SNC também já foi considerado uma estrutura estática, tendo esta rigidez, por muito tempo, servido como base científica para justificar a posição dos que defendiam que as experiências ao longo da vida podiam trazer poucas contribuições para o estabelecimento do perfil psicológico do indivíduo. No entanto, atualmente vários estudos demonstram que o SNC é uma estrutura plástica e que, em determinadas regiões, é possível observar processos de neurogênese e sinaptogênese, além do aumento ou da redução da arborização dendrítica (McEwen 1998; Frank & Tsai, 2009; Chao e cols., 2009).

Os estudos pioneiros de Seymour Levine e dos seus colaboradores mostraram que experiências estressantes durante o desenvolvimento têm impacto no comportamento emocional e na resposta ao estresse, tendo contribuído imensamente para consolidar a integração entre os pontos de vista que defendem o papel da hereditariedade e do ambiente como determinantes do perfil comportamental do indivíduo adulto (Holmes e cols., 2005).

Dado o nível de dependência que os neonatos apresentam em relação aos cuidados maternos, a qualidade destes comportamentos tem um papel central na regulação de alguns sistemas fisiológicos (Shear e cols., 1983) como, por exemplo, o sistema de estresse. Quando o cuidado materno é interrompido pela separação das mães dos filhotes, uma série de alterações fisiológicas, que pode trazer consequências duradouras, é desencadeada, afetando o funcionamento dos sistemas neuroendócrinos e comportamentais (Hofer & Shair, 1982). Realmente, estudos clínicos mostram que eventos adversos na infância podem, na adolescência e idade adulta, favorecer o aparecimento de transtornos psiquiátricos como depressão e ansiedade. As manipulações com animais de laboratório, como a privação materna (PM), podem ser um instrumento útil para a compreensão de como eventos no período precoce do desenvolvimento podem levar, na idade adulta, a alterações comportamentais e na atividade do eixo Hipotálamo-Pituitária-Adrenal (HPA). Assim, o presente trabalho tem como principal objetivo estudar a influência da Privação Materna por 24h realizada no período neonatal sobre a resposta neuroendócrina de estresse em filhotes e adultos, assim como estudar suas consequencias comportamentais em indivíduos adultos.

CAPÍTULO 1

O estresse e o funcionamento do eixo HPA durante o período neonatal

O sistema de estresse pode ser considerado o sistema neuroendócrino mais semelhante entre os mamíferos (Vázquez, 1998). Os GCs têm um papel fisiológico fundamental em recrutar ações de diferentes sistemas durante o estresse. Ao longo do desenvolvimento, tanto no período fetal quanto no neonatal, altas concentrações desse hormônio podem ter uma atuação tanto benéfica quanto maléfica. Sabe-se, por exemplo, que no final do período da gestação, o aumento nas concentrações circulantes desse hormônio acelera o amadurecimento dos pulmões, do fígado e dos rins (Kapoor e cols., 2006; Liggins, 2000). Por outro lado, o aumento dos GCs provocado por estresse numa fase mais precoce da gestação, pode retardar o crescimento fetal e levar a conseqüências permanentes, incluindo doenças cardiovasculares, metabólicas e transtornos psiquiátricos (Seckl, 1997; Gunnar & Donzella, 2002; de Kloet e cols., 1988). Assim, parece que durante a vida fetal e o período neonatal, o balanço fino nas concentrações dos GCs circulantes tem um papel crítico para o desenvolvimento normal (Levine, 2001).

De acordo com a literatura, tanto em ratos e camundongos (de Kloet e cols., 1988) quanto em humanos (Gunnar & Donzella, 2002) há um período em que o eixo Hipotálamo-Pituitária-Adrenal (HPA) ainda não funciona adequadamente. A apresentação de um estímulo estressor, que na idade adulta levaria a um aumento nas concentrações dos GCs, não é capaz de desencadear a mesma reação no período neonatal. Em ratos e camundongos esse período vai do dia pós-natal (DPN) 4 a 14 (Witek-Janucek, 1988), e em humanos acontece durante o 1º ano de vida (Gunnar, 1998).

Shapiro e cols. (1962) apresentaram a primeira descrição da ontogênese da resposta endócrina ao estresse, tendo concluído que, durante o desenvolvimento, havia um período de não-responsividade ao estresse (para uma revisão Rosenfeld e cols., 1992).

Na medida em que novas técnicas foram desenvolvidas para estudar o funcionamento do eixo HPA em diferentes níveis, observou-se que a resposta ao estresse, durante o chamado período de não responsividade, implicava um aumento nas concentrações plasmáticas do ACTH e da CORT quando os estímulos estressores eram a administração dos aminoácidos excitatórios (Kent e cols., 1996), o estresse imunológico (Shanks & Meaney, 1994) e a exposição ao frio (Walker e cols., 1991). Concluiu-se então que o eixo HPA podia responder a alguns tipos de estressores, tendo então esse período sido denominado de Período de Hiporresponsividade ao Estresse (PHRE) e não mais de período de não responsividade.

O funcionamento adequado da resposta de estresse depende da sincronização entre os componentes do eixo HPA. Durante o PHRE o sistema de estresse não apresenta tal sincronia, e a resposta do componente central pode ser diferente do periférico. Além disso, a responsividade depende do tipo de estímulo empregado e da fase do desenvolvimento em que este é apresentado (Walker e cols., 1991). Assim, cada um dos componentes classicamente envolvidos na resposta ao estresse apresenta características de funcionamento bastante particulares durante o PHRE.

1.1 A resposta do Sistema Nervoso Central ao estresse durante o PHRE

Os primeiros estudos sobre o PHRE tinham como objetivo esclarecer qual (ou quais) o(s) componente(s) do eixo HPA que constituía(m) o *locus* (ou *loci*) da responsividade diminuída ao estresse. A expressão do CRH no PVN pode ser detectada vários dias antes do nascimento, mas diminui progressivamente no período perinatal e volta a aumentar no DPN 4, atingindo concentrações semelhantes às observadas em animais adultos (Keegan e cols., 1994; Grino e cols., 1989; Baram & lerner, 1991). Para Widmaier (1990), o CRH, sendo o mediador central do eixo HPA, deveria ser o principal responsável pelo fenômeno. Assim, utilizando uma preparação *in vitro,* este autor (Widmaier, 1990) observou que, em um animal com 35 dias de vida, mas não em um filhote durante o PHRE, a glicopenia provocava um aumento da liberação do CRH.

Este resultado deu embasamento à idéia de que o CRH era um dos responsáveis pela manutenção do PHRE. Grino e cols. (1989) também acreditavam nessa hipótese. No entanto, vários estudos desenvolvidos posteriormente mostraram que o CRH não era o principal responsável por esse fenômeno.

Smith e cols. (1997*)* estudaram a liberação do ACTH e da CORT, além da expressão de RNAm para o CRH, c-fos e NGF-IB no PVN em resposta ao estresse durante o PHRE. Esses autores observaram que, embora não houvesse aumento da CORT em resposta à administração de salina isotônica, havia um pequeno aumento do ACTH e um aumento robusto na expressão de c-fos e NGF-IB no PVN. Dent e cols. (2000) observaram resultados coerentes com estes, o que permite concluir que, embora a liberação da CORT seja pequena durante o PHRE, o cérebro é capaz de detectar o estímulo estressor, provocando um aumento significativo na expressão desses genes de expressão imediata. Para esses

autores, o termo PHRE é descritivo apenas no nível hipofisário e córtico-adrenal da resposta ao estresse, por que no nível central os animais são perfeitamente capazes de responder a um estímulo leve como a administração da salina isotônica. Isso mostra que a resposta de estresse está inibida na periferia, mas não no nível central.

Segundo Chautard e cols. (1993), os aminoácidos excitatórios como o ácido kaínico (KA) e NMDA provocam um aumento robusto nas concentrações plasmáticas do ACTH e da CORT durante o PHRE. A administração de soro anti-CRH e não de soro anti-VP, bloqueou o aumento do ACTH e da CORT observado, um dado indireto que confirma que o CRH tem um papel na resposta ao estresse durante o PHRE.

Já Walker e cols. (1997) mostraram que a AVP pode sim desempenhar um papel importante na resposta ao estresse durante o PHRE. Esses autores administraram uma toxina associada a um anticorpo específico para o CRH no PVN durante o PHRE, o que provocou um aumento compensatório na liberação da AVP, da mesma forma que quando a toxina estava associada com a AVP se observava um aumento compensatório no CRH. Esses resultados mostram que, mesmo durante o PHRE, pode haver alterações compensatórias em ambos CRH e AVP, mostrando que, mesmo imaturo, o hipotálamo pode se adaptar a alterações funcionais para permitir o seu funcionamento adequado. Assim, embora o hipotálamo desempenhe um papel fundamental no sistema de estresse e seja o componente central onde a resposta é desencadeada, este parece não orquestrar a hiporresponsividade das adrenais ao estresse entre os DPNs 4 e 14 e, ao contrário do que se observa para o ACTH e a CORT, o hipotálamo parece ser hiperresponsivo ao estresse durante o PHRE (Smith e cols., 1997; Walker e cols., 1997).

1.2 Componentes Periféricos da resposta ao estresse durante o PHRE

1.2.1 Pituitária, Pró-opiomielanocortina (POMC) e os seus derivados

O ACTH e a β-endorfina (β-E) são produtos da clivagem da POMC que ocorre devido à ação das pró-hormônio convertases 1 e 2 (PC1 e PC2) (Wei e cols., 2003). Esse processo ocorre na Pituitária anterior e é estimulado pelo CRH e pela AVP. Os estudos discutidos a seguir mostram um panorama geral da função dessas substâncias no PHRE.

Alguns estudos *in vitro* mostram que a Pituitária é de fato sensível ao CRH durante o PHRE, e que dos DPNs 6 a 11, a liberação do ACTH ocorre de forma mais pronunciada em resposta ao CRH, quando comparada à resposta dos corticotrofos obtidos de animais nos DPNs 1 ou 20. De acordo com esses resultados o PHRE não pode ser explicado por uma diminuição na sensibilidade dos corticotrofos ao CRH (Walker & Vrana, 1993). Dado que o PVN pode responder ao estresse durante o PHRE, a aparente dessincronização entre o hipotálamo e a Pituitária pode ser explicada pela falta de maturação do sistema porta-hipofisário, cujo desenvolvimento se inicia no DPN 5, mas não está totalmente completo antes do DPN 40 (Glydon, 1957).

Tanto em neonatos durante o PHRE quanto no animal adulto, a resposta adrenocortical a um estímulo estressor acarreta aumento nas concentrações dos GCs. A diferença da resposta ao estresse entre ambos é que o animal adulto apresenta essa resposta como consequência da liberação do ACTH. Durante o PHRE o aumento da POMC se traduz em um aumento mínimo nas concentrações do ACTH (Vazquez, 1998). Por outro lado, Iny e cols. (1987) observaram que, durante o PHRE, o éter aumenta

significativamente as concentrações da β-E, mas não do ACTH, (Guillet & Michaelson, 1978). Dado que a β-E têm atividade inibitória sobre a atividade neuronal e sobre a atividade do eixo HPA (Bilkei-Gorzo e cols., 2008), pode-se concluir que o aumento nas concentrações plasmáticas dessa substância em resposta a um estressor como éter deve ser importante para impedir um aumento pronunciado na excitabilidade central.

1.2.2. Córtex da adrenal e os glicocorticóides na resposta ao estresse durante o PHRE

Embora não haja aumento das concentrações do ACTH e da CORT em resposta a um estressor leve como a salina, essa hiporresponsividade não se mantém em resposta a todos os tipos de estressores. Dent e cols. (1999) testaram o efeito do lipopolisacarídeo (LPS), uma endotoxina presente na parede celular de bactérias Gram-negativas, e observaram que embora os animais não apresentassem aumento da liberação da CORT em resposta à administração de salina, o LPS provocava um aumento robusto nas concentrações deste hormônio. O mesmo pode ser observado quando o estímulo estressor é o NMDA ou o ácido kaínico, ambos aminoácidos excitatórios (Chautard e cols., 1993). Além disso, a interleucina-1β, presente nas respostas inflamatórias, também desencadeia a liberação do ACTH e da CORT durante o PHRE (O'Grady e cols. 1993; Levine e cols., 1994).

O curso da liberação da CORT logo após o nascimento já foi relatado em vários estudos. Nos primeiros dias de vida há um aumento da esteroidogênese adrenocortical em resposta ao ACTH, que diminui gradativamente entre os PNDs 5 e 6, atingindo o nadir

por volta do DPN 10. No DPN 15 a sensibilidade das adrenais ao ACTH começa a retornar e o animal passa a responder adequadamente ao estresse com um aumento robusto nas concentrações de CORT circulantes a partir do DPN 21 (Nagaya e cols., 1995; Arai & Widmaier, 1991; Okimoto e cols., 2002; Zilz e cols., 1999).

Embora os trabalhos que estudaram a liberação do ACTH e do CRH durante o PHRE não sejam conclusivos em apontar esses hormônios como os principais responsáveis pela hiporresponsividade ao estresse, a maioria dos achados não deixa dúvidas de que as glândulas adrenais apresentam sensibilidade diminuída ao ACTH. Tal fenômeno poderia ser explicado por uma redução na expressão ou pela insensibilidade dos receptores para o ACTH (ACTH-R) presentes nas membranas das células da zona fasciculada do córtex das glândulas adrenais, o que poderia resultar em uma falha na esteroidogênese. O ACTH exerce um papel trófico nas adrenais, sendo que a exposição a este hormônio pode aumentar a expressão dos receptores para o ACTH (ACTH-R) em linhagens de células adrenocorticais (Mountjoy e cols., 1994), além de estimular mecanismos celulares responsáveis pela esteroidogênese (Cavallaro e cols., 1993). De acordo com esses dados, a hiporresponsividade das adrenais poderia ser consequência das baixas concentrações plasmáticas do ACTH durante o PHRE. No entanto, um estudo realizado por Faturi e cols. (2009) mostrou que a administração exógena do ACTH em filhotes, mantidos com as mães durante o PHRE, não foi suficiente para desensibilizar as adrenais durante esse período. Isto evidencia que as baixas concentrações plasmáticas do ACTH durante o PHRE não são o principal fator responsável pela hiporresponsividade das adrenais.

Zilz e cols. (1999) também mostraram que no DPN 10 e no nadir da responsividade do eixo HPA, o aumento exponencial das concentrações do ACTH não leva à liberação crescente da CORT pelas células adrenocorticais. De fato, durante o PHRE não há um aumento significativo na expressão de c-fos nas glândulas adrenais em resposta a um desafio (Okimoto e cols., 2002). Embora essa insensibilidade possa ser atribuída às enzimas esteroidogênicas microssomais que mudam ao longo do desenvolvimento (Nagaya e cols., 1995), o mecanismo responsável por tal fenômeno não está totalmente esclarecido. Com o objetivo de testar se haveria de fato alguma falha no processo da esteroidogênese adrenal, Zilz e cols. (1999) investigaram possíveis alterações na expressão do Receptor Benzodiazepínico Periférico (RBP). Os RBP são altamente expressos em órgãos onde há a esteroidogênese, sendo a função desses receptores facilitar o transporte do colesterol das reservas intracelulares para a membrana mitocondrial interna, onde a ação da enzima P450scc sobre o colesterol dá início ao processo da síntese dos esteróides (Papadopoulos & Borwn, 1995; Gavish e cols., 1999). Neste estudo, constatou-se uma diminuição na expressão do RBP na adrenal de ratos neonatos em comparação com animais adultos. O ACTH atua ativando um ligante endógeno do RBP que facilita a esteroidogênese (Papadopoulos e cols., 1991a; Papadopoulos e cols., 1991b). Quando a expressão do RBP está reduzida, essa função do ACTH fica obviamente prejudicada. Além disso, um estudo sobre a liberação do ACTH durante a vida fetal e o período neonatal, indicou que há uma queda na expressão do ACTH-R próximo ao nascimento, estendendo-se essa redução até a primeira semana de vida. Isso claramente contribui para a insensibilidade das adrenais durante o PHRE (Chatelain e cols., 1989).

Durante o período inicial do desenvolvimento, as concentrações circulantes da globulina ligadora da corticosterona (GLC, Globulina Ligadora de Corticosterona) são baixas. A GLC é uma proteína presente no plasma à qual a CORT se liga com grande afinidade. De acordo com Schroeder & Henning (1989), durante o PHRE apenas 50% da CORT está ligada à GLC, enquanto que no animal adulto essa porcentagem alcança os 90%. Dado que apenas a CORT livre pode se ligar aos seus receptores intracelulares, um pequeno aumento na liberação da CORT poderia ter um grande impacto durante o PHRE, pois estaria livre para atuar nos receptores mineralo- e glicocorticóides (GR) (Rosenfeld e cols., 1992). De acordo com Rosenfeld e cols. (1992), a acentuada redução nas concentrações da CORT no PHRE pode ter um papel fisiológico importante, já que não parece ser conveniente a apresentação de altas concentrações de um hormônio catabólico durante o desenvolvimento (Meyer, 1985). Esses estudos mostraram que há redundância em diferentes mecanismos reguladores da produção e da liberação da CORT, os quais são responsáveis por manter esse hormônio em baixas concentrações. Isso enfatiza a idéia de que o aumento exacerbado dos GCs durante o PHRE pode prejudicar o desenvolvimento normal.

1.2.3 A liberação da CORT durante o PHRE e a privação materna

Inúmeros estudos já mostraram que na ausência da mãe os animais se tornam responsivos ao estresse quando estão no PHRE, pelo que um estímulo que antes não era capaz de provocar aumento nas concentrações plasmáticas da CORT, passa a fazer efeito quando o animal está nessa condição (Stanton e cols., 1988; Suchecki e cols., 1995;

Sutanto e cols., 1996; Smith e cols., 1997; Kent e cols., 1997; van Oers e cols., 1998a; Schmidt e cols., 2004). Entre os paradigmas utilizados para o estudo dos efeitos das manipulações neonatais no eixo HPA está a privação materna (PM), a qual consiste na separação dos filhotes da mãe por 24 horas. Quando realizado durante o PHRE, este procedimento pode interferir permanentemente na resposta neuroendócrina ao estresse, provocando alterações comportamentais capazes de prejudicar as estratégias de defesa frente a um desafio (Ellenbroek & Cools, 2002; Ellenbroek e cols., 1998; Lehmann e cols., 1999).

Van Oers e cols. (1998a) observaram que em ratos com 20 dias de vida, submetidos à privação materna no DPN 3 apresentavam produção exacerbada do ACTH e do CRH, enquanto que a mesma manipulação aplicada no DPN 11 induzia a diminuição nesses parâmetros, em concordância ao que foi observado por Suchecki & Tufik (1997) que relataram haver uma redução nas concentrações plasmáticas da CORT. Portanto é possível que diferentes vias neuronais, que estão em estágios distintos de desenvolvimento, possam regular o eixo HPA durante o processo da ontogênese e resultar no padrão de atividade observado.

O trabalho de Van Oers e cols. (1998a) mostrou também que a PM acarreta alterações específicas, dependendo da idade em que é imposta durante o PHRE. Contudo, ainda não se sabe se as respostas obtidas com animais híbridos Sprague Dawley/Long Evans também podem ser observadas com animais da linhagem Wistar, a qual foi utilizada durante todos os experimentos relatados na presente tese.

Assim, este primeiro experimento teve como principal objetivo esclarecer se as respostas diferenciais da CORT obtidas por van Oers e cols. (1998a), como consequência da PM no 3º e 11º dias de vida, também poderiam ser observadas com a linhagem Wistar disponível no Departamento de Psicobiologia, uma vez que as consequencias neuroendócrinas de outros tipos de manipulações neonatais não foram replicadas nas condições laboratoriais disponibilizadas neste Departamento (Guijarro e cols., 2007; Tiba e cols., 2004 e 2008), possivelmente em virtude das diferenças entre as linhagens utilizadas.

Animais, Materiais, Métodos e Resultados

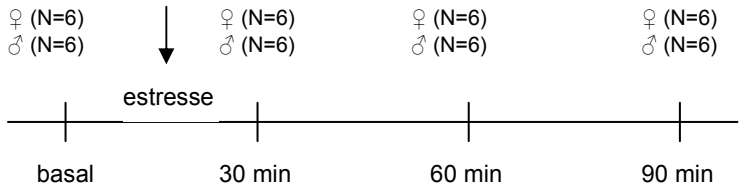
Animais: Ratos Wistar, com 3 meses de idade, provenientes do Biotério do Departamento de Psicobiologia, foram mantidos em gaiolas (30 x 16 x 18 cm) com 4 animais cada, com comida (Nuvilab®) e água à vontade, num ambiente de temperatura controlada (22 $\pm$ 2^{o}C) e ciclo claro-escuro de 12 horas (luzes acesas a partir das 7h00).

Para o cruzamento, duas fêmeas e um macho foram mantidos juntos por um período de 10 dias. Próximo ao nascimento as fêmeas foram alojadas separadamente, permanecendo com os seus filhotes até ao desmame que ocorreu no 21^{o} dia pós-natal (DPN). O dia do nascimento foi denominado DPN 0 e no DPN 1 as ninhadas foram reduzidas para 8 filhotes (4 fêmeas e 4 machos).

Procedimento de Privação Materna: Nos dias 3 (PM 3-4) ou 11 (PM 11-12) do período neonatal os filhotes foram retirados da gaiola moradia, colocados em caixas com serragem da própria gaiola moradia, e transportados para outra sala onde foram colocados sobre uma manta térmica com uma temperatura entre os 30-33°C por 24h. Este procedimento foi realizado sempre na parte da manhã entre as 10:00 e as 11:00 h. Neste experimento os dois grupos que não foram privados das mães (NPM 3-4 E NPM 11-12) foram utilizados como controles dos grupos PM 3-4 e PM 11-12.

Protocolo Experimental: Ao final do período de PM, no 4º ou 12º DPN, ¼ de cada ninhada foi sacrificado em situação basal. O restante da ninhada recebeu uma injeção intraperitoneal (i.p.) de salina hipertônica (3%) no volume de 0,1ml/10g e foram divididos em três grupos que seriam sacrificados 30, 60 ou 90 minutos após a administração. Para

isso, 36 ninhadas, totalizando 288 animais machos (♂) e fêmeas (♀), foram distribuídos em 4 grupos experimentais (NPM4, NPM12, PM3-4 e PM11-12) seguindo o delineamento abaixo.



Dosagem da Corticosterona: As amostras de sangue foram coletadas em tubos Eppendorf contendo EDTA (7,5%) e, em seguida, centrifugados a 2300 rpm durante 20 minutos numa temperatura de 4^{o} C, sendo que após este procedimento o plasma foi extraído e congelado a - 20^{o} C. As concentrações da corticosterona foram determinadas por radioimunoensaio (RIA) com anticorpo específico para ratos e camundongos, utilizando um Kit comercial (ICN Biomedicals, Costa Mesa, CA, USA).

*Análise Estatístic*a. Uma primeira análise estatística foi realizada para verificar se os resultados obtidos com machos diferiam dos resultados obtidos com fêmeas. Dado que a liberação de CORT nesse período do desenvolvimento foi estatisticamente igual, ambos machos e fêmeas foram analisados juntos em cada situação experimental. Os dados foram analisados por ANOVA de 2 vias (Manipulação neonatal [NPM, PM] x Tempo [Basal, 30, 60 e 120 min] após a administração da salina). O teste *a posteriori* utilizado foi o Newman-Keuls e o nível de significância foi estabelecido em $p < 0,05$.

Resultados. De acordo com a ANOVA houve diferença significativa dos fatores Manipulação neonatal ($F_{(3,154)}$=50,45; $p<0,01$) e tempo após a administração da salina

($F_{(3,154)}$=8,18; p<0,01), além da interação entre os dois fatores mostrando que a manipulação neonatal interfere na resposta ao estresse durante o PHRE ($F_{(9,154)}$=3,11; p<0,01). Na figura 1 é possível observar que os animais NPM não apresentaram aumento nas concentrações plasmáticas da CORT após a administração da salina 3%, o que confirma que estes animais estavam durante o PHRE e que a PM afetou os processos fisiológicos responsáveis por mantê-lo. Além disso, o teste a posteriori mostrou que a liberação da CORT do grupo PM3-4 difere do PM11-12 60 e 90 minutos após a administração da salina hipertônica.

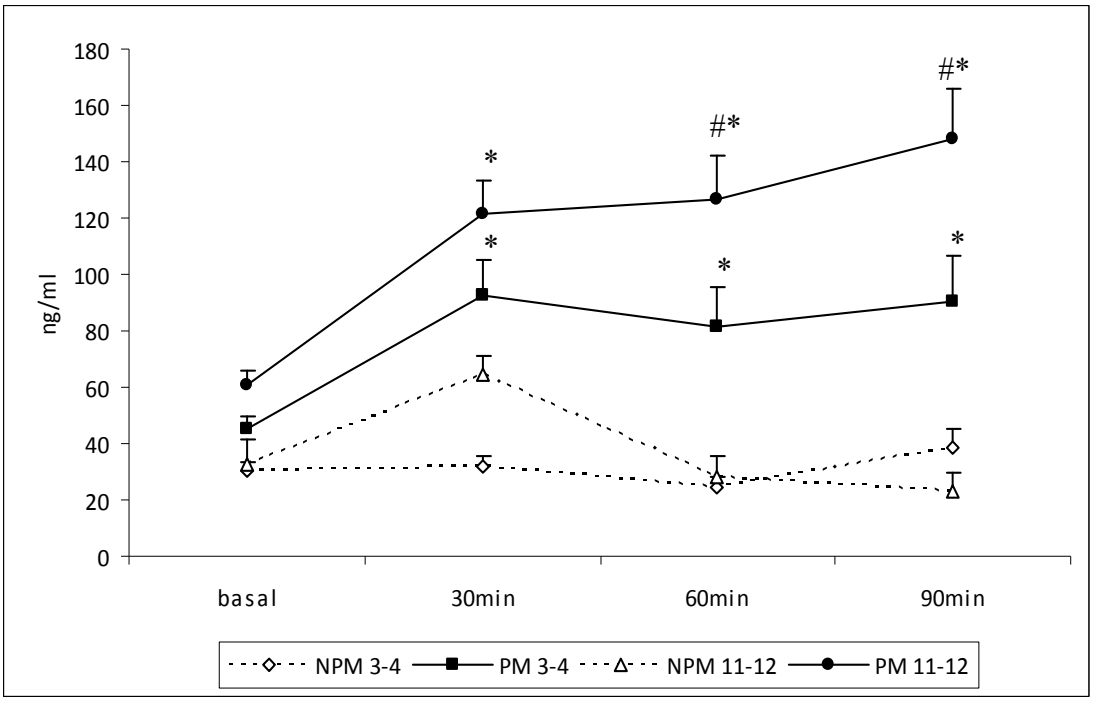


Figura 1. Concentrações plasmáticas da CORT (média±ep) em situação basal (N=12/grupo) e 30 (N=12/grupo), 60 (N=12/grupo) e 90 min (N=12/grupo) depois de administração da salina hipertônica (3%). O grupo PM 3-4 foi privado da mãe do 3º ao 4º dias de vida, enquanto que o PM11-12 foi privado do 11º ao 12º. Os grupos NPM 3 e NPM 11 são os respectivos controles, os quais não foram manipulados em momento algum.

* Valores maiores do que o basal; # - Valores maiores em comparação ao grupo PM3-4 ($p < 0,01$).

Discussão

O aumento pronunciado da CORT após o desafio com a salina hipertônica confirmou a importância da presença materna em inibir a atividade do eixo HPA. Coerentemente, os animais NPM não apresentaram aumento das concentrações da CORT em resposta a esse estressor. Assim, dado que a administração da salina hipertônica não aumentou as concentrações plasmáticas da CORT nos animais mantidos com as mães, confirmou-se que os filhotes de ratos Wistar testados no 4º e 12º dias de vida estavam no PHRE. Embora os valores da CORT basal dos grupos controle (aproximadamente 30 ng/ml) sejam um pouco elevados, ao se comparar com os resultados obtidos por van Oers e cols. (1998a) (aproximadamente 10 ng/ml) deve se levar em conta que a diferença entre as linhagens testadas pode ter contribuído para esse fator.

Os resultados obtidos mostraram que os animais PM não diferiam significativamente dos NPM em situação basal. No entanto, outros estudos mostraram que a PM sozinha é capaz de aumentar significativamente as concentrações da CORT (Smith e cols., 1997; Schmidt e cols., 2004). No protocolo utilizado neste trabalho, a administração da salina provocou um aumento das concentrações da CORT, a qual foi duas vezes maior nos animais PM em relação ao basal. Portanto, a magnitude dessa diferença pode ter mascarado as possíveis diferenças, menos expressivas, entre as concentrações basais de animais PM e NPM.

Outro aspecto importante da resposta ao estresse dos animais PM foi que o grupo PM 11-12 apresentou um aumento da CORT muito mais pronunciado do que o PM 3-4. Este resultado é de certa forma contrastante com os dados da literatura, os quais mostram que o nadir da curva de liberação da CORT acontece entre os dias 10 e 12 de vida, embora esteja de acordo com os obtidos por Levine e cols. (1991a) e Van Oers e cols. (1998a) que observaram o mesmo fenômeno. Segundo Levine e cols. (1991) é possível que os comportamentos maternos tenham um papel mais importante em inibir a liberação da CORT no 12º dia de vida comparativamente ao 3º dia. Assim, embora na presença da mãe o animal esteja no vale da curva de liberação da CORT, na sua ausência o filhote pode apresentar uma resposta neuroendócrina mais robusta do que no início do PHRE, quando outros mecanismos podem agir em consonância com os comportamentos maternos para manter diminuída a responsividade ao estresse (Levine e cols., 1991).

Após quatro horas de PM já é possível observar, em camundongos, o aumento nas concentrações plasmáticas da CORT (Schmidt e cols., 2004). Se o sistema de retroalimentação negativa estivesse funcionando adequadamente, esse aumento sustentado já seria suficiente para interromper a liberação do ACTH, o que não acontece. Em animais adultos, as concentrações plasmáticas do ACTH e da CORT retornam aos valores basais 60 min após o estresse. No entanto, como se observa nos resultados aqui apresentados, as concentrações da CORT não retornaram ao basal nos animais privados, nem mesmo 90 min depois do estresse. De fato, Van Oers e cols. (1998b) constataram que os animais PM, quando comparados com os NPM, apresentavam uma falha no sistema de retroalimentação negativa reativa. Além disso, animais privados das mães por 24h têm

uma diminuição da GLC no plasma, fazendo com que a CORT aumentada pela PM se encontre livre, em sua maior parte, para atuar nos receptores GR (Receptores Glicocorticóides) e MR (Receptores Mineralocorticóides) (Viau e cols., 1996).

De acordo com Schmidt e cols. (2004), o primeiro componente do eixo HPA a ser ativado ao longo da PM é a Pituitária, cujo aumento do ACTH já é detectável após duas horas de PM. No entanto, não se observa um aumento significativo da CORT antes de quatro horas de PM. Curiosamente, o ACTH aumenta a expressão dos seus próprios receptores (ACTH-R) no córtex adrenal (Mountjoy e cols., 1994; Chatelain e cols. 1999). A ativação do ACTH-R, por sua vez, pode provocar o aumento na transcrição dos genes dos enzimas envolvidas na esteroidogênese (Nagaya e cols., 1995). Assim, é possível que o aumento do ACTH durante a PM produza a sensibilização da adrenal, tornando-a responsiva ao estresse durante o PHRE quando a mãe está ausente. Embora a descrição desse mecanismo pareça ser suficiente para justificar a dessensibilização das adrenais em resposta à administração de salina durante a privação materna, os baixos níveis do ACTH circulantes durante o PHRE parecem não ser o principal fator responsável pela manutenção da hiporresponsividade das adrenais nesse período. Suchecki e cols. (1993) mostraram que diferentes comportamentos maternos mantêm as concentrações da CORT e do ACTH baixas durante o PHRE. De acordo com esses dados, a privação de alimento decorrente da PM pode sensibilizar as adrenais, tornando-as responsivas ao estresse, e quando esse comportamento é restaurado artificialmente, as concentrações plasmáticas da CORT voltam a baixar. Além disso, a estimulação anogenital dos filhotes realizada pelas mães nessa fase do desenvolvimento mantém as concentrações do ACTH baixas. Assim, os

diferentes níveis do sistema de estresse podem ser controlados por diferentes comportamentos maternos.

É possível ativar o eixo HPA na ausência da mãe durante o PHRE. Assim, se em um primeiro momento a importância dos cuidados maternos estava relacionada à alimentação e à proteção contra predadores, esses estudos estendem a função dos cuidados maternos para a manutenção da alostase, e como fator essencial para o desenvolvimento adequado. Hofer (1973) e Hofer & Shair (1982) já haviam mostrado que a presença da mãe tem uma função regulatória no desenvolvimento do sistema cardiovascular e do ciclo sono-vigíla. Para De Kloet e cols. (1996), a responsividade diminuída ao estresse, que ocorre em ratos entre os dias 4 e 14 de vida, é decorrente de um sistema regulatório multifatorial, o qual depende de fatores internos (neuroendócrinos) e externos (comportamentos maternos) para manter a quiescência das adrenais.

Alguns estudos utilizaram protocolos em que as ninhadas eram adotadas por uma mãe de linhagens muito ou pouco cuidadosas, a fim de mostrar o impacto do cuidado materno no perfil comportamental do animal adulto. Os resultados mostraram que um cuidado materno pobre pode transformar um animal proveniente de uma linhagem resiliente ao estresse e com baixa emocionalidade em um animal com características exatamente opostas (Prakash e cols., 2006; Holmes e cols., 2005; Anisman e cols., 1998).

Moriceau e cols. (2006b) mostraram que durante o PHRE, até ao 10º dia de vida mais precisamente, os neonatos apresentavam uma alteração importante na percepção de eventos aversivos, período que é chamado de “sensitive period”. Durante esta fase do

desenvolvimento, o animal apresenta preferência, ao invés de aversão, a um determinado odor associado a uma experiência dolorosa, não apresentando ativação da amigdala quando exposto ao condicionamento de medo associado a um odor. No entanto, ao administrar a CORT sistemicamente ou diretamente na amígdala, o animal passa a aprender esse tipo de tarefa e evita o odor associado. Este comportamento é acompanhado por uma ativação da amígdala, o que não acontece em animais não tratados com a CORT (Moriceau e cols., 2006b; Moriceau e cols., 2006a). A idéia de que a ausência materna leva à sensibilização das adrenais e provoca um aumento da CORT em resposta ao estresse durante o PHRE é interessante, uma vez que parece preparar o filhote para enfrentar as adversidades apresentadas pelo ambiente sem contar com a proteção materna. Como parte seguinte deste trabalho, ambos os grupos PM 3-4 e PM 11-12 serão testados na idade adulta, sendo que apenas o primeiro encontra-se no "sensitive period". Assim, é possível que o impacto da PM no início ou fim do PHRE seja diferente em comparação aos animais NPM, uma vez que no PM 3-4 a liberação da CORT, imediatamente após a PM, pode levar a um amadurecimento precoce no sistema que envolve a amigdala no reconhecimento de eventos aversivos.

Os mecanismos celulares e moleculares que medeiam todas essas alterações fisiológicas e comportamentais ainda não foram esclarecidos. No entanto, os efeitos da CORT durante o desenvolvimento já foram descritos. Em ratos, por exemplo, já se observou uma diminuição na mitose e no processo de mielinização, assim como alterações na morfogênese neural (de Kloet e cols., 1988). Populações neuronais, principalmente no sistema límbico, os astrócitos e os oligodendrócitos são alvos dos GCs e

devem mediar os efeitos duradouros conseqüentes da exposição prematura aos mesmos (Meyer, 1985).

CAPÍTULO 2

Alterações duradouras decorrentes da privação materna: participação do eixo HPA

Van Oers e cols. (1998a) já haviam mostrado que a PM durante o PHRE altera a resposta de estresse em animais com 20 dias de vida. Os resultados por eles observados mostraram que os animais PM entre os DPNs 3 e 4 de vida, em comparação aos animais NPM no DPN 11, apresentavam aumento na expressão do CRH e na liberação do ACTH em resposta ao estresse. Este último grupo apresentava uma resposta menor até do que o grupo controle, o qual não fora privado dos cuidados maternos. Coerentemente, Suchecki & Tufik (1997) mostraram que no 30° dia de vida, em comparação com o grupo controle em animais PM no DPN 11, há uma diminuição da liberação da corticosterona em resposta ao estresse. É possível que diferentes vias neurais que estão em diferentes estágios de desenvolvimento no início e no final do PHRE, possam regular o eixo HPA diferencialmente durante o processo da ontogênese, resultando no padrão de atividade observado.

Embora alguns estudos tenham sido realizados para esclarecer os mecanismos subjacentes às alterações observadas na resposta de estresse em neonatos PM (van Oers e cols., 1998c; van Oers e cols., 1998b), nenhum trabalho mostrou se essas alterações em animais com 20 dias de vida poderiam também ser observadas em animais adultos. Além disso, Van Oers e cols. (1998c) observaram uma diminuição na expressão do MR e do GR na região CA1 do hipocampo em animais PM11-12. No entanto, ainda não se sabe se essas alterações permanecem até a idade adulta ou se são apenas uma reação imediata à PM.

A importância dos receptores GR e MR está no fato de que, além de mediarem a resposta de estresse nos vários órgãos e nos sistemas que os expressam, eles são também responsáveis por um mecanismo de regulação intrínseco do eixo HPA, que é o sistema de

retroalimentação negativa, o qual também é conhecido como sistema de “feedback” negativo. Este mecanismo tem a função de promover a alostase por meio da inibição do sistema pelo seu próprio substrato (McEwen & Lasley, 2002). Os receptores MR e GR possuem propriedades e características diferentes, o que justifica as diferentes funções que cada um desempenha na regulação da atividade do eixo HPA (Viau e cols., 1996).

Há dois modos diferentes de funcionamento do sistema de retroalimentação negativa, o proativo e o reativo. O primeiro tem como principal função manter as concentrações basais do ACTH e dos GCs circulantes e, por exemplo, regular as alterações circadianas de liberação dos GCs. Já o segundo é ativado em situações de estresse quando esses hormônios atingem altas concentrações plasmáticas (de Kloet e cols., 1998). O “feedback” proativo ocorre principalmente pela ativação dos receptores MR, a qual apresenta alta afinidade pelos GCs, enquanto que os GR, cuja afinidade é menor, medeiam o “feedback” negativo reativo (de Kloet e cols., 1998; de Koet e cols., 1996).

Essas diferenças de afinidade podem explicar os efeitos bifásicos que os GCs exercem em alguns sistemas fisiológicos. Um exemplo de atividade bifásica dos GCs ocorre sobre os processos envolvidos na aprendizagem e na memória. Alguns estudos mostram que concentrações basais dos GCs, agindo principalmente via MR, facilitam atividades mnemônicas. Por outro lado, altas concentrações desse hormônio, como as resultantes da resposta ao estresse, e portanto mediadas pelo GR, podem prejudicá-las (Oitz e cols., 1994; Diamond e cols., 1992). Neste caso, os efeitos permissivos dos GCs são exercidos pelos MRs, enquanto que a ativação dos GRs medeia os efeitos supressores.

Devido aos altos níveis de expressão do MR e do GR no Hipocampo, esta estrutura,

junto com o Hipotálamo e a Pituitária, formam os três grandes centros de controle do sistema de retroalimentação negativa. A atuação dos GCs junto ao hipotálamo e à Pituitária é conhecida como retroalimentação negativa de alça longa, e a atuação do ACTH junto ao hipotálamo é chamada de retroalimentação negativa de alça curta. Assim, a localização nessas regiões dos receptores MR e, principalmente dos GR, sinaliza para essas estruturas que o sistema já foi ativado com sucesso, e que é necessário reduzir a liberação do CRH e do ACTH, diminuindo consequentemente a liberação dos GCs. Dado o efeito catabólico que os GCs exercem, a inativação do eixo HPA provocada pelo sistema de retroalimentação negativa é fundamental para a manutenção do funcionamento adequado dos diversos órgãos e do sistema nervoso central (SNC). Assim, tão importante quanto a ativação desse sistema frente a um estressor, é o funcionamento adequado do sistema responsável por desativá-lo quando o estímulo não mais se faz presente.

Os MR têm alta afinidade pelos GCs naturais e baixa afinidade pelos sintéticos. Já os GRs têm características quase antagônicas, pois têm baixa afinidade pelos GCs naturais e alta afinidade pelos sintéticos. Dado que os GR são os principais responsáveis pelo "feedback" negativo em situações de estresse, a utilização dos GCs sintéticos é uma estratégia interessante para se testar se o "feedback" negativo reativo está funcionando adequadamente, sendo a Dexametasona (DEXA) amplamente utilizada para este fim (O´Connor e cols., 2003).

Os receptores GR e MR são altamente expressos no hipocampo, o qual, por sua vez, é uma estrutura com grande capacidade plástica. Assim, a exposição crônica às altas concentrações de GCs ou a ineficiência em aumentar a liberação dos GCs em resposta ao

estresse, pode interferir negativamente em processos de plasticidade e diminuir a expressão desses receptores. Uma das consequências deste processo pode ser a redução na eficiência do sistema de "feedback" negativo (de Kloet e cols., 1996). Além de participar da resposta ao estresse do ponto de vista farmacológico, a função clássica dessa estrutura, em termos de mecanismos de aprendizagem e de memória, pode influenciar as estratégias que cada indivíduo adota para se adaptar e responder a eventos adversos ao longo da vida (McEwen, 1997), podendo alterar assim a resiliência ao estresse. Falhas na resposta e na resiliência ao estresse podem resultar em carga alostática e favorecer o adoecimento.

Com efeito, a atividade do eixo HPA está alterada em diversos tipos de transtornos psiquiátricos. Na depressão, alguns estudos têm mostrado que os pacientes apresentam hiperatividade do eixo HPA, evidenciado pelo aumento das concentrações do cortisol na urina, no plasma, na saliva e no líquido cefaloraquidiano (Parker e cols., 2003; Mannie e cols., 2007). Além disto, há relatos da não supressão dos GCs pela DEXA (Sachar e cols., 1973; Carroll e cols., 1981; Rubin e cols., 1987; Amsterdam e cols., 1988; Holsboer e cols., 1995; Kaufman e cols., 1997; Goodyer e cols., 2001; Sher, 2006), mostrando que o mecanismo de retroalimentação negativa do eixo está prejudicado.

É possível que, assim como em humanos, também haja uma relação entre a ocorrencia de eventos adversos em períodos precoces do desenvolvimento e alterações na atividade do eixo HPA em ratos. Por isso, o objetivo da segunda fase do presente trabalho foi analisar a resposta a um estímulo estressor em animais adultos que foram submetidos à PM no 3º ou 11º dia de vida. Além disso, a resposta ao Teste de Supressão à

Dexametasona (TSD) também foi realizado com o objetivo de verificar se esses animais apresentariam alguma alteração no sistema de “feedback” negativo.

Animais, Materiais, Métodos e Resultados

Os animais utilizados nos experimentos a seguir foram submetidos à PM (PM 3-4, PM 11-12), tendo sido testados na idade adulta quando tinham entre 90 e 100 dias de vida. As condições em que os animais foram mantidos e o procedimento do PM foram realizados conforme descrito no capítulo anterior.

Experimento 1. Efeitos prolongados da privação materna na resposta ao estresse

Neste experimento foram estudadas as conseqüências da privação materna na liberação dos hormônios do estresse ACTH e CORT em situação basal, e em resposta ao estresse agudo de administração da salina hipertônica (9%; 1 ml/kg). Este experimento foi realizado entre 10h00 e 12h00.

Para isso, 72 ninhadas foram distribuídas nos três grupos experimentais: NPM (N=51), PM 3-4 (N=47) e PM 11-12 (N=44), tendo somente os machos sido testados nestes experimentos. Em cada grupo experimental os animais foram distribuídos em quatro subgrupos: basal (NPM-N=14; PM 3-4-N=13; PM 11-12-N=13), 10 (NPM-N=10; PM 3-4-N=11; PM 11-12-N=9), 30 (NPM: N=13; PM 3-4: N=11; PM 11-12: N=12) e 60 min (NPM: N=11; PM 3-4: N=12; PM 11-12: N=11) após o estresse). Em cada tempo os animais foram decapitados para coleta de sangue para a determinação das concentrações plasmáticas do ACTH da CORT.

As amostras de sangue foram obtidas por decapitação, coletadas em tubos contendo EDTA, centrifugadas a 2300 RPM, tendo o plasma sido retirado e congelado a -20ºC. A

dosagem da CORT foi realizada por RIA, como descrito no capítulo anterior. A dosagem do ACTH foi realizada por quimioluminescência, utilizando-se anticorpo monoclonal específico para o ACTH (DPC Immulite, Los Angeles, CA, USA).

Análise estatística. Os dados foram analisados por ANOVA de duas vias, com os fatores Grupo (NPM, PM3, PM11) e Tempo (basal, 10, 30 e 60 min após o estresse) como fatores principais. A análise "a posteriori" foi realizada pelo Teste de Newman-Keuls. Em todos os casos, o nível de significância foi estabelecido em $p < 0,05$.

Resultados. A ANOVA de duas vias mostrou que a liberação do ACTH foi influenciada pelos fatores tempo ($F_{(3,130)}$=13,75 p<0,01) e grupo ($F_{(2,130)}$=4,45; p<0,05), mas sem interação entre eles ($F_{(6,130)}$=1,05; p=0,39). O teste "a posteriori" para o fator grupo mostrou que os animais PM 3-4 apresentavam concentrações do ACTH maiores que o grupo PM 11-12 (p<0,05). Em relação ao fator tempo, o pico de liberação do ACTH aconteceu 10 min (p<0,05) após a administração da salina hipertônica, com retorno às concentrações basais aos 60 min (Figura 2).

No que diz respeito às concentrações da CORT, houve tendência à significância pelo fator grupo ($F_{(2,128)}$=2,63; p=0,07) e um claro efeito do fator Tempo ($F_{(3,128)}$=41,42; p<0,01). Assim como o ACTH, o pico na concentração plasmática deste hormônio se deu 10 min após o desafio com a salina hipertônica (Figura 3).

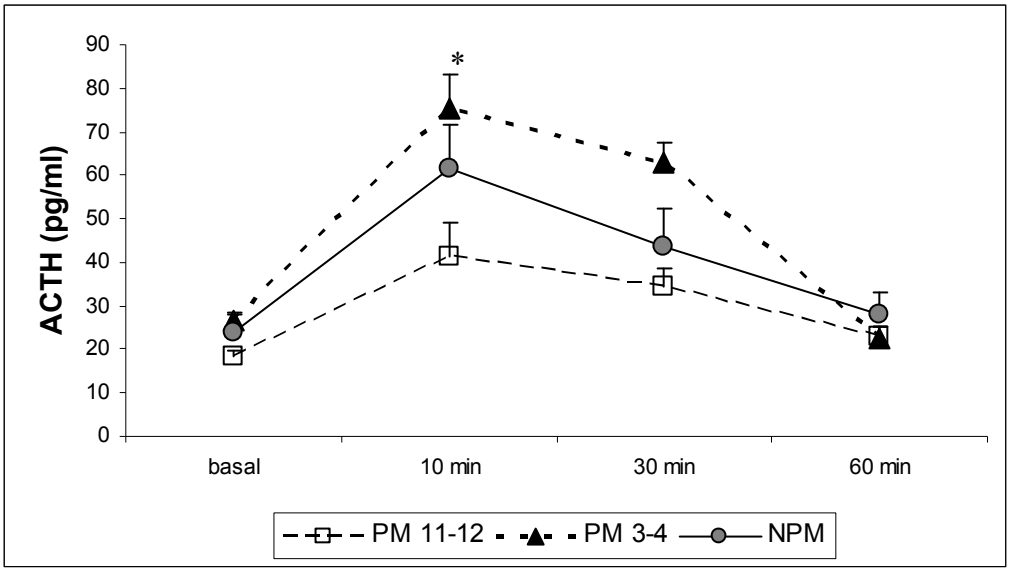


Figura 2. Concentrações plasmáticas de ACTH em resposta à administração da salina hipertonica (9%) de machos adultos submetidos à Privação Materna por 24 h do 3º ao 4º (PM 3-4) e do 11º ao 12º dia de vida (PM 11-12) e do grupo não-privado (NPM). O teste "a posteriori" revelou que as concentrações do ACTH foram significativamente maiores no grupo PM 3-4 do que no PM 11-12.

Dados representados em média+e.p.

* maior que basal e 60 min ($p<0,01$)

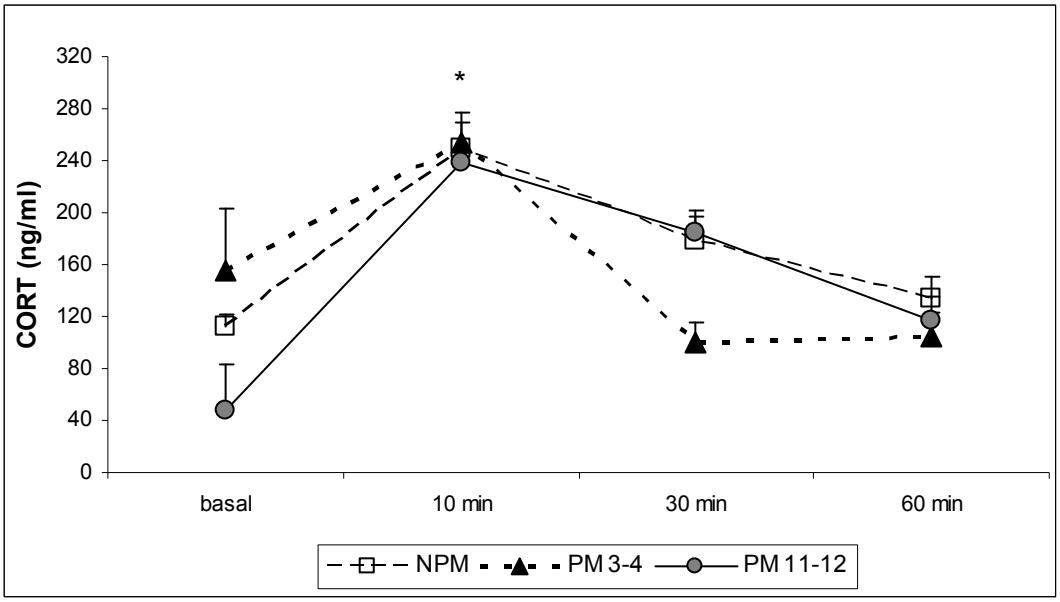


Figura 3. Concentrações plasmáticas de CORT em resposta à administração da salina hipertônica (9%) de machos adultos submetidos à Privação Materna por 24 h do 3º ao 4º (PM 3-4) e do 11º ao 12º dia de vida (PM 11-12), e do grupo não-privado (NPM).

Dados representados em média+e.p.

* maior do que basal, 30 e 60min ($p<0,01$)

Experimento 2: **Efeitos prolongados da privação materna em resposta ao teste de supressão à dexametasona**

Três grupos foram testados, NPM (N=32), PM3-4 (N=32) PM 11-12 (N=32). Para tanto, uma amostra de sangue foi coletada em situação basal na manhã do dia do teste (entre 10:00 h e 10:30 h) e, imediatamente após, a DEXA foi administrada (s.c., doses de 7,5; 15,0 e 30,0 μg/kg, dissolvida em óleo de milho). O grupo controle recebeu uma

administração de óleo de milho no mesmo volume recebido pelos grupos experimentais. Após a administração, os animais permaneceram em suas gaiolas, sem qualquer distúrbio. Novas amostras de sangue foram coletadas às 18:00 h e 20:00 h do mesmo dia e às 8:00 h do dia seguinte conforme já descrito por Lurie e cols. (1989).

Para este experimento o sangue foi coletado por meio de uma pequena incisão na cauda do animal, a qual permitia a obtenção de aproximadamente 50 µl de sangue. Antes que a coleta fosse feita, os animais foram habituados à manipulação por cinco vezes (1 vez ao dia) antes do procedimento ser realizado. As amostras foram coletadas em tubos Eppendorf, contendo uma solução de EDTA a 7,5%. Após a coleta, cuidados com a higiene foram tomados para evitar infecções que poderiam alterar os resultados hormonais. As amostras foram processadas por centrifugação e o plasma separado para a posterior dosagem da CORT, como descrito no capítulo anterior.

Dado que neste experimento as amostras de sangue foram coletadas dos mesmos animais, os dados foram analisados também na forma de área sob a curva (ASC), o que foi realizado de acordo com a fórmula de cálculo da área do trapézio:

(B-A)*(C+D)/2, sendo que:

A e B correspondem aos horários em que as duas dadas amostras foram coletadas, sendo a amostra B obtida após a A.

C e D são as concentrações plasmáticas da CORT das amostras obtidas nos respectivos horários A e B.

Análise estatística. Os dados foram analisados por ANOVA de 3 vias para medidas repetidas, com fatores Grupo (NPM, PM3, PM11), Tratamento (veículo, DEXA 7,5, DEXA 15,

DEXA 30) e Horário (medida repetida: Basal, 18:00 h 20:00 h, 08:00 h). Os dados da ASC foram analisados por ANOVA de duas vias, com os fatores Grupo (NPM, PM3, PM11) e Tratamento (veículo, DEXA 7,5, DEXA 15, DEXA 30). O nível de significância foi estabelecido em $p<0,05$.

Resultados. De acordo com a ANOVA não houve interação entre os três fatores ($F(18,198)=1,24$; $p=0,24$). No entanto, observou-se efeito do fator Tratamento ($F(3,198)=33,11$; $p<0,01$) e Horário ($F(3,198)=13,66$; $p<0,01$). Os resultados mostrados na Tabela 1 confirmam que os animais tratados com veículo, independente da manipulação neonatal a que foram submetidos, apresentaram uma liberação da CORT coerente com o padrão circadiano esperado. Além disso, a DEXA produziu supressão da secreção da CORT em todos os grupos e em todas as doses utilizadas.

Da mesma forma, os dados representados como área sob a curva, analisados por ANOVA de duas vias, também mostraram que a PM não interferiu na liberação da CORT em resposta à DEXA ($F_{(6,84)}=0,12;p=0,99$), mas que houve diferença significativa do Tratamento ($F_{(3,84)}=48,70;p<0,01$), sendo que os grupos tratados com a DEXA apresentaram concentrações plasmáticas da CORT menores do que o grupo tratado com veículo.

Tabela 1. Concentrações plasmáticas da CORT (ng/ml) em resposta ao Teste de Supressão à Dexametasona (TSD) em animais Privados das Mães entre os dias 3 e 4 de vida (PM 3-4) e os dias 11 e 12 (PM 11-12), e animais controle não privados (NPM).

		Basal	18:00 h	20:00 h	8:00 h	AUC
NPM	Veículo	52,2±24,8	252,1±39,1	155,4±16,8	47,9±9,2	284,46±7,82
	7,5 µg/kg	38,9±16,1	36,6±7,5	45,8±17,2	25,1±8,1	80,99±22,81*
	15 µg/kg	73,1±16,2	12,1±2,6	25,3±9,8	17,3±4,9	63,33±10,52*
	30 µg/kg	61,9±18,9	21,4±8,7	17,2±6,2	12,9±3,1	55,19±12,47*
PM 3-4	Vehicle	33,5±08,9	153,5±38,8	177,5±41,9	57,9±11,2	249,09±50,35
	7,5 µg/kg	31,4±12,4	12,5±3,3	24,0±5,1	22,6±13,2	49,16±13,04*
	15 µg/kg	40,7±11,6	10,6±1,7	27,3±9.2	20,7±6,9	53,08±11,82*
	30 µg/kg	37,2±13,0	15,8±6,3	17,9±6,5	19,7±7,9	47,07±12,86*
PM 11-12	Vehicle	46,8±08,3	162,0±29,0	220,8±42,0	38,1±11,7	277,15±34,68
	7,5 µg/kg	42,6±12,3	12,8±4,0	14,8±5,9	28,2±8,4	50,78±8,03*
	15 µg/kg	41,3±16,5	15,2±5,3	22,0±8,3	28,1±9,1	56,30±13,38*
	30 µg/kg	25,7±7,8	19,6±9,0	22,5±9,8	14,1±7,5	44,33±16,82*

O TSD foi realizado com o objetivo de testar a eficiência do sistema de "feedback" negativo nos animais PM, tendo os resultados mostrado que essa manipulação não interferiu na liberação da CORT em resposta à administração da droga.

(*) diferente dos respectivos grupos que receberam veículo.

Discussão

A partir dos resultados obtidos, demonstrou-se que entre os parâmetros que avaliaram a resposta ao estresse, apenas a liberação do ACTH foi influenciada pela PM quando os animais foram desafiados com um estressor físico, a salina hipertônica. O mesmo não se observou com a CORT e o sistema de "feedback" negativo, este último avaliado pelo TSD.

Assim como nos filhotes, as consequências duradouras da PM dependeram da idade em que esse procedimento se deu. Isto indica que, dependendo da fase do desenvolvimento que os animais estão quando são separados de suas mães, a privação dos cuidados maternos pode interferir em processos que ocorrem em diferentes fases da ontogênese, o que deve justificar o aumento da liberação do ACTH nos animais PM 3-4 quando comparados aos PM 11-12 em resposta ao estresse. Estes resultados estão em concordância com os resultados publicados por Van Oers e cols. (1998a) que observaram um aumento nas concentrações plasmátivas do ACTH no grupo PM 3-4 e uma diminuição no grupo PM 11-12, quando comparados com o grupo não privado em animais com 20 dias de vida. Além disso, os dados referentes às concentrações da CORT também foram coerentes com os observados por van Oers e cols. (1998a), ou seja, a privação materna não alterou a liberação da CORT em resposta ao estresse. Já Suchecki & Tufik (1997) observaram diminuição nas concentrações de CORT em animais PM 11-12, mas apenas em fêmeas, e não em machos. Com efeito, parece extremamente adaptativo que mecanismos compensatórios possam manter a resposta das adrenais insensível às

flutuações do ACTH observadas. Não é possível afirmar, contudo, qual mecanismo está envolvido neste processo, mas é possível que haja alterações em receptores ACTH-R ou mudanças na expressão das enzimas esteroidogênicas.

No primeiro experimento apresentado nessa seção, o pico de liberação quer da CORT quer do ACTH ocorreu 10 minutos após a administração da salina hipertônica, sendo que, após 60 minutos, essas concentrações já tinham atingido as concentrações basais. Já no trabalho de van Oers o retorno do ACTH e da CORT as concentrações basais ocorreu apenas 240 minutos após a administração da salina, o que evidencia que o sistema de "feedback" negativo ainda é imaturo no 20º dia de vida.

Embora van Oers e cols. (1998c) tenham mostrado que, em animais PM 11-12 durante o período neonatal, há alteração na expressão dos receptores GR e MR e um prejuízo no sistema de "feedback" negativo reativo em filhotes privados durante o PHRE (Van Oers e cols. 1998b), os resultados obtidos mostraram que, em relação aos não privados na idade adulta, não houve alteração na eficiência do "feedback" negativo de nenhum dos grupos submetidos à privação materna. Assim, é possível que os resultados obtidos nesses dois estudos (van oers e cols., 1998c; Van Oers e cols., 1998b) tenham sido também apenas uma consequência imediata em resposta à privação materna.

Com o objetivo de testar se os diferentes grupos de animais que passaram pela privação materna apresentavam sensibilidade à DEXA alterada, utilizaram-se três doses diferentes dessa droga. Com esse delineamento, a resposta obtida não mostraria apenas se existe ou não escape da CORT na presença da DEXA, mas também se os grupos estudados apresentavam sensibilidade diferente à dose menor, à intermediária e à alta.

No trabalho de Lurie e cols. (1989), várias doses foram testadas e a menor dose efetiva foi de 25µg/kg. A dose de 5µg/kg diminuiu as concentrações da CORT, mas não tão efetivamente quanto a de 25µg/kg. Partiu-se desses dados para determinar com quais doses se esperava o efeito mínimo e máximo, tendo-se optado, respectivamente, pelas doses de 7,5 µg/kg e 30 µg/kg e uma dose intermediária de 15µg/kg, utilizando a mesma via de administração que Lurie e cols. (1989). Em nenhum dos grupos testados foi possível observar uma resposta gradual na supressão da CORT pela DEXA. Um outro fator que pode ter contribuído para as diferenças entre os resultados aqui apresentados e os publicados por Lurie e cols. (1989), é a diferença entre as linhagens dos animais testados, uma vez que é possível que os ratos Sprague-Dawley por eles utilizados tivessem apresentado uma sensibilidade diferente à DEXA.

Com os resultados obtidos é possível afirmar que o sistema de "feedback" negativo está funcionando normalmente nos animais PM no nível periférico, embora não seja possível afirmar o mesmo para o nível central. Miller e cols. (1992) mostraram que a ativação dos GR pela DEXA é menor no tecido central do que no periférico, uma vez que essa droga não atravessa facilmente a barreira hemato-encefálica. Para Miller e cols. (1992) o TSD nao dá informações sobre o sistema de "feedback" negativo exercido pelo hipocampo e pelo hipotálamo, o qual deveria medir prioritariamente a eficiência do "feedback" no nivel hipofisário. No entanto, a DEXA é sim capaz de exercer os seus efeitos sobre o hipotálamo, mas isso só é possível de forma eficiente se os pellets contendo a DEXA forem implantados nas proximidades do PVN (Kováks & Mezey 1987). Além disso, de Kloet e cols. (1974) também concluiram que a Pituitária é o principal local de ação da

DEXA, e que o hipotálamo deve ter pouca importância para a supressão da atividade adrenal no TSD. No presente trabalho apenas a resposta da CORT foi analisada em resposta ao TSD, pois o volume de sangue coletado pela cauda não foi suficiente para realizar a dosagem tanto do ACTH como da CORT. No entanto, de acordo com o primeiro experimento, a PM 3-4 e a PM 11-12 resultam em alterações nas concentrações do ACTH plasmático em resposta ao estresse, sem alteração nas concentrações da CORT. O aumento ou diminuição na liberação do ACTH que não foram acompanhados de alterações na CORT, poderiam estar relacionadas a um prejuízo ou a uma melhora no sistema de "feedback" negativo no nível hipotalâmico. Além disso, o papel do hipocampo no "feedback" negativo e a sensibilidade dos neurônios hipocampais aos glicocorticoides dão suporte à hipótese de que as raízes do funcionamento inadequado do eixo HPA estão no cérebro (Sapolsky 1984, Sapolsky e cols., 1986). Portanto, de acordo com os resultados obtidos, o componente periférico do eixo HPA, mais especificamente o corticoadrenal, não foi significativamente afetado pela PM. No entanto, esses resultados não permitem afirmar que não há falha no nível hipotalâmico e no hipofisário da resposta de estresse.

CAPÍTULO 3

Alterações duradouras decorrentes da privação materna: comportamento tipo ansioso

Alguns estudos mostram a importância de diferentes componentes da resposta ao estresse para o aparecimento de transtornos de ansiedade. Segundo Arborelius e cols. (1999), o aumento do CRH pode estimular a atividade do locus coeruleos, enquanto que as drogas com atividade ansiolítica reduzem a concentração do peptídeo nessa região. Além disso, um aumento do CRH no líquido cefalorraquidiano foi observado em pacientes com o transtorno obsessivo compulsivo, também considerado um transtorno de ansiedade pelo DSM-IV (Altemus e cols., 1992).

Outro transtorno psiquiátrico que apresenta alteração no funcionamento do eixo HPA é o estresse pós-traumático que, diferente da depressão, apresenta uma concentração plasmática de cortisol diminuída, além de "super-supressão" do eixo HPA em resposta ao desafio com a DEXA (Heim e cols., 1997; Yehuda, 1997), o que indica que o mecanismo de retroalimentação negativa está realçado (Shea e cols., 2005).

Segundo Teicher e cols. (2003), a negligência ou os maus tratos no período pós-natal podem eliciar uma cascata de respostas ao estresse que, na idade adulta, resultam em respostas mal adaptadas. Coerentemente, alguns estudos epidemiológicos têm mostrado que experiências adversas na infância podem ser um fator de risco para o desenvolvimento posterior de transtornos psiquiátricos como a depressão e ansiedade (Gutman & Nemeroff, 2003; Nemeroff, 1998), como o estresse pós-traumático (Kessler e cols., 1997; Kendler e cols., 2000; Heim e cols., 2001; Shea e cols., 2005; Tyrka e cols., 2008; Carpenter e cols., 2009; Loman e cols., 2009).

De acordo com Francis & Meaney (1999) e Francis e cols., (1999), um modelo experimental de separação materna por um longo período de tempo em ratos deve

induzir alterações na interação mãe-filhote, análogas à negligência materna em humanos, o que resulta em um fenótipo fisiológico e comportamental alterado. Assim, um estudo mais aprofundado desse modelo poderia esclarecer como as situações adversas ocorridas na infância influenciam os eventos fisiológicos que ocorrem durante o desenvolvimento, trazendo uma importante contribuição para a compreensão das desordens psiquiátricas associadas.

Assim, na tentativa de desenvolver modelos animais mais fidedignos ao quadro que se observa em humanos, vários autores têm estudado a separação materna que ocorre por um período de 3 a 6 horas durante o PHRE. Esses estudos têm observado que esse procedimento provoca um aumento da atividade do eixo HPA acompanhado de alterações no comportamento emocional, condizentes com um aumento de comportamento do tipo-ansioso e do tipo-depressivo (Newport e cols., 2002; Daniels e cols., 2004). Se a PM também pode alterar a atividade do eixo HPA, e em humanos o desenvolvimento de transtornos psiquiátricos está tão estreitamente relacionado com alterações no sistema de estresse, é possível que a PM também leve a alterações no comportamento emocional desses animais.

Entre os modelos utilizados para estudar a emocionalidade, estão os que se propõem a estudar comportamento do tipo-ansioso, como a caixa claro/escuro. Segundo Belzung & Le Pape (1994), a ansiedade não é um fenômeno unitário, sendo possível distinguir dois dos seus principais componentes, a ansiedade-traço e estado. A primeira pode ser considerada uma característica intrínseca do indivíduo, sendo relativamente

estável ao longo do tempo. Já a ansiedade-estado pode variar dependendo de cada situação, sendo por isso transitória (Lister, 1990; Teixeira-silva e cols. 2009).

Spielberger (1983) definiu a ansiedade-estado com um sentimento transitório desencadeado em resposta a situações estressantes que envolvam sentimentos desagradáveis, tensão e apreensão. A ansiedade-traço, por outro lado, é definida como uma característica da personalidade, que pode induzir à ansiedade em situações de estresse. Para Spielberger, quando a ansiedade-traço é alta há um aumento no estado ansioso frente a uma situação de estresse.

Alguns estudos mostram que altos níveis de ansiedade-traço constituem um fator de vulnerabilidade para o aparecimento de transtornos psiquiátricos como, por exemplo, a ansiedade generalizada e a depressão maior (Chambers e cols., 2004). Além disso, fatores genéticos e adversidades em períodos precoces durante o desenvolvimento, são fatores que aumentam a vulnerabilidade ao estresse e que aumentam a probabilidade de desenvolver tais transtornos (Chorpita and Barlow, 1998). Jakovcevski e cols. (2008) observaram que uma determinada linhagem de camundongos “inbred” apresentava uma correlação positiva entre a ansiedade-traço e o estado.

Assim, para melhor caracterizar um modelo animal, a utilização de diversos testes comportamentais pode apresentar um panorama mais detalhado dos seus diferentes aspectos (Ramos et al 2008). Num estudo comparativo, Belzung & Le Pape (1994) utilizaram diversos modelos empregados no estudo da ansiedade experimental e concluiram que no teste da caixa de transição claro/escuro o componente de aversão parece ter uma importância maior que o de atividade exploratória (Misslin & Cigrang,

1986), o que faz dele um bom modelo para se estudar aspectos da ansiedade-estado num modelo experimental.

De acordo com Treit (1985), as reações exibidas quando o animal tem livre acesso à novidade parecem estar mais relacionadas à ansiedade-traço, enquanto que modelos em que os animais são forçados a entrar em contato com a novidade parecem estar relacionados com ansiedade-estado. Com efeito, Teixeira-Silva e cols. (2009) mostraram que o paradigma de exploração livre, que apresenta exatamente as características discutidas por Treit (1985), parece ser capaz de detectar o traço ansioso, pois os animais conservam o mesmo perfil comportamental após exposições repetidas ao modelo.

Ainda não se sabe se as alterações no eixo HPA decorrentes da privação materna nos dias 3 ou 11, observadas em ratos neonatos e adolescentes e adultos (como mostrado no experimento anterior), têm repercussão no padrão comportamental na idade adulta, como já visto com outros tipos de manipulações realizadas no período neonatal (Ellenbroek & Cools, 2002; Ellenbroek e cols., 1998; Lehmann e cols., 1999; Caldji e cols., 2000).

Assim, no presente experimento, o perfil comportamental dos ratos submetidos à privação materna foi avaliado em testes de comportamento tipo-ansioso (traço e estado) para se testar se as alterações observadas na resposta ao estresse tinham consequências comportamentais.

Animais, Materiais, Métodos e Resultados

Ratos machos adultos (3 e 4 meses de idade) foram testados após terem sido submetidos à PM do DPN 3 ao 4 (N=12), do DPN 11 ao 12 (N=9) ou NPM (N=12). As condições em que os animais foram mantidos e o procedimento de PM foram realizadas como descrito nos capítulos anteriores.

Cada animal foi exposto aos dois aparatos, sendo que o Paradigma de Exploração Livre foi realizado primeiro e, após um período aproximado de 7 dias, os animais foram testados na Caixa de Transição Claro/Escuro.

3.1 Paradigma da Exploração Livre

Aparatos e protocolo experimental. O Paradigma de Exploração Livre foi desenvolvido por Hughes (1968), sugerindo alguns autores que este seja um teste que avalia a "ansiedade-estado" (Calatayud e cols., 2004). O aparato consiste de uma caixa dividida em dois compartimentos de dimensões iguais (60 X 20 cm), divididos por uma porta basculante, em que um desses compartimentos é denominado de familiar e o outro de não familiar. O primeiro contém água, ração e maravalha, ficando o outro vazio. Cada um desses compartimentos é subdividido em outros três compartimentos iguais (20 X 20 cm), de modo que o número de cruzamentos entre uma subdivisão e outra é uma medida de atividade ambulatória (Figura 4).

A B

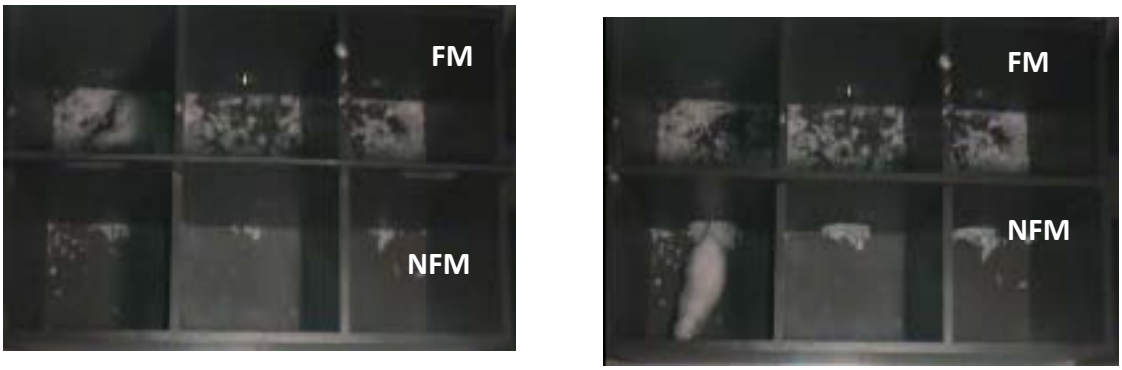


Figura 4. Foto do aparato utilizado para o experimento do Paradigma da Exploração Livre. Na parte de cima das figuras está o compartimento familiar (FM) e na inferior o não familiar (NFM). A figura "A" mostra o aparato quando a porta deslizante ainda está fechada. Já na figura "B" a porta foi retirada e o animal pode explorar o ambiente novo livremente.

O procedimento consistiu em colocar o animal no compartimento familiar no início do período noturno (19h30), com serragem da própria gaiola moradia, água e comida à vontade, onde permaneceu por um período de 24 h para habituação. Passado este período o teste comportamental foi iniciado. No teste, a porta basculante foi retirada e o animal pode explorar livremente o compartimento não familiar. O número de vezes que o animal entrou e o tempo que despendeu no compartimento não familiar, os comportamentos de avaliação de risco e o comportamento de levantamento no compartimento não familiar, foram registrados por um período de 15 minutos.

Os testes comportamentais realizados em ambos os aparatos foram analisados por meio de um sistema automatizado (Anymaze, Stoelting Co., Wood Dale, Illinois, USA),

tendo apenas a categorização comportamental do experimento Paradigma de Exploração Livre sido realizada manualmente.

Coleta de sangue. Um dia antes de cada um dos experimentos comportamentais, foram feitas coletas de sangue para determinar as concentrações basais da CORT. O Paradigma de Exploração Livre foi realizado no período noturno, portanto a amostra basal foi coletada às 19h30 do dia anterior no início do teste comportamental. Para o experimento com a Caixa de Transição Claro-Escuro, o qual foi realizado no período diurno, a coleta de sangue para a avaliação das concentrações basais foi realizada às 10h00 do dia anterior ao teste comportamental. Passados 20 min após o final de cada um dos testes, mais uma coleta de sangue foi obtida para determinar as concentrações da CORT após o estresse. Após o Paradigma de Exploração Livre essa coleta também foi realizada pela incisão na cauda e, após a Caixa de Transição Claro-Escuro, os animais foram sacrificados, tendo sido o sangue coletado diretamente do tronco.

Análise estatística. Os dados comportamentais de ambos os experimentos foram analisados por ANOVA de uma via. Já os dados hormonais foram analisados por ANOVA de duas vias para medidas repetidas, com os fatores Grupo (NPM, PM3, PM11) e Tempo (basal e 20 min após o teste comportamental). Nos dois casos utilizou-se o teste "a posteriori" de Newman-Keuls quando necessário, tendo o nível de significância sido estabelecido em $p < 0,05$.

Resultados. Neste experimento, além de se analisar os parâmetros de tempo e número de visitas ao compartimento não-familiar, realizou-se uma categorização

comportamental mais detalhada. Contudo, nenhum dos comportamentos avaliados diferiu entre os grupos NPM, PM3 e PM11 (Tabela 2).

Corticosterona: A ANOVA mostrou que não houve interação entre os fatores grupo e o Tempo ($F_{(2,24)}$=0,70; p=0,51). Além disso, o fator Tempo apresentou apenas tendência à significância ($F_{(1,24)}$= 3,63; p=0,07). Os resultados da CORT obtidos foram também analisados na forma de área sob a curva (ASC), que confirmou que a PM não afetou a liberação da CORT em resposta a este teste comportamental ($F_{(2,24)}$= 0,14;p= 0,87; Tabela 3).

Tabela 2. Análise do comportamento tipo-ansioso pelo Paradigma da Exploração Livre realizado no período noturno. Entre os grupos testados estavam animais Privados das Mães entre os dias 3 e 4 de vida (PM 3-4; N=12) e os dias 11 e 12 (PM 11-12; N=9), e animais controle não privados (NPM; N=12).

	NPM	PM 3-4	PM 11-12
% Tempo gasto no compartimento não familiar	27,23 ± 5,34	34,00 ± 2,39	28,94 ± 3,63
Número total de quadrados cruzados no compartimento não familiar	45,25 ± 9,85	51,50 ± 5,67	42,33 ± 7,63
Freqüência de comportamento de levantar no compartimento familiar	13,33± 3,52	16,08 ± 2,65	11,22 ± 1,85
Freqüência de comportamento de levantar no compartimento não familiar	28,16 ± 6,22	32,00 ± 3,9	22,22 ± 3,36
% Tempo de comportamento de auto-limpeza no compartimento familiar	6,58 ± 3,94	4,88 ± 1,63	5,14 ± 1,95
% Tempo de comportamento de auto-limpeza no compartimento não familiar	1,70 ± 0,64	2,41 ± 1,36	1,13 ± 0,75

A Privação Materna não afetou nenhum dos parâmetros comportamentais analisados neste teste comportamental. Os dados estão apresentados como média ± e.p.

Tabela 3. Concentrações plasmáticas de CORT (ng/ml) antes e depois do Paradigma de Exploração Livre de animais Privados das Mães entre os dias 3 e 4 de vida (PM 3-4; N=12) e os dias 11 e 12 (PM 11-12; N=9), e animais controle não privados (NPM; N=12). O teste comportamental e as amostras de sangue foram coletadas durante o período noturno.

	Concentrações basais de CORT	Concentração de CORT 20 min após o teste	Área sob a Curva
NPM	211,43 ± 14,52	237,56 ± 14,82	4518,50 ± 213,80
PM 3-4	186,34 ± 17,44	255,49 ± 32,84	4600,85 ± 469,47
PM 11-12	223,59 ± 18,53	229,85 ± 18,94	4752,53 ± 93,56

A ANOVA não mostrou diferença entre os grupos. Valores expressos como média ± e.p.

3.2 Teste da Caixa de Transição Claro/escuro

O aparato consiste em uma caixa de acrílico (48x24x27cm) dividida por uma barreira com uma abertura que permite ao animal transitar entre os dois compartimentos de iguais dimensões. Um dos compartimentos é escuro e não iluminado, enquanto que o outro possui paredes na cor branca e é iluminado com uma lâmpada de intensidade de 60 lux (figura 5). Durante o procedimento, o animal é colocado no compartimento claro de frente para a abertura. Após passar pela primeira vez para o compartimento escuro, o comportamento do animal é observado durante 5 minutos. Os parâmetros analisados foram o número total de transições entre os dois compartimentos e o tempo gasto no compartimento claro.

Resultados. A porcentagem de tempo gasto no compartimento claro foi diferente entre os grupos ($F_{(2,31)}$=3,61; p<0,05), sendo que o grupo PM 11-12 apresentou maior porcentagem de tempo no compartimento claro quando comparado ao NPM (figura 1;

p<0,05). O grupo PM 3-4 foi apenas marginalmente diferente do grupo NPM (p=0,067). Não houve diferença entre os grupos no número de entradas no compartimento claro (figura 6).

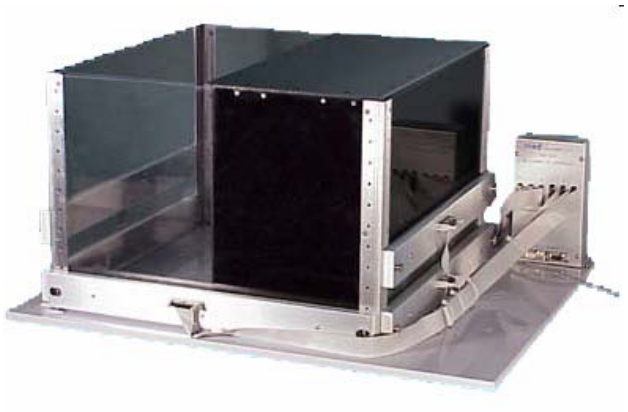


Figura 5. Exemplo de aparato usado no teste da Caixa de Transição Claro/Escuro.

Corticosterona: A ANOVA mostrou que não houve interação entre os fatores grupo e a medida repetida da CORT neste experimento ($F_{(2,31)}$= 0,06; p=0,94). A exposição dos animais ao teste comportamental alterou a liberação da CORT ($F_{(1,31)}$= 171,99; p<0,01), sendo que as concentrações plasmáticas foram significativamente maiores após o estresse. Semelhante ao que foi observado no PEL, quando as concentrações da CORT foram analisadas na forma de área sob a curva (ASC), também não houve efeito da PM ($F_{(2,31)}$=0,71;p= 0,50; tabela 4).

Tabela 4. Concentrações plasmáticas da CORT (ng/ml) antes e depois do Teste da Caixa de Transição Claro/escuro. Os animais testados foram Privados das Mães entre os dias 3 e 4 de vida (PM 3-4; N=12) e os dias 11 e 12 (PM 11-12; N=11), e animais controle não privados (NPM; N=12).

	Concentrações basais de CORT	Concentração de CORT 20 min após o teste	Área sob a Curva
NPM	37,06±10,53	237,57±26,43	2702,85 ±333,8
PM 3-4	27,44±5,31	217,83±28,06	2452,67 ± 283,6
PM 11-12	46,31±11,25	249,42±22,44	2957,25 ± 289,2

A ANOVA não mostrou diferença entre os grupos (média±erro padrão).

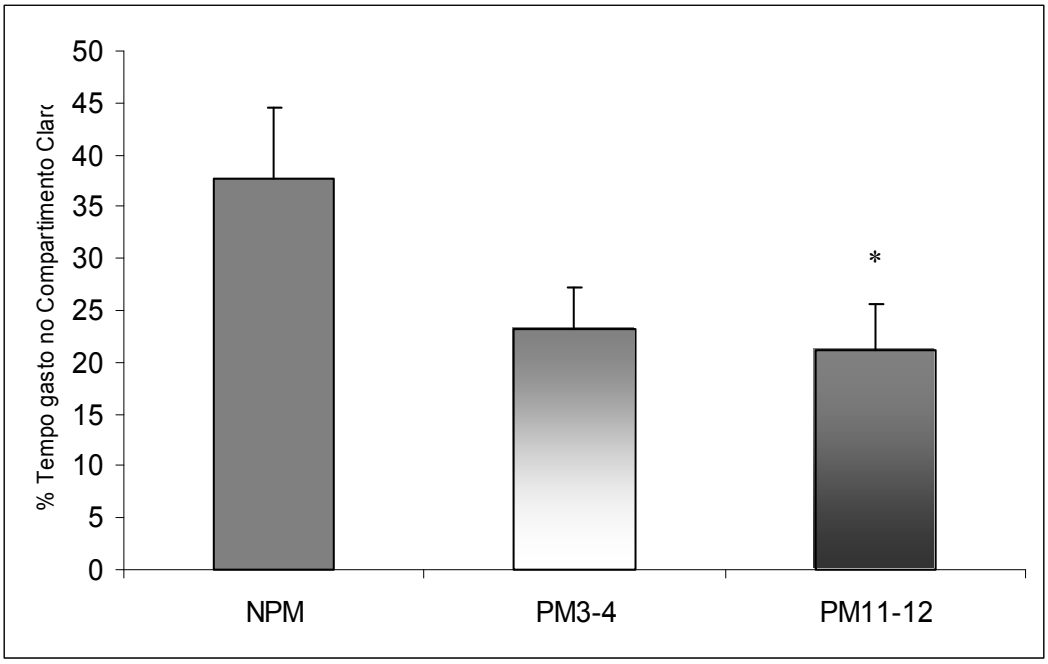


Figura 6. Porcentagem de tempo gasto no Compartimento Claro no Teste da Caixa de Transição Claro/Escuro (média ± ep de X-Y animais/grupo). O grupo PM 3-4 foi privado da

mãe do 3º ao 4º dia de vida (N=12), enquanto que o PM11-12 foi privado da mãe do 11º ao 12º (N=11). O grupo NPM não foi manipulado em nenhum momento (N=12).

*p<0,01 em relaçao ao grupo NPM.

Discussão

Muitos trabalhos que estudaram os efeitos de manipulações neonatais durante o PHRE observaram que o grupo que apresentava maiores níveis de ansiedade era também o que apresentava as maiores concentrações plasmáticas de CORT (Greisen e cols., 2005; Kalinichev e cols., 2002). No entanto, no presente trabalho a PM não acarretou em alterações na liberação da CORT em nenhum dos grupos estudados. Suchecki & Tufik (1997) observaram diminuição nas concentrações da CORT em animais submetidos à PM no DPN 11, sendo esses resultados mais claros e evidentes em animais com 30 dias de vida do que em adultos jovens com 60 dias. Talvez esses dados mostrem que, conforme o processo de maturação do sistema de estresse vá se completando, o impacto da PM sobre o componente periférico corticoadrenal do eixo HPA seja gradualmente atenuado, a ponto de não se observar diferença em animais adultos como os aqui testados.

A maioria dos estudos, cujo objetivo é compreender como o estresse influencia o aparecimento de transtornos psiquiátricos, focam o papel dos GCs em mediar esse processo. Um dos objetivos do presente trabalho foi testar um modelo de manipulação neonatal que, de acordo com a literatura (Suchecki & Tufik, 1997; van Oers e cols., 1998a), poderia levar a alterações na resposta ao estresse. No entanto, as alterações esperadas nas concentrações plasmáticas da CORT em animais privados dos cuidados maternos não se confirmaram, fosse em resposta a um estressor físico ou psicológico. Mesmo não havendo alterações na liberação da CORT, a hipótese de que a PM poderia afetar o perfil

comportamental dos animais se confirmou com os resultados obtidos com o Teste da Caixa Claro/Escuro.

O teste da Caixa de Transição Claro/Escuro e Caixa de Exploração Livre são modelos que avaliam aspectos diferentes do comportamento do tipo ansioso. O paradigma de exploração livre tem a ambulação como um componente importante entre as medidas comportamentais, mas apresenta uma característica diferente da Caixa de Transição Claro/Escuro. Nesse modelo experimental, o animal é habituado em uma parte do aparato e, caso apresente um perfil ansioso muito exacerbado, ele tem a opção de não explorar o ambiente novo e permanecer no lado que lhe é familiar. Já o teste da Caixa Claro/Escuro é um teste de conflito entre a curiosidade de explorar o ambiente novo e o desconforto experimentado ao fazê-lo, pois a parte clara do aparato é bem iluminada e esses animais preferem os ambientes escuros. A principal diferença entre os dois é que o comportamento apresentado no primeiro parece ser mais estável em exposições repetidas (Teixeira-Silva e cols., 2009), o que permite considerar a hipótese de que este seja um modelo de ansiedade traço.

O tempo gasto no compartimento claro pelo grupo PM 3-4 foi apenas marginalmente diferente do grupo NPM, mas se mostrou igual ao grupo PM 11-12, o que permite afirmar que a PM afetou o comportamento do tipo ansioso de ambos os grupos, independente da idade em que foi realizada. Embora os trabalhos de Moriceau e cols. (2006a,b) tenham levado a considerar a possibilidade de que os animais PM 3-4 e PM 11-12 poderiam ser afetados diferencialmente pela PM, os resultados não corroboraram esta hipótese. Mas ainda é possível que, em ambos os grupos PM, as alterações

comportamentais na idade adulta aqui observadas possam ter sido consequência de mecanismos fisiológicos diferentes. Assim, o resultado observado no PM 3-4 poderia ser consequência do amadurecimento precoce dos circuitos neurais envolvendo a amígdala na resposta de medo, dado que está no "sensitive period", enquanto que no grupo PM 11-12 um outro mecanismo estaria envolvido no aumento do comportamento tipo-ansioso.

Os resultados aqui obtidos relativos ao comportamento do tipo ansioso do grupo PM 11-12 contradizem um estudo anterior de Suchecki e cols. (2000) o qual relatou redução nesta característica quando medida pelo teste do campo-aberto. Neste estudo os animais, machos e fêmeas, submetidos à privação materna no DPN 11 apresentaram menos comportamento de auto-limpeza e mais visitas ao círculo central do campo-aberto do que os do grupo controle (Suchecki e cols., 2000). A diferença entre os testes comportamentais utilizados e as idades nas quais os animais foram testados (90 dias no presente trabalho e 30 no trabalho de Suchecki e cols., 2000) podem justificar as diferenças observadas.

Alguns estudos clínicos mostram que um indivíduo com maior traço ansioso pode apresentar um aumento de vulnerabilidade para ansiedade generalizada, a qual experimentalmente pode ser testada por modelos que permitem investigar o estado ansioso do animal, como a caixa claro/escuro. Goes e cols. (2009) também observaram que não havia concordância entre o traço ansioso e o estado ansioso nos animais testados. Este estudo utilizou o labirinto em cruz elevado como o paradigma que testa a ansiedade e de acordo com esses autores, talvez os modelos utilizados para testar o equivalente à

ansiedade estado em humanos não avaliem exatamente o que se propõe a avaliar em animais de laboratório.

Em nenhum dos testes foi possível estabelecer diferenças na resposta do eixo HPA nos animais PM, ou seja, todos os animais apresentaram aumento da secreção de corticosterona em resposta aos testes comportamentais, mas este aumento não foi diferente entre os grupos.

O primeiro experimento, que avaliou as concentrações do ACTH e da CORT em resposta à administração da salina hipertônica, mostrou que apenas a liberação do ACTH é influenciada pela PM, mas não a da CORT. A resposta do ACTH não foi avaliada em resposta aos testes comportamentais, pois o volume de sangue obtido pela cauda não foi suficiente para realizar as duas dosagens, mas as alterações comportamentais observadas mostram que é possível que o eixo HPA esteja alterado no nível central da resposta ao estresse. Embora não haja estudos relacionando a influência do ACTH no comportamento emocional, é possível que as alterações observadas no experimento que utilizou a salina hipertônica como estressor reflitam as alterações havidas nos níveis centrais da AVP, do CRH e da POMC.

No grupo PM 3-4 é possível que o aumento na liberação do ACTH tenha sido conseqüência de um aumento na liberação do CRH e da AVP. Há trabalhos mostrando que o aumento na liberação destes peptídeos no PVN pode estar relacionado à ansiedade (Hoelsboer & Ising 2008; Wigger e cols., 2004).

Por outro lado, o grupo PM 11-12, que apresentou diminuição do ACTH, pode ter apresentado esse resultado em consequencia da diminuição da AVP e do CRH. Assim, o

aumento dos níveis de ansiedade observado no grupo PM 11-12 poderia ser mediado por outro componente da resposta ao estresse, como a pro-opiomielanocortina. Embora não se tenha medido as concentrações desse pró-hormônio, sabe-se que este é o precursor da β-E e do ACTH. É possível que a redução do ACTH denuncie também uma diminuição nas concentrações da β-E no grupo PM 11-12, substância que também pode regular os níveis de ansiedade (Grisel e cols., 2008; Sher, 1998). Com efeito, Drolet e cols. (2001) mostraram que problemas na regulação do sistema dos opióides endógenos podem contribuir para transtornos relacionados ao estresse e ansiedade.

CAPÍTULO 4

Conseqüências da Privação Materna na ligação do flunitrazepam ao sítio alostérico Benzodiazepínico do receptor $GABA_A$

. O sistema de neurotransmissão GABAérgico é o principal sistema inibitório do SNC, e um prejuízo no seu funcionamento está envolvido na etiologia dos transtornos de humor e de ansiedade (Barnard, 1998; Brambilla e cols., 2003; Tunnicliff and Malatynska, 2003). A melhora na função do mesmo pode resultar em atividade anti-depressiva e ansiolítica, além de diminuição da atividade do eixo HPA (Thoeringer e cols., 2009). Assim, drogas que realçam o funcionamento desse sistema, têm sido amplamente utilizadas, pois elas minimizam as sensações negativas subjetivas e comportamentais características dos transtornos ansiosos.

O neurotransmissor ácido aminobutírico (GABA) exerce os seus efeitos pela sua interação com três tipos de receptores: $GABA_A$, $GABA_B$ e $GABA_C$, sendo que o primeiro é um receptor inotrópico e medeia a neurotransmissão inibitória mais rápida do SNC (Fritschy & Brunig 2003). Além do GABA, outras substâncias, como os benzodiazepínicos (BZD), os barbitúricos, os neuroesteróides, o álcool e os anestésicos, podem modular a atividade deste receptor (Reddy & Kulkarni, 1996; Purdy e cols., 1991; Sieghart, 1995; Fritschy & Brunig 2003). Tais substâncias agem em sítios alostéricos acoplados ao complexo $GABA_A$, que, ao serem ocupados, aumentam a afinidade deste pelo ligante natural, aumentando conseqüentemente a probabilidade do canal iônico se abrir em resposta a este neurotransmissor (Mohler e cols., 2002; Kaplan and DuPont, 2005).

Entre as drogas com atividade ansiolítica que agem no receptor $GABA_{A,}$ os BZD formam o grupo mais importante do ponto de vista clínico, uma vez que se popularizaram como a droga de escolha para o tratamento de distúrbios de ansiedade, como a ansiedade generalizada. Isto certamente se deu devido à propriedade de melhorar o quadro clínico

da doença num curto espaço de tempo (Graeff, 1999), além de serem uma droga segura, uma vez que a diferença entre a dose efetiva e a dose letal é maior do que a observada em barbitúricos, os quais eram largamente utilizados antes da descoberta dos BZD (Graeff, 1999).

O $GABA_A$ é composto por 5 subunidades agrupadas em torno de um canal central íon-condutor, o qual é aberto quando duas moléculas de GABA ou um outro agonista se ligam a ele (Lambert e cols., 2003). As subunidades que o compõe (γ1-4;β1-4;α1-6;θ;ε;ρ1-3;δ;π) são codificadas por, no mínimo, 16 genes diferentes (Barnard e cols., 1998). Além disso, o RNAm das subunidades α6, β2 e γ2 pode sofrer "splicing" para incluir e omitir seqüências de aminoácidos, produzindo versões de cadeia longa (L, do inglês Long) ou curta (S, do inglês Short).

A composição do receptor $GABA_A$ mais abundante no SNC contém as subunidades α1, β2 e γ2, o que equivale à metade dos receptores $GABA_A$ nas diferentes regiões do cérebro (Lambert e cols., 2003). Embora essa seja a composição mais comum, a multiplicidade de receptores que pode ser formada com tal variedade de subunidades é muito maior do que a de qualquer outro canal iônico. Com efeito, alterações nas subunidades que compõe o receptor $GABA_A$ podem conferir ao mesmo uma afinidade diferente a um mesmo ligante.

Os receptores $GABA_A$ que apresentam sítio alostérico para os BZD são formados por subunidades α1, α2, α3, ou α5, uma das subunidades β e a subunidade γ2, estando presentes em 75% to total de receptores $GABA_A$ do cérebro (McKernan & Whiting, 1996). Já os receptores que contém as subunidades α4 e α6 têm afinidade reduzida por esse

ligante (Hadingham e cols., 1996; Wafford e cols., 1996; Wisden e cols., 1991). Apesar dos diferentes tipos de BZD apresentarem uma afinidade relativamente similar pelos receptores $GABA_A$ compostos pelas subunidades α (Heldt & Ressler, 2007), já se observou que os seus efeitos comportamentais não são os mesmos. A subunidade α2, por exemplo, está distribuída por todo cérebro, mas está presente principalmente nos circuitos neuronais que medeiam a atividade ansiolítica dos BZD. Já a subunidade α1 está presente nos circuitos envolvidos em sua ação sedativa (Mohler e cols. 2002), ao passo que a α5 está localizada em regiões responsáveis pelos seus efeitos nos processos mnemônicos (Glykys & Mody, 2006; Glykys e col., 2008).

Alterações na expressão do receptor $GABA_A$ também podem ocorrer como conseqüência de fatores epigenéticos. A metilação do DNA é considerada uma interface entre os mecanismos ambientais dinâmicos e o código genético (Szyf, 2003). Poulter e cols. (2008) observaram que, em indivíduos que cometeram suicídio e que apresentavam histórico de depressão maior, o gene que codifica a subunidade α1 havia sofrido metilação em várias regiões do cérebro. Caldji e cols. (2000) mostraram que a separação materna diária, por 3 h, durante as duas primeiras semanas de vida, produz alteração na expressão do receptor $GABA_A$ condizente com o aumento nos níveis de comportamento do tipo ansioso. Esses trabalhos reforçam a hipótese de que eventos adversos durante o desenvolvimento poderiam provocar alterações na expressão de subunidades que compõem o receptor $GABA_A$.

Um estudo realizado por Barbosa Neto (2007) mostrou que há diminuição nas concentrações do GABA no hipocampo de animais PM 11-12, indicando que este sistema

de neurotransmissão é permanentemente afetado pela PM. Assim, considerou-se a hipótese de que alterações na expressão do sítio para o BZD nos receptores $GABA_{A,}$ em diferentes estruturas do sistema límbico, também poderiam trazer alguma contribuição para explicar o resultado comportamental observado com o Teste da Caixa de Transição Claro/Escuro. Assim, o objetivo do experimento que segue neste capítulo foi estudar o efeito da PM sobre a ligação do flunitrazepam marcado no sítio BZD do receptor $GABA_A$.

Animais, Materiais, Métodos e Resultados

Os animais utilizados nos experimentos de autorradiografia foram submetidos à PM (PM 3-4, PM 11-12 ou NPM), tendo sido testados quando tinham entre 3 e 4 meses de idade (N=8/grupo).

Processamento histológico. Os animais foram decapitados e, em seguida, os encéfalos foram rapidamente removidos, congelados em gelo seco e mantidos a -80ºC. Os encéfalos foram seccionados em criostato (-18ºC) da região do bulbo olfatório até ao bulbo caudal, em secções de 20 µm de espessura, com intervalos de 400 µm, para que o processamento histológico pudesse ser realizado. Os cortes frontais foram coletados em lâminas revestidas com gelatina, tendo sido guardadas em um freezer (-80ºC) até o dia da realização do ensaio "in vitro".

Marcação de [^{3}H] flunitrazepam. Para a marcação de sítios BDZ, as lâminas contendo os cortes frontais de encéfalo foram pré-incubadas por 30 min em solução tampão Tris (50mM; pH 7,0; à 0-4ºC) contendo 3nM de [^{3}H] flunitrazepam (81,37 Ci/mmol, Perkin Elmer). Após o período de incubação as lâminas foram lavadas em tampão a 0-4ºC e, em seguida, em água deionizada a 0-4ºC. Depois de secas, as secções foram expostas a um filme sensível ao trítio (kodak BioMax MR1, Amersham Pharmacia Biotech) por 6 semanas na presença de padrão calibrado ^{14}C.

Análise densitométrica. O software MCID System (Imaging Research Inc., St Catharines, ON) foi utilizado para quantificar a densidade de marcação do filme pelo trítio. As estruturas foram identificadas de acordo com o atlas de Paxinos & Watson (1997),

sendo que de quatro a cinco leituras de uma mesma estrutura foram realizadas para cada encéfalo estudado. A média dessas leituras em μCi/g de tecido compunha uma amostra de determinada estrutura de um encéfalo.

Análise estatística. Os dados foram analisados por ANOVA de uma via, com fator grupo (NPM, PM 3-4, PM 11-12), e o nível de significância foi estabelecido em $p<0,05$.

Resultados. A privação materna não influenciou a densidade dos sítios BZD nos receptores $GABA_A$ em quaisquer das regiões analisadas (tabela 5; figura 7).

Tabela 5. Densidade de marcação do filme pelo trítio (µCi/g). Três grupos experimentais foram analisados, tendo dois deles sido privados das mães do dia 3 ao 4 (PM 3-4) do 11 ao 12 (PM 11-12), e um terceiro grupo foi mantido com as mães (NPM).

	NPM	PM 3-4	PM 11-12
CeA	1,11 ± 0,03	1,15 ± 0,05	1,23 ± 0,12
BMA	1,75 ± 0,05	1,73 ± 0,05	1,82 ± 0,11
BLA	1,79 ± 0,04	1,85 ± 0,04	2,02 ± 0,08
LA	2,05 ± 0,05	2,13 ± 0,05	2,18 ± 0,04
MeA	1,72 ± 0,06	1,72 ± 0,06	1,86 ± 0,62
BST	1,09 ± 0,04	1,15 ± 0,04	1,18 ± 0,12
DM	1,18 ± 0,06	1,09 ± 0,15	1,27 ± 0,46
LH	0,89 ± 0,04	0,89 ± 0,04	0,88 ± 0,10
DGV	2,15 ± 0,04	2,12 ± 0,05	2,28 ± 0,13
CA1V	1,77 ± 0,04	1,67 ± 0,07	1,84 ± 0,14
PVN	1,09 ± 0,06	1,15 ± 0,05	1,14 ± 0,08

Valores expressos em Média ± erro padrão. Abreviações: Núcleo Central da Amígdala (CeA); Núcleo Basomedial da Amígdala (BMA); Núcleo Basolateral da Amígdala (BLA); Núcleo Lateral da Amígdala (LA); Núcleo Medial da Amígdala (MeA); Núcleo Intersticial da Estria Terminal (BST); Núcleo Dorsomedial do Hipotálamo (DM); Hipotálamo Lateral (LH); Giro Denteado Ventral (DCV); CA1 Ventral (CA1V); Núcleo Paraventricular do Hipotálamo (PVN).

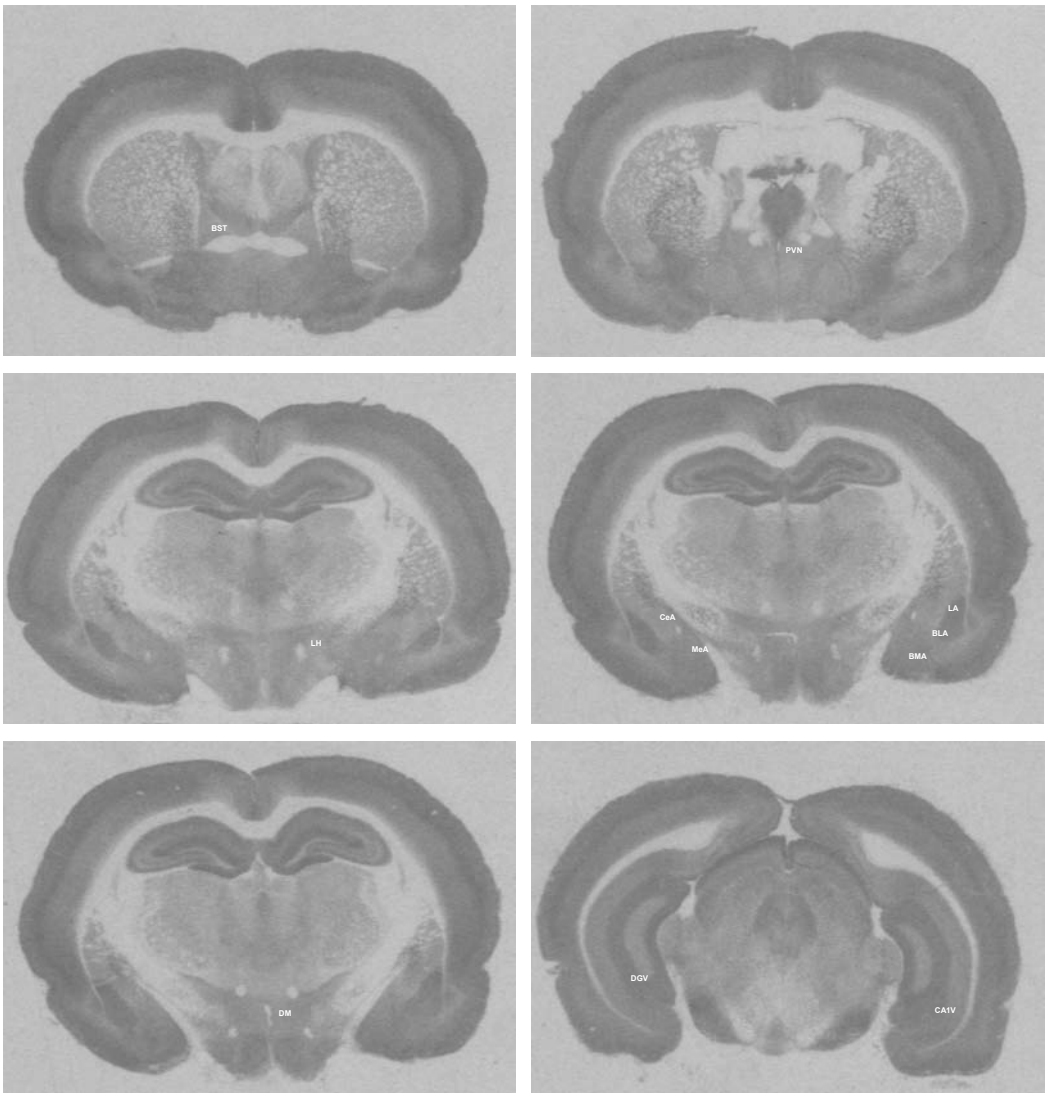


Figura 7. Fotos das seções em que a leitura das estruturas de interesse foi realizada. Abreviações: Núcleo Central da Amígdala (CeA); Núcleo Basomedial da Amígdala (BMA);

Núcleo Basolateral da Amígdala (BLA); Núcleo Lateral da Amígdala (LA); Núcleo Medial da Amígdala (MeA); Núcleo Intersticial da Estria Terminal (BST); Núcleo Dorsomedial do Hipotálamo (DM); Hipotálamo Lateral (LH); Giro Denteado Ventral (DCV); CA1 Ventral (CA1V); Núcleo Paraventricular do Hipotálamo (PVN).

Discussão

Os resultados obtidos mostraram que a PM não interferiu na ligação do flunitrazepam aos sítios alostéricos para o BZD em nenhuma das regiões estudadas, regiões que estariam potencialmente envolvidas no comportamento do tipo-ansioso.

De acordo com o trabalho de Jacobson-Pick e cols. (2008), um evento estressor na adolescência somado à exposição a um teste comportamental na idade adulta pode alterar a expressão das subunidades α1, α2 e α3 do receptor $GABA_A$. Contudo, os autores não observaram o mesmo resultado quando o animal fora estressado apenas na adolescência, o que indica que a exposição ao estresse precoce era somada ao estresse na idade adulta para provocar a alteração observada. Essa alteração de expressão de subunidade modificou também a resposta comportamental de ansiedade aos diferentes tipos de BZDs.

Os animais utilizados para o presente experimento foram submetidos unicamente à PM, tendo permanecido intactos até à idade adulta, quando foram sacrificados para a retirada dos encéfalos utilizados no ensaio "in vitro". De acordo com o protocolo experimental utilizado para estudar o comportamento do tipo-ansioso, os animais foram primeiro testados no Paradigma de Exploração Livre e, alguns dias após, foram testados na Caixa de Transição Claro/Escuro. Os resultados mostraram que não houve diferença entre os grupos no primeiro teste, tendo havido, no entanto, no segundo. É possível que um fenômeno semelhante ao observado por Jacobson-Pick e cols. (2008) tenha ocorrido,

e que alguma alteração na ligação dos receptores BZD tenha sido provocada pela exposição ao primeiro teste comportamental, o que realçaria o papel da PM em alterar o comportamento tipo-ansioso. Dado que os animais utilizados para o experimento de autorradiografia não receberam uma segunda manipulação, talvez as alterações na ligação dos receptores BZD não tenham sido tão evidentes.

A ausência de diferença para o sítio do BZD do receptor $GABA_A$ entre os grupos PM no experimento de autorradiografia, não encerra a discussão sobre o envolvimento desses receptores no perfil ansioso dos animais. A droga marcada radioativamente utilizada, o flunitrazepam, se liga aos sítios alostéricos para o BZD, mas não marca outros receptores $GABA_A$ que não apresentem tal sítio. Um estudo utilizando mucimol marcado radioativamente, poderá confirmar se há alteração na expressão total do $GABA_A$. Além disso, processos de fosforilação de resíduos de aminoácidos de subunidades específicas, também podem alterar a afinidade do receptor pelos seus ligantes endógenos (Poisbeau e cols., 1999; Harney e cols., 2003). Assim, outros estudos moleculares precisam ser realizados para que se tenha uma visão mais global da participação dos receptores $GABA_A$ na gênese das alterações comportamentais observadas.

O teste da Caixa de Transição Claro/Escuro também já se mostrou sensível às drogas que atuam no sistema de neurotransmissão serotonérgico. Alterações na neurotransmissão serotonérgica (Sillaber e cols., 2008; Andrade & Graeff, 2001), assim como a manipulação farmacológica dos diversos receptores serotonérgicos (Delgado e cols., 2005; Costall e cols., 1993; Griebel e cols., 1992), mostraram que esse sistema modula o comportamento do tipo ansioso nesse modelo experimental. Assim, uma

investigação desse sistema também poderia esclarecer se o mesmo está envolvido nas alterações comportamentais decorrentes da PM.

DISCUSSÃO GERAL

Os maus tratos e as experiências adversas vividas na infância e adolescência são comumente associados com alterações comportamentais e transtornos psiquiátricos (Teicher e cols., 2003). Segundo Pryce (2005), o meio externo pode influenciar o desenvolvimento de alterações comportamentais tanto em primatas quanto em roedores, podendo estes dar origem a modelos animais particularmente úteis para compreender os mecanismos neurobiológicos subjacentes aos transtornos psiquiátricos.

Os modelos animais devem ser validados de acordo com os critérios que mostrem semelhanças com o quadro clínico observado em humanos. Considerando que a proposta do presente estudo foi a de validar a privação materna como um modelo animal de vulnerabilidade a doenças psiquiátricas, mais especificamente o comportamento do tipo-ansioso, o mesmo se concentrou nos critérios de validade etiológica e de construção, sendo que ambos estão altamente relacionados. De acordo com o primeiro, as características observadas no modelo e no transtorno apresentam a mesma etiologia e, de acordo com o segundo, os processos neurobiológicos subjacentes à seriam os mesmos em humanos e no modelo animal (Andreatini e cols., 2006).

De acordo com os resultados obtidos, a PM durante o PHRE poderia ser considerada um fator etiológico comum de vulnerabilidade entre o modelo estudado e o que se observa em humanos. Os resultados mostraram que a PM leva a um aumento da CORT em resposta ao estresse no período neonatal, acontecendo o mesmo com as crianças no primeiro ano de vida em momentos em que o seu cuidador é pouco atencioso (Gunnar & Donzella, 2002). O aumento dos GCs durante essa fase do desenvolvimento

também foi descrita como sendo um fator potencialmente importante para alterar o desenvolvimento normal do SNC em humanos (Gunnar, 1998).

Os experimentos realizados com animais adultos mostraram que a PM leva a conseqüências permanentes no que diz respeito ao comportamento tipo-ansioso. Além desses resultados, alguns dados não publicados obtidos neste laboratório indicam que as alterações comportamentais se estendem também para o comportamento tipo-depressivo, confirmando a idéia de que a ansiedade desempenha um papel central na gênese das emoções negativas (Chorpita & Barlow, 1998). Assim, é possível que tais alterações no padrão comportamental reflitam uma diminuição geral na resiliência ao estresse, reforçando então a idéia de que a PM possa ser um modelo de vulnerabilidade para transtornos psiquiátricos de acordo com o critério de etiologia.

A validação de modelos animais, segundo o critério de construção, depende da elaboração de teorias sobre os processos fisiológicos subjacentes ao transtorno estudado (Andreatini e cols., 2006). Este certamente representa o maior desafio para os pesquisadores empenhados no estudo de modelos animais para transtornos psiquiátricos, uma vez, que na clínica, o diagnóstico dos mesmos é determinado por conjuntos de sintomas clínicos e não por endofenótipos (DSM-IV). Os endofenótipos são marcadores biológicos característicos de uma determinada doença e, embora a sua utilização seja uma prática corriqueira na maioria das áreas da medicina, poucos endofenótipos são descritos para auxiliar ao diagnóstico de transtornos psiquiátricos (Gould & gottesman, 2006). Além disso, eles seriam uma peça chave para determinar o grau de hereditariedade dos

transtornos psiquiátricos, o que permitiria um diagnóstico precoce e início do tratamento tão logo os primeiros sintomas se manifestassem (Flint & Monafo, 2007).

Dado que a diminuição da resiliência ao estresse está classicamente envolvida no aparecimento de transtornos psiquiátricos (Southwick e cols. 2005; Swaab e cols. 2005; Tyrka e cols., 2009), diversos trabalhos passaram a estudar a atividade do eixo HPA em indivíduos deprimidos e ansiosos, constatando alterações nas concentrações plasmáticas dos GCs, assim como mudanças na eficiência do sistema de retroalimentação negativa (Handwerger, 2009). Com isso, vários autores passaram a propor que esses elementos fossem considerados endofenótipos, os quais poderiam complementar os critérios diagnósticos determinados pelo DSM-IV (Mello e cols., 2007; Mannie e cols., 2007). O estudo da atividade do eixo HPA, e mais especificamente a liberação dos GCs, foi, portanto, um dos focos do presente estudo.

Os resultados obtidos em animais privados das mães evidenciam que os GCs não medeiam as alterações comportamentais observadas. A atividade do eixo HPA foi estudada tanto em resposta a um estressor físico, quanto em resposta a um psicológico, e os resultados mostraram que o eixo HPA parece não estar comprometido no nível das adrenais. O mesmo foi observado para o TSD, mostrando que a PM, em quaisquer dos dois dias em que foi realizada, não diminuiu nem realçou o sistema de “feedback” negativo.

Segundo Gould & Gottesman (2006), um bom candidato a um endofenótipo em psiquiatria envolveria a expressão de poucos genes, apresentaria poucos níveis de interação entre eles e deveria resultar, preferencialmente, da ativação de um único

circuito neuronal. Embora o início da resposta hormonal de estresse se dê principalmente no PVN, com a liberação do CRH, o tipo de estímulo estressor pode ser processado de diferentes maneiras antes de ativar essa estrutura e influenciar a resposta de estresse periférica de diferentes formas. Assim, a ativação das adrenais, resultando na produção e na liberação dos GCs parece não preencher adequadamente esses requisitos, pois:

1) A ativação do sistema de estresse pode acontecer por diferentes vias neurais de acordo com a natureza do estressor (Herman e cols., 1997 e 2003);

2) Após a interpretação do estímulo aversivo feita pelo SNC a liberação dos GCs depende:

a) da ativação adequada do PVN do hipotálamo e da liberação da AVP e do CRH;

b) da expressão dos receptores para essas substâncias na Pituitária;

c) da ativação desses receptores e da conseqüente liberação do ACTH;

d) da expressão dos receptores para o ACTH nas adrenais;

e) da expressão adequada das enzimas esteroidogênicas responsáveis pela síntese dos GCs;

f) além disso, a atuação dos GCs e a manifestação dos seus efeitos depende também da expressão dos receptores GR e MR na periferia e no SNC.

Assim, embora os GCs sejam os marcadores biológicos mais acessíveis da atividade do eixo HPA, é possível que etapas anteriores também tenham um papel importante na gênese da ansiedade e da depressão. O CRH, por exemplo, é conhecido por sua atividade ansiogênica e depressora em modelos animais (Holsboer & Ising, 2008), mas em estudos clínicos só é possível medir a sua liberação no líquido cefalorraquidiano. Os resultados

obtidos com um estressor físico, a salina hipertônica, mostraram uma alteração significativa nas concentrações plasmáticas do ACTH nos animais PM, podendo esse resultado ter sido reflexo de alterações no sistema CRHérgico.

Além desses critérios, alguns autores acreditam que a explicação biológica completa de um determinado fenômeno também requer a compreensão das suas causas evolutivas (Tinbergen, 1963 *apud* Nesse, 1999). Os resultados mostram que o cuidado materno pode garantir um desenvolvimento neonatal normal, sendo que a importância do cuidado materno parece ter sido mantida ao longo da evolução. O comportamento humano também apresenta essa dimensão quando se leva em consideração a importância do cuidado parental, assim como das relações sociais saudáveis com outros cuidadores.

De acordo com Nesse (1999), o estudo das causas evolutivas de determinada característica pode ser importante para determinar as diferenças entre o que é normal e o que é patológico. Segundo ele, a depressão, por exemplo, teria um papel adaptativo extremamente relevante. A persistência em tentar atingir um determinado objetivo pode ser uma experiência frustrante se o indivíduo não apresenta as características físicas ou intelectuais que lhe permita atingir esse objetivo. A frustração decorrente do insucesso pode ser importante para sinalizar que muito tempo e energia estão sendo despendidos em prol de um objetivo que nunca será alcançado, mostrando que uma mudança de estratégia ou de objetivo é necessária. Mas esse mesmo sentimento pode atingir um nível patológico em um outro contexto. Isto também acontece com o medo e a ansiedade. Ambos são importantes para preparar o organismo para uma situação potencialmente ameaçadora, mas se essa capacidade for de alguma forma realçada, como parece ser o

caso da PM, ela pode alcançar níveis patológicos, preparando o organismo para responder a uma ameaça quando o estímulo é na verdade inócuo.

As conclusões de Moriceau e seus colaboradores (Moriceau e cols., 2006a,b) indicam que o aumento dos GCs durante o PHRE pode tornar os filhotes precocemente capazes de distinguir estímulos aversivos de não-aversivos. Essa parece ser uma estratégia extremamente adaptativa, pois na falta da proteção materna o filhote se torna apto a distinguir um estímulo ameaçador, podendo, portanto, evitá-lo. No entanto, os resultados aqui obtidos evidenciam que, no bojo dessas alterações que parecem ser extremamente benéficas, aparecem conseqüências que podem ser pouco adaptativas, como o aumento permanente dos níveis do comportamento do tipo-ansioso. Dada a importância da amígdala em mediar o comportamento emocional, é possível especular que esta estrutura esteja envolvida com as alterações emocionais observadas em pessoas que vivenciaram eventos traumáticos em períodos precoces do seu desenvolvimento.

CONCLUSÕES

Em resumo, os resultados mostraram que:

1) A liberação da CORT em filhotes da linhagem Wistar apresenta o mesmo padrão de atividade do eixo HPA do que os animais híbridos Sprague-Dawley/Long Evans utilizados nos primeiros estudos sobre os efeitos da PM durante o PHRE.
2) Não há alteração na liberação da CORT em resposta a um estressor físico em animais PM, mas a PM 11-12 diminui a liberação do ACTH ao passo que a PM 3-4 a aumenta. Embora este resultado pudesse ter ocorrido em decorrência de uma falha no sistema de retroalimentação negativa, o presente trabalho mostrou que a PM não leva a alterações nesse sistema quando avaliado pelo teste de supressão à DEXA.
3) Embora a PM não tenha provocado alterações consistentes na liberação da CORT, levou a alterações comportamentais na idade adulta. Apesar do paradigma de exploração livre não ter detectado nenhuma diferença entre os grupos, o teste da Caixa Claro/Escuro mostrou que os animais PM11-12 apresentam mais comportamento tipo-ansioso do que os não privados das mães. O grupo PM 3-4 foi apenas marginalmente diferente do grupo controle.
4) O experimento de autorradiografia não mostrou diferença em nenhuma das regiões analisadas, mas ainda resta saber se a expressão dos receptores GABA-A que não apresentam o sítio BZD está alterada para que a participação desses receptores seja excluída da etiologia das alterações comportamentais observadas.

Conclusões

Os resultados obtidos mostraram que a PM 3-4 e PM 11-12 levam à alterações comportamentais, e que tais alterações não são acompanhadas de alterações consistentes na liberação de CORT, e de mudanças no sítio BZD do receptor $GABA_A$ em regiões límbicas do SNC.

ANEXO 1

Pareceres do Comitê de Ética

São Paulo, 19 de janeiro de 2007.
CEP 1332/05

Ilmo(a). Sr(a).
Pesquisador(a) DEBORAH SUCHECKI
Co-Investigadores: Claudia de Brito Faturi
Disciplina/Departamento: Psicobiologia da Universidade Federal de São Paulo/Hospital São Paulo
Patrocinador: CAPES.

PARECER DO COMITÊ DE ÉTICA INSTITUCIONAL

Ref: Projeto de pesquisa intitulado: **"Alterações na responsividade ao estresse e produção de esteróides neuroativos decorrentes da privação materna: uma avaliação das possíveis diferenças entre machos e fêmeas".**

CARACTERÍSTICA PRINCIPAL DO ESTUDO: Estudo experimental agudo e crônico em ratos wistar.
RISCOS ADICIONAIS PARA O PACIENTE: não se aplica.
OBJETIVOS: Realizar a caracterização neuroendócrina de ratos wistar que sofreram privação materna no início ou no fim do SHRP(período hiporresponsivo da adrenal), o que inclui as possíveis alterações no eixo HPA(hipotálamo-hipófise-adrenal), alteração da produção periférica e central dos esteróides neuroativos, tanto no período neonatal quanto na idade adulta..
RESUMO: Anestésico: ketamina; eutanásia: decapitação. Serão realizadas quatro fases de estudo, sendo que todas serão inicialmente compostas por animais submetidos à privação materna no 3º dia de vida(PM3), no 11º dia de vida(PM 11) e outro grupo sem nenhuma manipulação neonatal (CTL), todos os grupos compostos por animais de ambos os sexos. Na primeira fase do estudo serão estudadas as conseqüências da privação materna nos níveis de esteróides neuroativos e na produção dos hormônios do estresse em situação basal e em resposta a um estresse agudo de administração intraperitoneal de salina no período neonatal, procedimento realizado imediatamente após a privação materna.Para isso 18 ninhadas, totalizando 144 animais, distribuídos nos 3 grupos experimentais (CTL, PM3 e PM11) serão divididos em 4 tempos(basal, 30 min, 60 min e 120 min após o estresse). Amostras de sangue serão coletadas após a decapitação para dosagens de aloP, aloTHDOC, DHEA e DHEAS e ACTH e corticosterona. No experimento 2,no período de adultos, serão submetidos ao estresse de restrição por 2 horas; para isso 48 ninhadas, totalizando 384 animais serão distribuídosnos 3 grupos experimentais (CTL, PM3 e PM11) e divididos tambem em 4 tempos. Após serem decapitados, serão colhidas amostras de sangue para dosagens hormonais, e coletados os cérebros e os esteróides neuroativos dosados, sendo que as fêmeas serão avaliadas no ciclo estral.Nos experimentos 3, 4 e 5 ao atingirem a fase adulta, os animais serão submetidos à cirurgia de canulação da veia ilíaca para dosagens plasmáticas e após a recuperação da cirurgia, os animais serão submetidos a testes comportamentais e as amostras de sangue serão coletadas seguindo o mesmo modelo do experimento 2, ou seja, basal, após 10, 30, 60 minutos do teste comportamental.Para cada experimento comportamental serão utilizadas 15 ninhadas distribuidas nos 3 grupos, totalizando 20 machos e 10 fêmeas na fase de diestro e 10 fêmeas na fase de estro. No experimento 3 será realizado o modelo experimental Labirinto em Cruz Elevado; no Experimento 4, o teste de natação forçada para caracterização do comportamento dos animais neste modelo; no experimento 5, modelo de condicionamento de medo ao contexto do comportamento de congelamento; 7 dias antes do experimento de condicionamento, os animais serão submetidos a uma avaliação da atividade locomotora no Campo Aberto. Os resultados serão analisados de acordo com as variáveis estudadas.
FUNDAMENTOS E RACIONAL: Modelos experimentais em animais com privação materna no período de hiporresposividade adrenal podem ser um instrumento útil para a compreensão de como eventos no período precoce do desenvolvimento podem levar às alterações comportamentais e na atividade do eixo hipotálamo-hipófise-adrenal, na idade adulta.
MATERIAL E MÉTODO: descritos os procedimentos experimentais que serão realizados por equipe especializada.
DETALHAMENTO FINANCEIRO: CAPEs R$ 253 230,00.
CRONOGRAMA: 36 meses.
OBJETIVO ACADÊMICO: doutorado.
ENTREGA DE RELATÓRIOS PARCIAIS AO CEP PREVISTOS PARA: **14/1/2008** e **8/1/2009**.

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

São Paulo, 22 de setembro de 2006
CEP 1192/06

Ilmo(a). Sr(a).
Pesquisador(a) DEBORAH SUCHECKI
Co-Investigadores: Eric Eiji Kawamoto, Claudia de Brito Faturi
Disciplina/Departamento: Psicobiologia da Universidade Federal de São Paulo/Hospital São Paulo
Patrocinador: AFIP.

PARECER DO COMITÊ DE ÉTICA INSTITUCIONAL

Ref: Projeto de pesquisa intitulado: **"Teste da supressão da dexametasona em animais submetidos à privação materna por 24 horas".**

CARACTERÍSTICA PRINCIPAL DO ESTUDO: experimental, categoria C.
RISCOS ADICIONAIS PARA O PACIENTE: não se aplica.
OBJETIVOS: tendo em vista que a privação materna pode alterar o funcionamento do eixo hipotálamo-hipófise-adrenal(HPA), o objetivo do trabalho é utilizar o tese de supressão da DEXA para avaliar o funcionamento do sistema de retroalimetnação negativa em animais privados da mãe no 3º ou 11º dia de vida. Serão avaliadas as concentrações plasmáticas de ACTH e CORT em resposta ao desafio ocm a DEXA..
RESUMO: Estudo com 192 ratos Wistar. Eutanásia: decapitação. Haverá utilização de material radiativo, apresentando parecer do núcleo de proteção radiológica.Os grupos experimentais serão compostos por animais submetidos à privação materna no 3º dia de vida, no 11º dia de vida ou não -submetidos à manipulação neonatal. A coleta de sangue será realizada por meio de pequena incisão na causa do animal, para coleta seriada. Uma amostra de sangue será coletada ás 10:00 horas e logo após será administrada a DEXA via subcutânea nas doses de 0,005; 0,01 e 0,025 mg/Kg. Novas amostras de sangue serão coletadas ás 18:00, 19:00 e 20:00 horas do mesmo dia e às 8:00 horas do dia seguinte. Serão dosados corticosterona por radioimunoensaio e ACTH por quimioluminescência..
FUNDAMENTOS E RACIONAL: Estudo avaliando o efeito da privação materna por 24 horas, no teste de supressão da dexametasona. Estudos pré-clínicos indicam que manipulações precoces no período de hiporresponsividade ao estresse, como a privação materna por 24 horas em ratos, causam alterações no eixo HPA, que assemelham-se ás alterações observadas em inúmeras psicopatologias, como a depressão e o transtorno de estresse pós-traumático.
MATERIAL E MÉTODO: Descreve os procedimentos a serem realizados.
DETALHAMENTO FINANCEIRO: AFIP - R$ 25 145,00.
CRONOGRAMA: 12 meses.
OBJETIVO ACADÊMICO: graduação.
ENTREGA DE RELATÓRIOS PARCIAIS AO CEP PREVISTOS PARA: **17/09/2007** e **11/09/2008**.

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

ANEXO 2

Estágio de Doutorado Sanduíche na Universidade de Dundee,

Escócia

RECEPTORES GABAERGICOS EXTRASINÁPTICOS: UM IMPORTANTE ALVO DE AÇÃO PARA OS NEUROESTERÓIDES

Plasticidade sináptica no hipocampo

O hipocampo é a principal estrutura envolvida na associação de determinados eventos com o local em que ocorreram, além de ser importante para a localização espacial de objetos. Quando essas funções foram caracterizadas, o hipocampo passou a ser reconhecido como um mapa cognitivo do SNC (Spiers e cols., 2001; Maguire e cols., 1999; Moscovitch e cols., 2006; Rosenbaum e cols., 2000).

Os tipos de células e a organização dos sistemas neurais presentes no hipocampo apresentam características bastante particulares. Os neurônios hipocampais são facilmente cultiváveis *in vitro,* além de apresentarem uma grande capacidade plástica. As conseqüencias de tal plasticidade incluem mudanças nas propriedades, na localização e no número de receptores, alterações nas dimensões das células e no comprimento axonal, além do aumento ou da diminuição na arborização dendrítica. Os processos de Depressão de Longo Prazo ("Long-term depression [LTD]) e Potencialização de Longo Prazo ("Long-term potentiation [LTP]) são algumas das possíveis mudanças na neurotransmissão sináptica decorrentes dessa capacidade plástica. Embora a LTP e a LTD aconteçam na maioria das sinapses excitatórias do SNC e, por isso, possam ser observadas em várias estruturas, elas têm sido mais estudadas na região em que foram descobertas, o hipocampo (Bliss e cols. 2007). Por ser uma estrutura conhecida por sua participação nos

processos de aprendizagem e de memória, a hipótese de que este seria um mecanismo celular subjacente a processos mnemônicos foi logo aventada (Andersen e cols. 2007).

No que diz respeito à organização dos sistemas neurais presentes no hipocampo, um dos aspectos chave das conexões é a unidirecionalidade. Assim, cada região da formação hipocampal projeta para a região vizinha, mas não recebe aferências da região para a qual projeta. A comunicação entre as principais estruturas do hipocampo ocorre por três vias: 1) via Perforante: liga o córtex entorrinal ao giro denteado e CA3; 2) as fibras musgosas: ligam o giro denteado a CA3; 3) e as fibras colaterais de Schaffer: ligam CA3 a CA1 (Amaral & Witter 1989). Sendo que esta última é o principal alvo de estudo do presente trabalho.

O hipocampo foi a primeira estrutura do SNC na qual os estudos de atividade elétrica extracelular, utilizando-se microeletrodos, foram realizados. Além disso, essa região foi a primeira onde foi feita a interpretação do Potencial Excitatório Pós-sinaptico de campo (PEPSc) como uma ferramenta de análise de sinais extracelulares (Andersen e cols., 2007).

O potencial de campo é gerado por uma corrente extracelular que corre através da resistência apresentada pelo tecido entre o eletrodo de captação e o eletrodo terra. Embora seja possível medir voltagens extracelulares geradas por potenciais de ação em um único neurônio, as correntes sinápticas geradas por um único neurônio são geralmente muito pequenas para serem detectadas. No hipocampo, onde as células estão dispostas paralelamente, a corrente sincronizada e localizada gerada pela ativação sináptica de uma população de células piramidais ou granulares dá origem a uma resposta

característica, a qual pode ser medida facilmente, chamada de Potencial de Campo Excitatório Pós-sináptico (PEPSc). Diferente da resposta "tudo ou nada" que ocorre em conseqüência da estimulação de um único neurônio, o potencial de campo é uma resposta gradual, de modo que quando a intensidade do estímulo aumenta, o número de neurônios que disparam se torna maior, e o potencial de campo detectado também é proporcionalmente maior (Spruston & McBain, 2007).

O potencial de campo apresenta o máximo de negatividade na região de maior concentração de sinapses excitatórias ativadas. As sinapses vizinhas ativadas adicionam o seu efeito de forma significativa, justificando o uso da amplitude dos PEPSc como uma medida de força sináptica. A ativação local e sincrônica de fibras inibitórias também dá origem a grandes correntes, mas na direção oposta (Bliss & Collindridge, 2007).

O LTP pode se prolongar por um período que vai de horas a dias e pode ser dividida em três fases: Potencialização de Curto Prazo (STP), LTP precoce e LTP tardia. As duas primeiras, a STP e a LTP precoce, são independentes da síntese protêica, enquanto que a última, a LTP, depende da mesma (Bliss & Collindridge, 2007). A indução da LTP em CA1 pelas fibras colaterais de Schaffer depende da ativação dos receptores NMDA (Collingridge e cols., 1983), sendo que a sua indução é facilitada pela despolarização provocada pelos receptores AMPA e pela fadiga da neurotransmissão GABAérgica (Davies e cols., 2001). A participação dos receptores $GABA_A$ na LTP foi o principal foco do presente trabalho.

Produção de NEUROESTEROIDES e expressão de receptores $GABA_A$ no HIPOCAMPO

Em 1984, Harrison e Simmonds demonstraram pela primeira vez que o esteróide sintético alfaxalona apresentava propriedades anestésicas que eram mediadas pelo receptor $GABA_A$. Posteriormente, descreveu-se que uma série de metabólitos da progesterona e da deoxicorticosterona, como a 5α-pregnan-3α-ol-20-one [3α,5α-THP] e a 5α-pregnan-3α,21-diol-20-one [3α,5α-THDOC], também apresentavam tal propriedade (Belelli & Lambert, 2005). A capacidade de realçar a neurotransmissão inibitória desses esteróides é consistente com os seus efeitos comportamentais, que incluem atividade ansiolítica, anticonvulsivante, analgésica, sedativa/hipnótica e anestésica (Gasior e cols., 1999; Rupprecht e cols., 2003; Belelli & Lambert; 2005).

Como já foi descrito no capítulo 4 desta tese, a existência de uma vasta gama de subunidades confere propriedades biofísicas e farmacológicas diferentes a cada receptor $GABA_A$ (Barnard e cols., 1998).

A origem dos esteróides neuroativos pode ser central ou periférica, sendo que neste último caso são denominados de neuroesteróides. Sua concentração no SNC é suficiente para modular a função do receptor $GABA_A$, o que sugere que esses esteróides apresentam um papel fisiológico relevante (Paul & Purdy, 1992). Além disso, a expressão de enzimas envolvidas com a esteroidogênese em certos tipos de neurônios indica que estas substâncias funcionam não só como mensageiros endócrinos, mas também como moduladores locais de forma autócrina e parácrina (Agis-Balboa e cols., 2006).

A produção de esteróides não é estática e está sujeita a alteração de acordo com o estágio do desenvolvimento, os níveis de estresse, a prenhez ou a gravidez, o ciclo estral ou menstrual e o tratamento com algumas drogas psicoativas como o etanol e a fluoxetina (Maguire e cols., 2005; Belelli & Lambert, 2005; Serra e cols., 2002; Concas e cols., 1998). Além disso, alterações na sua produção parecem contribuir para alguns transtornos psiquiátricos como o pânico, a depressão pós-parto, a tensão pré-menstrual e a esquizofrenia (Purdy e cols., 1991; Finn e cols., 2006).

Os receptores $GABA_A$ são expressos em todo SNC, portanto alterações nas concentrações de neuroesteróides poderiam influenciar globalmente a atividade neuronal, mas este é um cenário que não condiz com o seu papel fisiológico. Com efeito, a expressão de enzimas esteroidogênicas, e conseqüentemente a produção local de neuroesteróides, difere de região para região do SNC. Além disso, a interação esteróide/$GABA_A$ é altamente seletiva, sendo, portanto, neurônio-específica, e mesmo em um mesmo neurônio deve interagir diferencialmente com "pools" distintos do receptor $GABA_A$ (Stell e cols., 2003). Com efeito, os resíduos de aminoácidos de algumas subunidades foram identificados como críticos para a expressão do sítio de ligação dos neuroesteróides por esse receptor (Hosie e cols., 2006), de modo que a deleção de algumas subunidades pode alterar a afinidade do receptor $GABA_A$ por estes esteróides (Rudolph & Mohler, 2004). De particular interesse para os efeitos dos esteróides neuroativos estão os receptores extra-sinápticos contendo a subnunidade δ.

Os receptores que expressam δ em combinação com as subunidades α_4 ou α_6 e β estão localizados quase exclusivamente fora da sinapse, onde medeiam uma forma de

inibição persistente, denominada de inibição "tônica" em resposta à exposição permanente ao GABA (Mody, 2005; Farrant & Nusser, 2005; Chandra e cols., 2006). Os receptores contendo a subunidade δ apresentam grande afinidade por esteróides neuroativos como a alopregnanolona ou a 3α,5α-THP, quando comparados aos receptores contendo a subunidade γ (Stell e cols., 2003). No hipocampo, esta combinação de subunidades está mais presente nos receptores extra-sinápticos $GABA_A$ presentes no giro denteado (α_4 e δ), enquanto que em CA1, os receptores extra-sinápticos são em sua maioria compostos pelas subunidades α_5 e γ (Glykys & Mody 2006), mas ambas as regiões apresentam as duas composições, porém em menor proporção.

Alguns trabalhos já mostraram que flutuações fisiológicas nas concentrações de esteróides podem alterar os processos de aprendizagem e de memória (Schoofs & Wolf, 2009; Protopopescu e col., 2008; Konrad e cols., 2008; Paris & Frye, 2008; van Wingen e cols., 2007). A maioria dos trabalhos que se propuseram a investigar o papel dos esteróides neuroativos na plasticidade sináptica, no hipocampo, focaram no efeito dos esteróides sulfatados que modulam negativamente o receptor $GABA_A$ (Yoo e cols., 1996; Diamond e cols., 1996; Randall e cols., 1995). No entanto, pouco se sabe sobre a atuação direta da 3α,5α-THP na LTP em CA1. Assim, o principal objetivo do presente trabalho foi investigar a atuação da 3α,5α-THP, na LTP induzida nas fibras colaterais de Schaffer.

Para isso três experimentos foram realizados. O primeiro teve como principal objetivo testar a eficiência da 3α,5α-THP em inibir a LTP em CA1. Já no segundo, o THIP, um agonista específico da subunidade δ, foi utilizado para esclarecer a contribuição dos receptores contendo esta subunidade na LTP. No terceiro experimento foram utilizados

animais Knock-out para a subunidade δ do receptor $GABA_A$ para testar o efeito da 3α,5α-THP na LTP em CA1.

Animais, Materiais e Métodos

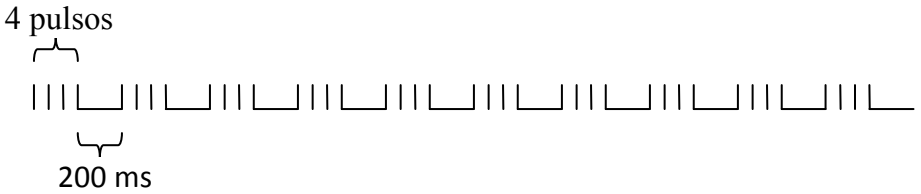
Protocolo experimental. O Experimento 1 foi realizado com o objetivo de verificar a eficiência da 3α,5α-THP em inibir a LTP em CA1. Para isso três concentrações foram utilizadas: 100nM, 300nM e 1µM. No Experimento 2, 1 µM de THIP foi utilizado para testar se a atuação desta droga poderia interferir nos processos de indução e de manutenção da LTP em CA1. Já no Experimento 3 foram utilizados animais Knock-out para a subunidade δ (δ-KO) do receptor $GABA_A$ para testar se 300nM de 3α,5α-THIP poderiam bloquear a indução e a manutenção da LTP na ausência desta subunidade em CA1.

Animais. Foram utilizados camundongos C57 machos adultos provenientes do biotério da Universidade de Dundee (Hospital Ninewells). Os animais foram mantidos em gaiolas (15x16x30 cm) com 6 animais cada, com comida e água à vontade, num ambiente de temperatura controlada (22 $\pm$ 2^{o}C) e ciclo claro-escuro de 12 horas (luzes acesas a partir das 7:00h). Todos os procedimentos foram realizados de acordo com o comitê de ética local de acordo com "Ato de 1986 do Reino Unido".

Preparo do tecido. Os animais foram sacrificados por deslocamento cervical de acordo com o ato 1986 para procedimentos com animais de laboratório. O cérebro foi rapidamente dissecado e colocado num becker com líquido cefaloraquidiano artificial (CSFa) contendo 3mM de KCl, 1.25mM de NaH2PO4, 26mM de NaHCO3, 0.5mM de CaCl2, 1mM de MgSO4, 10mM de D-glucose, 124mM de NaCl. As fatias do hipocampo foram

cortadas transversalmente (400 µm de espessura) e incubadas em CSFa oxigenada em temperatura ambiente por 1 hora antes do início do experimento.

A perfusão de CSFa durante o experimento foi mantida oxigenada e a 30^{o}C. A LTP foi observada nas fibras colaterais de Schaffer. Para a obtenção do potencial de campo o eletrodo de estimulação foi colocado em CA3 e o de captação em CA1. A estimulação utilizada para a obtenção do potencial de campo (em µA) foi aumentada gradativamente até que o potencial de campo com máxima amplitude fosse observado. Assim, sabendo qual foi a estimulação necessária para a obtenção do maior potencial de campo, o experimento foi realizado com a estimulação necessária para se obter um potencial de campo com 40% da amplitude máxima. Após o início do experimento, um pulso de corrente foi liberado a cada 30 segundos, sendo que a linha de base foi observada até que ficasse estável. Assim que a estabilidade era confirmada a linha de base era registrada por 10 minutos e a resposta do potencial de campo ao treino observada por 60 minutos. O estímulo tetânico utilizado para provocar a LTP consistiu de 4 pulsos com uma freqüência de 100 Hz (ritmo theta), liberados por 10 vezes com 200 ms de intervalo, de acordo com o esquema exemplificado abaixo:



O “set up” utilizado para a captação dos potenciais de campo seguiu o seguinte esquema:

Um computador contendo o software WIN LTP foi utilizado para o registro dos experimentos. A caixa de estimulação, que emitia corrente elétrica na ordem de μA, estava ligada ao eletrodo de estimulação (Figuras 1). O eletrodo de registro estava ligado a um amplificador de sinal elétrico (figura 1), e este era ligado a um aparelho que fazia a interface entre a informação analógica detectada e a informação digital enviada para o computador. A conexão deste com o computador permitia o registro de todos os dados obtidos durante o experimento.

O banho onde os cortes de tecido cerebral foram colocados para a realização do experimento era alimentado por um sistema que permitia que a CSFa fosse devidamente aquecida e oxigenada. Um fio terra foi conectado ao banho e um dispositivo permitiu o registro da temperatura ao longo do tempo (figura 2).

A **B**

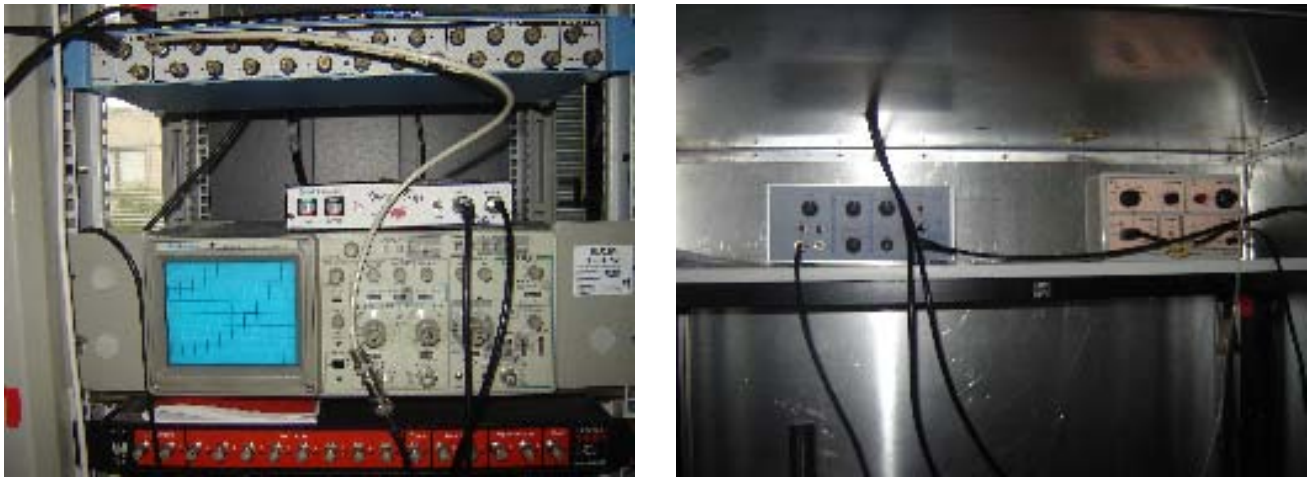


Figura 1. A) Osciloscópio, aparelho que exibe um gráfico da tensão *vs.* tempo para um sinal elétrico. Com este aparelho foi possível observar em tempo real a magnitude do estímulo e a resposta do Potencial Excitatório Sináptico de Campo. B) à esquerda está o amplificador do sinal elétrico e à direita a caixa de estimulação.

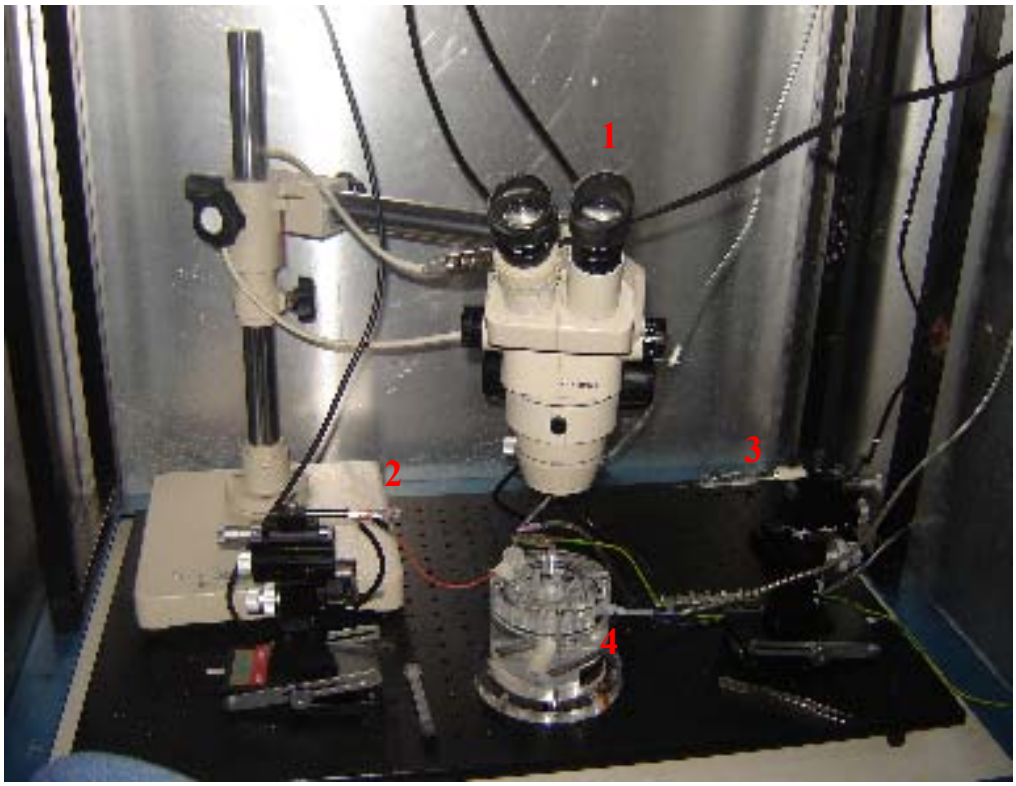


Figura 2. 1) microscópio; 2) eletrodo de registro; 3) eletrodo de estimulação; 4) banho onde o tecido foi colocado para o registro da atividade elétrica.

Análise dos dados. O parâmetro analisado neste experimento foi a inclinação do PEPSc (figura 3), cuja unidade de medida foi mV/ms. A média dos valores dos registros que compunham a linha de base foi utilizada para normalizar os resultados. Assim, os resultados observados após o estímulo tetânico eram uma porcentagem do que foi observado no registro da linha de base. A análise estatística dos dados foi feita por ANOVA de duas vias para medidas repetidas, tendo sido utilizado, a posteriori, o teste de Dunnett's quando necessário. O nível de significância foi estabelecido em $p<0,05$.

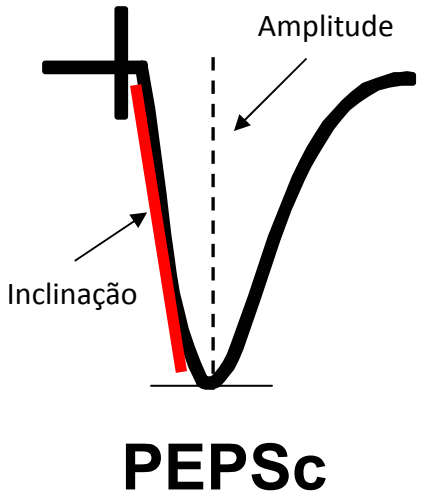


Figura 3. Esquema ilustrativo de um Potencial Excitatório Pós-sináptico de campo (PEPSc) e seus componentes: inclinação (mV/ms) e amplitude (mV).

RESULTADOS

Experimento 1. Os resultados obtidos com este experimento indicam que o tratamento influenciou o PEPSc induzido por uma estimulação tetânica. A ANOVA mostrou que havia diferença no fator medidas repetidas ($F_{(118, 3422)}$=15,89; p<0,01), assim como no fator tratamento ($F_{(3,29)}$=3,58;p<0,05). Houve também uma interação entre os dois fatores ($F_{(354,3422)}$=1,13;p<0,05). Na análise a posteriori do fator tratamento, os grupos tratados com 300nM (p<0,05) e 1µM de 3α,5α-THP (p<0,05), mas não 100nM, apresentaram uma potencialização significativamente menor do que o grupo controle (figura 4).

Experimento 2. O experimento realizado com THIP (figura 5) mostrou que esta droga não interferiu na potencialização em relação ao grupo controle ($F_{(1,5)}$=0,20;p=0,67). Também não houve interação entre os fatores tratamento e as medidas repetidas ($F_{(118, 590)}$=0,39;p=1).

Experimento 3. O tratamento com 3α,5α-THP (300 nM e 1 µM) não interferiu no PEPSc nos experimentos realizados com tecido proveniente de animais δ-KO (Figura 3; $F_{(2,6)}$=1,35;p=0,32). Também não houve interação entre o fator tratamento e a medida repetida ($F_{(236,708)}$=0,74;p=0,99).

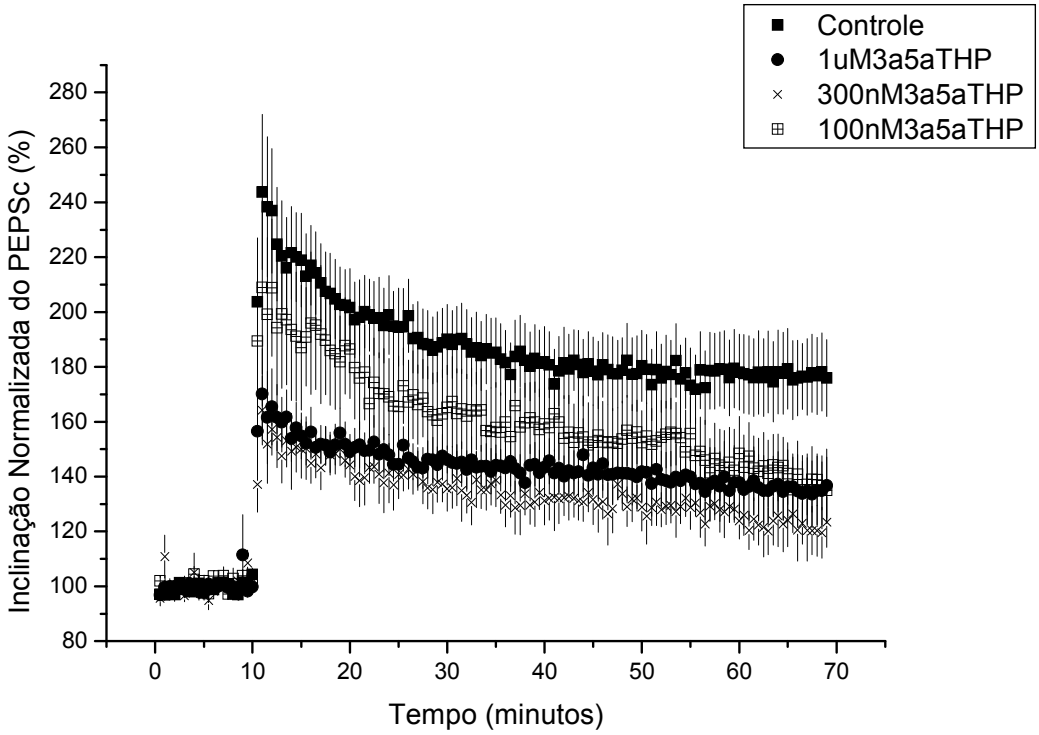


Figura 4. Potencialização de Longo Prazo em CA1 em resposta à perfusão com 300 nM (N=5), 100 nM (N=8), e 1 µM (N=7) de 3α,5αTHP. O grupo controle foi perfundido apenas com CSFa (N=13). As concentrações de 300 nM e 1 µM apresentaram potencialização menor quando comparadas ao grupo controle.

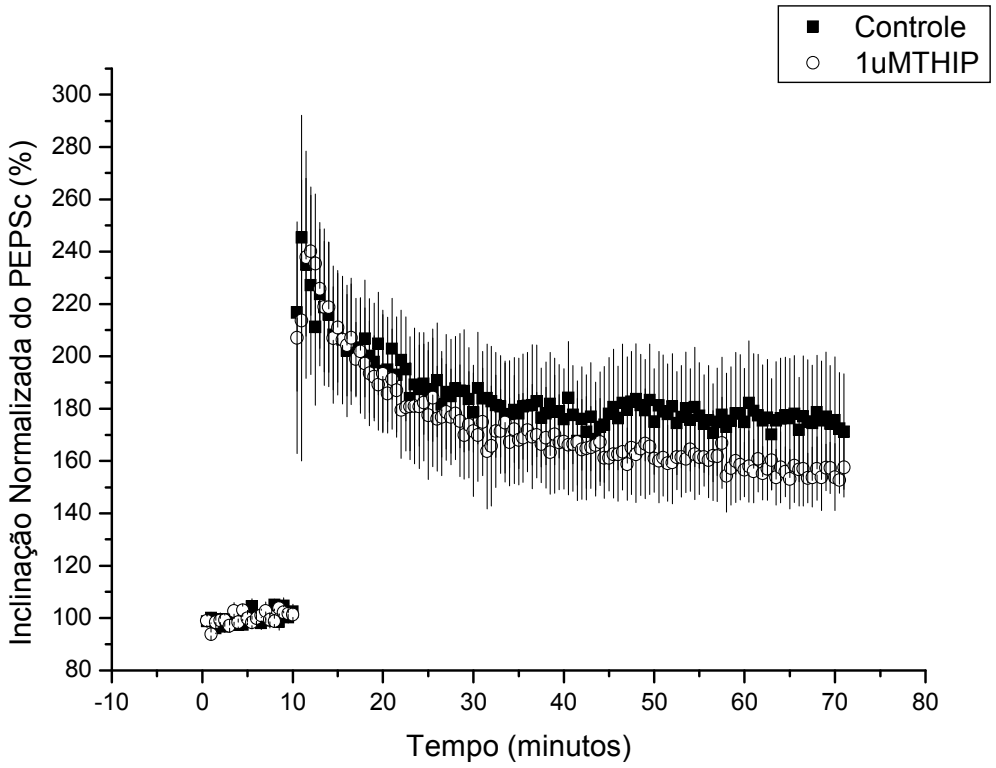


Figura 5. Potencialização de Longo Prazo em CA1 em resposta à perfusão de 1 µM de THIP (N=3). Nos experimentos do grupo controle foram perfundidos apenas com CSFa (N=3). Não houve diferença entre os grupos.

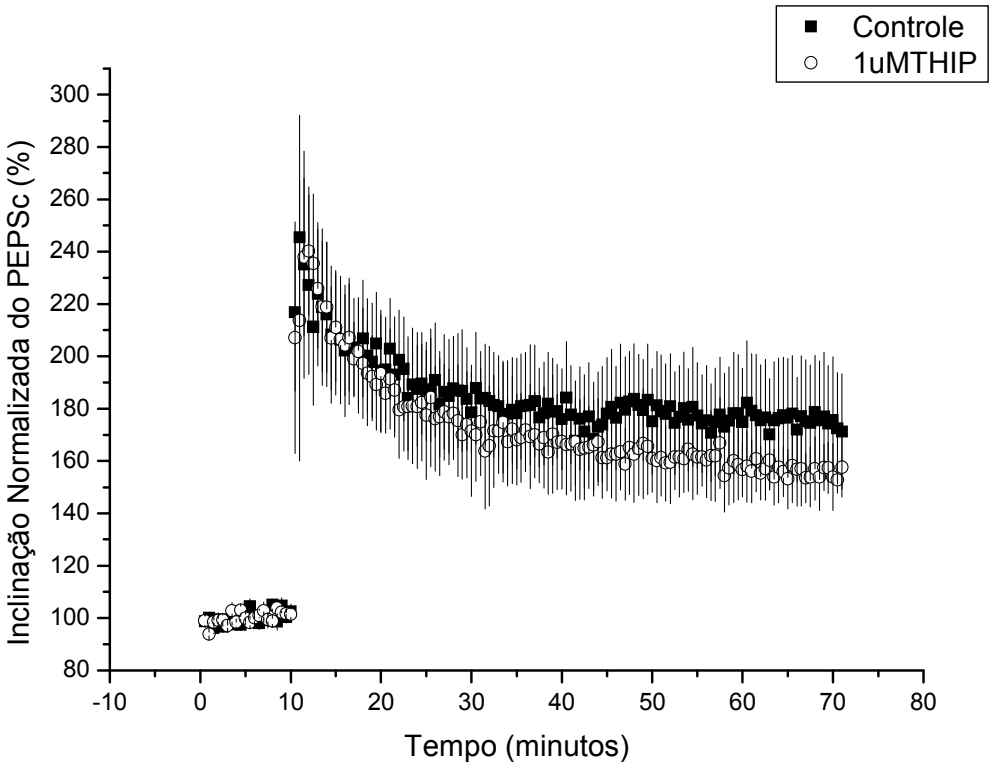


Figura 6. Potencialização de Longo Prazo em CA1 em resposta à perfusão de 300 nM (N=3) e 1 µM de 3α,5α-THP (N=3) em animais δ-KO. Nos experimentos do grupo controle foram perfundidos apenas com CFSa (N=3). Não houve diferença entre os grupos.

DISCUSSÃO

Os resultados obtidos mostraram que a subunidade δ tem um papel importante na atuação da 3α,5α-THP no processo de Potencialização de Longo Prazo em CA1 do hipocampo, mas que apenas a estimulação desta subunidade não é suficiente para alterar a LTP nessa região.

A subunidade δ tende a mediar os efeitos fisiológicos da 3α,5α-THP, ao passo que ao atuar sobre a subunidade γ esta exerce os seus efeitos farmacológicos. As concentrações plasmáticas de esteróides neuroativos em torno de 40 nM podem ser observadas em situação basal, enquanto que as concentrações em torno de 100nM podem ser observadas em resposta ao estresse e também durante a prenhez ou a gestação (comunicação pessoal JJ Lambert). Esta faixa de concentração, de 40 a 100 nM, mimetiza, num experimento *in vitro,* uma situação fisiológica. No entanto, é possível que a concentração de 300 nM utilizada no protocolo experimental deste trabalho também possa ser considerada fisiológica, pois o tecido fica exposto à solução por um longo período de tempo e, como conseqüência, pode sofrer a ação de enzimas metabolizadoras, diminuindo a disponibilidade da droga para agir sobre os seus sítios de ligação (comunicação pessoal JJ Lambert).

No primeiro experimento, os resultados mostraram que a concentração de 300 nM, assim como a de 1 μM foram suficientes para diminuir significativamente a potencialização induzida pelo estímulo tetânico. É possível considerar a hipótese que a concentração de 300 nM, por ser a mais próxima da fisiológica, esteja atuando

prioritariamente sobre os receptores compostos pela subunidade δ, mas não se pode descartar a participação dos receptores compostos pela subunidade γ no resultado observado.

Vários trabalhos já mostraram que em CA1 há uma proporção menor de receptores extra-sinápticos compostos pela subunidade δ do que pela γ, sendo que este último compõe a maioria dos receptores extra-sinápticos nesta região do hipocampo (Glykys & Mody, 2006). Assim, com o objetivo de esclarecer a contribuição da subunidade δ na diminuição da potencialização observada no experimento 1, foi realizado um experimento com THIP, um agonista $GABA_A$ que age exclusivamente sobre as subunidades δ (Herd e cols., 2007). Os resultados observados mostraram que a estimulação da subunidade δ sozinha não foi suficiente para reduzir a LTP. Os resultados obtidos nos experimentos 1 e 2 permitiram considerar a hipótese que a 3α,5α-THP exerce seus efeitos em CA1 também através dos receptores $GABA_A$ que contêm a subunidade γ. Assim, é possível que mesmo concentrações de 3α,5α-THP próximas do que se observa em situações fisiológicas (300 nM) possam agir sobre a subunidade γ. Assim, o terceiro experimento foi realizado com animais δ-KO, sendo esperada uma diminuição na potencialização provocada pelo estímulo tetânico.

Os resultados obtidos com os animais δ-KO mostraram que a presença desta subunidade, apesar de insuficiente sozinha, era essencial para os efeitos da 3α,5α-THP observados no primeiro experimento. Mesmo a concentração de 1 μM, claramente farmacológica, não alterou a potencialização provocada pelo estímulo tetânico na ausência da subunidade δ. Esse experimento mostrou que, mesmo tendo uma expressão

menor quando comparada à subunidade γ em CA1, ela era de fundamental importância para atuação da 3α,5α-THP em receptores $GABA_A$ nesta região.

Alguns trabalhos já mostraram que a presença de determinadas subunidades não é o único fator que influencia a afinidade dos esteróides neuroativos pelo receptor $GABA_A$. A fosforilação de resíduos de aminoácido é também um mecanismo importante para alterar a afinidade do receptor $GABA_A$ por essas substâncias, podendo aumentar ou até mesmo diminuir a sua afinidade por elas. Além disso, esse processo depende do tipo de subunidade expresso, do tipo de neurônio, assim como da região e do circuito neuronal em que o mesmo está inserido (Koksma et al 2007; Hodge e cols., 1999, 2002; Fancsik e cols., 2000; Harney e cols., 2003). Assim, outros estudos são necessários para determinar se os mecanismos de fosforilação, de dessensibilização ou de internalização dos receptores medeiam os resultados observados.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Agis-Balboa RC, Pinna G, Zhubi A, Maloku E, Veldic M, Costa E, Guidotti A. Characterization of brain neurons that express enzymes mediating neurosteroid biosynthesis. Proc Natl Acad Sci U S A. 2006;103(39):14602-7.

Altemus M, Redwine LS, Leong YM, Frye CA, Porges SW, Carter CS. Responses to laboratory psychosocial stress in postpartum women. Psychosom Med. 1992;63(5):814–21.

Amaral D, Lavenex P. Hippocampal neuroanatomy. In: Andersen P, Morris R, Amaral D, Bliss T, O´Keef J, eds. The hippocampus book. New York: Oxford University Press; 2007. p.37-114.

Amaral DG, Witter MP. The three-dimensional organization of the hippocampal formation: a review of anatomical data. Neuroscience. 1989;31(3):571-91.

Amsterdam JD, Maislin G, Winokur A, Berwish N, Kling M, Gold P. The oCRH stimulation test before and after clinical recovery from depression. J Affect Disord. 1988;14(3):213-22.

Andersen P, Morris R, Amaral D, Bliss T, O´Keefe J. Historical perspective: proposed functions, biological characteristics, and neurobiological models of the hippocampus.In: Andersen P, Morris R, Amaral D, Bliss T, O´Keef J, eds. The hippocampus book. New York: Oxford University Press; 2007. p.9-36.

Andrade TG, Graeff FG. Effect of electrolytic and neurotoxic lesions of the median raphe nucleus on anxiety and stress. Pharmacol Biochem Behav. 2001;70(1):1–14.

Andreatini R, Bacellar LF. Animal models: trait or state measure? The test-retest reliability of the elevated plus-maze and behavioral despair. Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry. 2000;24(4):549–60.

Andreatini R, Boerngen-Lacerda R, Vital MABF. Modelos animais em psicofarmacologia. In: Almeida RN, org. Psicofarmacologia: fundamentos práticos. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 2006. p.53-61.

Anisman H, Zaharia MD, Meaney MJ, Merali Z. Do early-life events permanently alter behavioral and hormonal responses to stressors? Int J Dev Neurosci. 1998;16(3-4):149–64.

Arai M, Widmaier EP. Activation of the pituitary-adrenocortical axis in day-old rats by insulin-induced hypoglycemia. Endocrinology. 1991;129(3):1505-12.

Arborelius L, Owens MJ, Plotsky PM, Nemeroff CB. The role of corticotropin-releasing factor in depression and anxiety disorders. J Endocrinol. 1999;160(1):1–12.

Baram TZ, Lerner SP. Ontogeny of corticotropin releasing hormone gene expression in rat hypothalamus--comparison with somatostatin. Int J Dev Neurosci.1991;9(5):473-8.

Barbosa Neto JR. Modelo Experimental de transtorno de Estresse Pós-traumático [tese] São Paulo: Universiade Federal de São Paulo; 2008

Barnard EA, Skolnick P, Olsen RW, Mohler H, Sieghart W, Biggio G, Braestrup C,Bateson AN, Langer SZ. International Union of Pharmacology. XV. Subtypes of gamma-aminobutyric acidA receptors: classification on the basis of subunit structure and receptor function. Pharmacol Rev. 1998;50(2):291-313.

Barnard EA, Skolnick P, Olsen RW, Mohler H, Sieghart W, Biggio G, Braestrup C, Bateson AN, Langer SZ. International Union of Pharmacology. XV. Subtypes of gammaaminobutyric acidA receptors: classification on the basis of subunit structure and receptor function. Pharmacol Rev. 1998;50(2):291-313.

Belelli D, Casula A, Ling A, Lambert JJ. The influence of subunit composition on the interaction of neurosteroids with GABA(A) receptors. Neuropharmacology.2002;43(4):651-61.

Belelli D, Herd MB. The contraceptive agent Provera enhances GABA(A) receptormediated inhibitory neurotransmission in the rat hippocampus: evidence for endogenous neurosteroids? J Neurosci. 2003;23(31):10013–20.

Belelli D, Lambert JJ, Peters JA, Wafford K, Whiting PJ. The interaction of the general anesthetic etomidate with the gamma-aminobutyric acid type A receptor is influenced by a single amino acid. Proc Natl Acad Sci U S A. 1997;94(20):11031-6.

Belelli D, Lambert JJ. Neurosteroids: endogenous regulators of the GABA(A receptor. Nat Rev Neurosci. 2005;6(7):565-75.

Belelli D, Peden DR, Rosahl TW, Wafford KA, Lambert JJ. Extrasynaptic GABAA receptors of thalamocortical neurons: a molecular target for hypnotics.; 2005. Available from: Belelli D, Peden DR, Rosahl TW, Wafford KA, Lambert JJ. Extrasynaptic GABAA receptors of thalamocortical neurons: a molecular target for hypnotics. J Neurosci. 2005;25(50):11513-20.

Belzung C, Le Pape G. Comparison of different behavioral test situations used in psychopharmacology for measurement of anxiety. Physiol Behav. 1994;56(3):623-8.

Bilkei-Gorzo A, Racz I, Michel K, Mauer D, Zimmer A, Klingmüller D. Control of hormonal stress reactivity by the endogenous opioid system. Psychoneuroendocrinology. 2008;33(4):425–36.

Bliss & Collindridge, 2007. NMDA receptors—their role in long term potentiation. .In: Andersen P, Morris R, Amaral D, Bliss T, O´Keef J, eds. The hippocampus book. New York: Oxford University Press; 2007. p.50-96.

Boehm SL 2nd, Homanics GE, Blednov YA, Harris RA. delta-Subunit containing GABAA receptor knockout mice are less sensitive to the actions of 4,5,6,7-tetrahydroisoxazolo-[5,4-c]pyridin-3-ol. Eur J Pharmacol. 2006;541(3):158-62.

Borsini F, Podhorna J, Marazziti D. Do animal models of anxiety predict anxiolytic-like effects of antidepressants? Psychopharmacology (Berl). 2002;163(2):121-41.

Brambilla P, Perez J, Barale F, Schettini G, Soares JC. GABAergic dysfunction in mood disorders. Mol Psychiatry. 2003;8(8):721-37, 715.

Calatayud F, Coubard S, Belzung C. Emotional reactivity in mice may not be inherited but influenced by parents. Physiol Behav. 2004;80(4):465-74.

Caldji C, Francis D, Sharma S, Plotsky PM, Meaney MJ. The effects of early rearing environment on the development of GABAA and central benzodiazepine receptor levels and novelty-induced fearfulness in the rat. Neuropsychopharmacology. 2000;22(3):219–29.

Carpenter LL, Tyrka AR, Ross NS, Khoury L, Anderson GM, Price LH. Effect of childhood emotional abuse and age on cortisol responsivity in adulthood. Biol Psychiatry. 2009;66(1):69–75.

Carroll BJ, Feinberg M, Greden JF, Tarika J, Albala AA, Haskett RF, James NM, Kronfol Z, Lohr N, Steiner M, de Vigne JP, Young E. A specific laboratory test for the diagnosis of melancholia. Standardization, validation, and clinical utility. Arch Gen Psychiatry. 1981;38(1):15-22.

Cavallaro S, Pani L, Guidotti A, Costa E. ACTH-induced mitochondrial DBI receptor (MDR) and diazepam binding inhibitor (DBI) expression in adrenals of hypophysectomized rats is not cause-effect related to its immediate steroidogenic action. Life Sci. 1993;53(14):1137-47.

Chambers JA, Power KG, Durham RC. The relationship between trait vulnerability and anxiety and depressive diagnoses at long-term follow-up of Generalized Anxiety Disorder. J Anxiety Disord.'2004;18(5):587–607.

Chandra D, Jia F, Liang J, Peng Z, Suryanarayanan A, Werner DF, Spigelman I, Houser CR, Olsen RW, Harrison NL, Homanics GE. GABAA receptor alpha 4 subunits mediate extrasynaptic inhibition in thalamus and dentate gyrus and the action of gaboxadol. Proc Natl Acad Sci U S A. 2006;103(41):15230-5.

Chao DL, Ma L, Shen K. Transient cell-cell interactions in neural circuit formation. 2009; 10(4):262-71.

Chatelain A, Durand P, Naaman E, Dupouy JP. Ontogeny of ACTH(1-24) receptors in rat adrenal glands during the perinatal period. J Endocrinol. 1989;123(3):421-8.

Chautard T, Boudouresque F, Guillaume V, Oliver C. Effect of excitatory amino acid on the hypothalamo-pituitary-adrenal axis in the rat during the stress-hyporesponsive period. Neuroendocrinology. 1993;57(1):70-8.

Chorpita BF, Barlow DH. The development of anxiety: the role of control in the early environment. Psychol Bull. 1998;124(1):3-21.

Collingridge GL, Kehl SJ, McLennan H. Excitatory amino acids in synaptic transmission in the Schaffer collateral-commissural pathway of the rat hippocampus. J Physiol. 1983;334:33-46.

Concas A, Mostallino MC, Porcu P, Follesa P, Barbaccia ML, Trabucchi M, Purdy RH, Grisenti P, Biggio G. Role of brain allopregnanolone in the plasticity of gammaaminobutyric acid type A receptor in rat brain during pregnancy and after delivery. Proc Natl Acad Sci U S A. 1998;95(22):13284-9.

Cope DW, Hughes SW, Crunelli V. GABAA receptor-mediated tonic inhibition in thalamic neurons. J Neurosci. 2005;25(50):11553-63.

Costall B, Domeney AM, Kelly ME, Tomkins DM, Naylor RJ, Wong EH, Smith WL,Whiting RL, Eglen RM. The effect of the 5-HT3 receptor antagonist, RS-42358-197, in animal models of anxiety. Eur J Pharmacol. 1993;234(1):91-9.

Daniels WM, Pietersen CY, Carstens ME, Stein DJ. 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. 2004;19(1-2):3-14.

Davies CH, Starkey SJ, Pozza MF, Collingridge GL. GABA autoreceptors regulate the induction of LTP. Nature. 1991;349(6310):609-11.

De Kloet ER, Rosenfeld P, Van Eekelen JA, Sutanto W, Levine S. Stress, glucocorticoids and development. Prog Brain Res. 1988;73:101-20.

De Kloet ER, Rots NY, Cools AR. Brain-corticosteroid hormone dialogue: slow and persistent. Cell Mol Neurobiol. 1996;16(3):345-56.

De Kloet ER, van der Vies J, de Wied D. The site of the suppressive action of dexamethasone on pituitary-adrenal activity. Endocrinology. 1974;94(1):61-73.

De Kloet ER, Vreugdenhil E, Oitzl MS, Joëls M. Brain corticosteroid receptor balance in health and disease. Endocr Rev. 1998;19(3):269–301.

Delgado M, Caicoya AG, Greciano V, Benhamú B, López-Rodríguez ML, Fernández-Alfonso MS, et al. Anxiolytic-like effect of a serotonergic ligand with high affinity for 5-HT1A, 5-HT2A and 5-HT3 receptors. Eur J Pharmacol. 2005;511(1):9–19.

Dent GW, Okimoto DK, Smith MA, Levine S. Stress-induced alterations in corticotropin-releasing hormone and vasopressin gene expression in the paraventricular nucleus during ontogeny. Neuroendocrinology. 2000;71(6):333–42.

Dent GW, Smith MA, Levine S. The ontogeny of the neuroendocrine response to endotoxin. Brain Res Dev Brain Res. 1999;117(1):21–9.

Diamond DM, Bennett MC, Fleshner M, Rose GM. Inverted-U relationship between the level of peripheral corticosterone and the magnitude of hippocampal primed burst potentiation. Hippocampus. 1992;2(4):421-30.

Diamond DM, Branch BJ, Fleshner M. The neurosteroid Dehydroepiandrosterone sulfate (DHEAS) enhances hippocampal primed burst, but not long-term, potentiation. Neurosci Lett. 1996;202(3):204-8.

Drolet G, Dumont EC, Gosselin I, Kinkead R, Laforest S, Trottier JF. Role of endogenous opioid system in the regulation of the stress response. Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry. 2001;25(4):729–41.

Ellenbroek BA, Cools AR. Early maternal deprivation and prepulse inhibition: the role of the postdeprivation environment. Pharmacol Biochem Behav. 2002;73(1):177–84.

Ellenbroek BA, van den Kroonenberg PT, Cools AR. The effects of an early stressful life event on sensorimotor gating in adult rats. Schizophr Res. 1998;30(3):251–60.

Eser D, Schule C, Baghai TC, Romeo E, Uzunov DP, Rupprecht R. Neuroactive steroids and affective disorders. Pharmacol Biochem Behav. 2006;84(4):656-66.

Fancsik A, Linn DM, Tasker JG. Neurosteroid modulation of GABA IPSCs is phosphorylation dependent. J Neurosci. 2000;20(9):3067-75.

Farrant M, Nusser Z. Variations on an inhibitory theme: phasic and tonic activation of GABA(A) receptors. Nat Rev Neurosci. 2005;6(3):215-29.

Faturi CB, Tiba PA, Kawakami SE, Catallani B, Kerstens M, Suchecki D. Disruptions of the mother-infant relationship and stress-related behaviours: Altered corticosterone secretion does not explain everything. Neurosci Biobehav Rev. 2009 in press

Finn DA, Beadles-Bohling AS, Beckley EH, Ford MM, Gililland KR, Gorin-Meyer RE, Wiren KM. A new look at the 5alpha-reductase inhibitor finasteride. CNS Drug Rev. 2006;12(1):53-76.

Flint J, Munafò MR. The endophenotype concept in psychiatric genetics. Psychol Med. 2007;37(2):163–80.

Francis D, Diorio J, Liu D, Meaney MJ. Nongenomic transmission across generations of maternal behavior and stress responses in the rat.Science. 1999 5;286(5442):1155-8

Francis DD, Meaney MJ. Maternal care and the development of stress responses. Curr Opin Neurobiol. 1999;9(1):128-34.

Frank CL, Tsai LH. Alternative functions of core cell cycle regulators in neuronal migration, neuronal maturation, and synaptic plasticity.; 2009; 14;62(3):312-26.

Fritschy JM, Brunig I. Formation and plasticity of GABAergic synapses: physiological mechanisms and pathophysiological implications. Pharmacol Ther.2003;98(3):299-323.

Fritschy JM, Brünig I. Formation and plasticity of GABAergic synapses: physiological mechanisms and pathophysiological implications. Pharmacol Ther.2003;98(3):299-323.

Gasior M, Carter RB, Witkin JM. Neuroactive steroids: potential therapeutic use in neurological and psychiatric disorders. Trends Pharmacol Sci. 1999;20(3):107-12.

Gavish M, Bachman I, Shoukrun R, Katz Y, Veenman L, Weisinger G, et al. Enigma of the peripheral benzodiazepine receptor. Pharmacol Rev. 1999;51(4):629–50.

Glydon RS. The development of the blood supply of the pituitary in the albino rat, with special reference to the portal vessels. J Anat. 1957;91(2):237-44.

Glykys J, Mann EO, Mody I. Which GABA(A) receptor subunits are necessary for tonic inhibition in the hippocampus? J Neurosci. 2008;28(6):1421-6.

Glykys J, Mody I. Hippocampal network hyperactivity after selective reduction of tonic inhibition in GABA A receptor alpha5 subunit-deficient mice. J Neurophysiol. 2006;95:2796–807.

Goes TC, Antunes FD, Teixeira-Silva F. Trait and state anxiety in animal models: Is there correlation? Neurosci Lett. 2009;450:266–9.

Goodyer IM, Park RJ, Netherton CM, Herbert J. Possible role of cortisol and dehydroepiandrosterone in human development and psychopathology. Br J Psychiatry.2001;179:243-9.

Gould TD, Gottesman II. Psychiatric endophenotypes and the development of valid animal models. Genes Brain Behav. 2006;5(2):113–9.

Graeff FG, Netto CF, Zangrossi H. The elevated T-maze as an experimental model of anxiety. Neurosci Biobehav Rev. 1998;23(2):237–46.

Graeff FG. Medicamentos ansiolíticos. In: Graeff FG, Guimarães FS, ed. Fundamentos de psicofarmacologia. São Paulo: Atheneu; 1999. p.123-60.

Greisen MH, Bolwig TG, Wörtwein G. Cholecystokinin tetrapeptide effects on HPA axis function and elevated plus maze behaviour in maternally separated and handled rats. Behav Brain Res. 2005;161(2):204-12.

Griebel G, Misslin R, Pawlowski M, Guardiola Lemaître B, Guillaumet G, Bizot-Espiard J. Anxiolytic-like effects of a selective 5-HT1A agonist, S20244,and its enantiomers in mice. Neuroreport. 1992;3(1):84-6.

Grino M, Young WS 3rd, Burgunder JM. Ontogeny of expression of the corticotropin-releasing factor gene in the hypothalamic paraventricular nucleus and of the proopiomelanocortin gene in rat pituitary. Endocrinology. 1989;124(1):60-8.

Grisel JE, Bartels JL, Allen SA, Turgeon VL. Influence of beta-Endorphin on anxious behavior in mice: interaction with EtOH. Psychopharmacology (Berl). 2008;200(1):105-15.

Guijarro JZ, Tiba PA, Ferreira TL, Kawakami SE, Oliveira MG, Suchecki D. Effects of brief and long maternal separations on the HPA axis activity and the performance of rats on context and tone fear conditioning. Behav Brain Res. 2007;184(2):101-8.

Guillet R, Michaelson SM. Corticotropin responsiveness in the neonatal rat.Neuroendocrinology. 1978;27(3-4):119-25.

Gunnar MR, Donzella B. Social regulation of the cortisol levels in early human development. Psychoneuroendocrin. 2000;27(1-2):199–220.

Gunnar MR. Quality of early care and buffering of neuroendocrine stress reactions: potential effects on the developing human brain. Prev Med. 1998;27(2):208–11.

Gutman DA, Nemeroff CB. Persistent central nervous system effects of an adverse early environment: clinical and preclinical studies. Physiol Behav. 2003;79(3):471–8.

Hadingham KL, Garrett EM, Wafford KA, Bain C, Heavens RP, Sirinathsinghji DJ, Whiting PJ. Cloning of cDNAs encoding the human gamma-aminobutyric acid type A receptor alpha 6 subunit and characterization of the pharmacology of alpha 6-containing receptors. Mol Pharmacol. 1996 Feb;49(2):253-9.

Handwerger K. Differential patterns of HPA activity and reactivity in adult posttraumatic stress disorder and major depressive disorder. Harv Rev Psychiatry. 2009;17(3):184-205.

Harney SC, Frenguelli BG, Lambert JJ. Phosphorylation influences neurosteroid modulation of synaptic GABAA receptors in rat CA1 and dentate gyrus neurones. Neuropharmacology. 2003;45(6):873–83.

Harrison NL, Simmonds MA. Modulation of the GABA receptor complex by a steroid anaesthetic. Brain Res. 1984;323(2):287-92.

Heavens RP, Sirinathsinghji DJ, Whiting PJ. Cloning of cDNAs encoding the human gamma-aminobutyric acid type A receptor alpha 6 subunit and characterization of the pharmacology of alpha 6-containing receptors. Mol Pharmacol. 1996;49(2):253-9.

Heim C, Nemeroff CB. The role of childhood trauma in the neurobiology of mood and anxiety disorders: preclinical and clinical studies. Biol Psychiatry. 2001;49(12):1023-39.

Heim C, Owens MJ, Plotsky PM, Nemeroff CB. The role of early adverse life events in the etiology of depression and posttraumatic stress disorder. focus on corticotropin-releasing factor. Ann N Y Acad Sci. 1997;821:194-207.

Heldt SA, Ressler KJ. Forebrain and midbrain distribution of major benzodiazepine-sensitive GABAA receptor subunits in the adult C57 mouse as assessed with in situ hybridization. Neuroscience. 2007;150(2):370–85.

Herd MB, Belelli D, Lambert JJ. Neurosteroid modulation of synaptic and extrasynaptic GABA(A) receptors. Pharmacol Ther. 2007;116:20–34.

Herman JP, Cullinan WE. Neurocircuitry of stress: central control of the hypothalamo-pituitary-adrenocortical axis. Trends Neurosci.1997;20(2):78-84.

Herman JP, Figueiredo H, Mueller NK, Ulrich-Lai Y, Ostrander MM, Choi DC, et al. Central mechanisms of stress integration: hierarchical circuitry controlling hypothalamo-pituitary-adrenocortical responsiveness. Front Neuroendocrinol. 2003;24(3):151–80.

Hodge CW, Mehmert KK, Kelley SP, McMahon T, Haywood A, Olive MF, Wang D, Hosie AM, Wilkins ME, da Silva HM, Smart TG. Endogenous neurosteroids regulate GABAA receptors through two discrete transmembrane sites. Nature. 2006;444(7118):486-9.

Hofer MA, Shair H. Control of sleep-wake states in the infant rat by features of the mother-infant relationship. Dev Psychobiol. 1982;15(3):229-43.

Hofer MA. The role of nutrition in the physiological and behavioral effects of early maternal separation on infant rats. Psychosom Med. 1973;35(4):350-9.

Holmes A, le Guisquet AM, Vogel E, Millstein RA, Leman S, Belzung C. Early life genetic, epigenetic and environmental factors shaping emotionality in rodents. Neurosci Biobehav Rev. 2005;29(8):1335–46.

Holsboer F, Ising M. Central CRH system in depression and anxiety–evidence from clinical studies with CRH1 receptor antagonists. Eur J Pharmacol. 2008;583(2-3):350–7.

Holsboer F, Lauer CJ, Schreiber W, Krieg JC. Altered hypothalamic-pituitary-adrenocortical regulation in healthy subjects at high familial risk for affective disorders. Neuroendocrinology. 1995 Oct;62(4):340-7.

Hughes RN. Effects of age on novelty reactions and exploration in rats. Q J Exp Psychol. 1968;20(2):189-92.

Iny LJ, Gianoulakis C, Palmour RM, Meaney MJ. The beta-endorphin response to stress during postnatal development in the rat. Brain Res. 1987;428(2):177-81.

Jacobson-Pick S, Elkobi A, Vander S, Rosenblum K, Richter-Levin G. Juvenile stress-induced alteration of maturation of the GABAA receptor alpha subunit in the rat. Int J Neuropsychopharmacol. 2008;11(7):891–903.

Jakovcevski M, Schachner M, Morellini F. Individual variability in the stress response of C57BL/6J male mice correlates with trait anxiety. Genes Brain Behav.2008;7(2):235-43.

Joëls M, Baram TZ. The neuro-symphony of stress. Nat Rev Neurosci. 2009;10(6):459-66.

Kalinichev M, Easterling KW, Plotsky PM, Holtzman SG. Long-lasting changes in stress-induced corticosterone response and anxiety-like behaviors as a consequence of neonatal maternal separation in Long-Evans rats. Pharmacol Biochem Behav. 2002;73(1):131-40.

Kapoor A, Dunn E, Kostaki A, Andrews MH, Matthews SG. Fetal programming of hypothalamo-pituitary-adrenal function: prenatal stress and glucocorticoids. J Physiol. 2006;572(Pt 1):31–44.

Kaufman J, Birmaher B, Perel J, Dahl RE, Moreci P, Nelson B, Wells W, Ryan ND.The corticotropin-releasing hormone challenge in depressed abused, depressed non abused, and normal control children. Biol Psychiatry. 1997;42(8):669-79.

Kawakami SE, Quadros IM, Takahashi S, Suchecki D. Long maternal separation accelerates behavioural sensitization to ethanol in female, but not in male mice. Behav Brain Res. 2007;184(2):109-16.

Keegan CE, Herman JP, Karolyi IJ, O Shea KS, Camper SA, Seasholtz AF. Differential expression of corticotropin-releasing hormone in developing mouse embryos and adult brain. Endocrinology. 1994;134(6):2547–55.

Kendler KS, Bulik CM, Silberg J, Hettema JM, Myers J, Prescott CA. Childhood sexual abuse and adult psychiatric and substance use disorders in women: an epidemiological and cotwin control analysis. Arch Gen Psychiatry. 2000;57(10):953-9.

Kent S, Kernahan SD, Levine S. Effects of excitatory amino acids on the hypothalamic-pituitary-adrenal axis of the neonatal rat. Brain Res Dev Brain Res. 1996;94(1):1–13.

Kent S, Tom C, Levine S. Effect of Interleukin-1beta on Pituitary-Adrenal Responses and Body Weight in Neonatal Rats: Interaction with Maternal Deprivation. Stress. 1997;1(4):213-230.

Kessler RC, Berglund PA, Foster CL, Saunders WB, Stang PE, Walters EE. Social consequences of psychiatric disorders, II: Teenage parenthood. Am J Psychiatry. 1997;154(10):1405-11.

Koksma JJ, van Kesteren RE, Rosahl TW, Zwart R, Smit AB, Luddens H, Brussaard AB. Oxytocin regulates neurosteroid modulation of GABA(A) receptors in supraoptic nucleus around parturition. J Neurosci. 2003;23(3):788-97.

Konrad C, Engelien A, Schoning S, Zwitserlood P, Jansen A, Pletziger E, Beizai P, Kersting A, Ohrmann P, Luders E, Greb RR, Heindel W, Arolt V, Kugel H. The functional anatomy of semantic retrieval is influenced by gender, menstrual cycle, and sex hormones. J Neural Transm. 2008;115(9):1327-37.

Kovács KJ, Mezey E. Dexamethasone inhibits corticotropin-releasing factor gene expression in the rat paraventricular nucleus. Neuroendocrinology. 1987;46(4):365-8.

Lambert JJ, Belelli D, Peden DR, Vardy AW, Peters JA. Neurosteroid modulation of GABAA receptors. Prog Neurobiol. 2003;71(1):67-80.

Lehmann J, Pryce CR, Bettschen D, Feldon J. The maternal separation paradigm and adult emotionality and cognition in male and female Wistar rats. Pharmacol Biochem Behav. 1999;64(4):705–15.

Levine S, Berkenbosch F, Suchecki D, Tilders FJ. Pituitary-adrenal and interleukin-6 responses to recombinant interleukin-1 in neonatal rats. Psychoneuroendocrinology. 1994;19(2):143-53.

Levine S, Huchton DM, Wiener SG, Rosenfeld P. Time course of the effect of maternal deprivation on the hypothalamic-pituitary-adrenal axis in the infant rat. Dev Psychobiol. 1991;24(8):547-58.

Levine S. Primary social relationships influence the development of the hypothalamic–pituitary–adrenal axis in the rat. Physiol Behav. 2001;73(3):255–60.

Li GD, Chiara DC, Sawyer GW, Husain SS, Olsen RW, Cohen JB. Identification of a GABAA receptor anesthetic binding site at subunit interfaces by photolabeling with an etomidate analog. J Neurosci. 2006;26(45):11599-605.

Liggins GC. The role of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis in preparing the fetus for birth. Am J Obstet Gynecol. 2000;182(2):475-7.

Lister RG. Ethologically-based animal models of anxiety disorders. Pharmacol Ther. 1990;46(3):321-40.

Loman MM, Gunnar MR. Early experience and the development of stress reactivity and regulation in children. Neurosci Biobehav Rev. 2009, in press

Lurie S, Kuhn C, Bartolome J, Schanberg S. Differential sensitivity to dexamethasone suppression in an animal model of the DST. Biol Psychiatry. 1989;26(1):26-34.

Maguire EA, Burgess N, O'Keefe J. Human spatial navigation: cognitive maps, sexual dimorphism, and neural substrates. Curr Opin Neurobiol.1999;9(2):171-7.

Maguire JL, Stell BM, Rafizadeh M, Mody I. Ovarian cycle-linked changes in GABA(A) receptors mediating tonic inhibition alter seizure susceptibility and anxiety. Nat Neurosci. 2005;8(6):797-804.

Mannie ZN, Harmer CJ, Cowen PJ. Increased waking salivary cortisol levels in young people at familial risk of depression. Am J Psychiatry. 2007;164(4):617–21.

Marx CE, Stevens RD, Shampine LJ, Uzunova V, Trost WT, Butterfield MI, Massing MW, Hamer RM, Morrow AL, Lieberman JA. Neuroactive steroids are altered in schizophrenia and bipolar disorder: relevance to pathophysiology and therapeutics. Neuropsychopharmacology. 2006;31(6):1249-63.

McEwen B, Lasley EN. O fim do estresse como nós o conhecemos. Rio de Janeiro, RJ: Edt Nova Fronteira, 2003.

McEwen BS. Hormones as regulators of brain development: life-long effects related to health and disease. Acta Paediatr Suppl. 1997;422:41-4.

McEwen BS. Stress, adaptation, and disease. Allostasis and allostatic load. Ann N Y Acad Sci. 1998;840:33–44.

McKernan RM, Whiting PJ. Which GABAA-receptor subtypes really occur in the brain? Trends Neurosci. 1996;19(4):139-43.

Mello AF, Juruena MF, Pariante CM, Tyrka AR, Price LH, Carpenter LL, et al. Depression and stress: is there an endophenotype?. Rev Bras Psiquiatr. 2007;29(1):13.

Meyer JS. Biochemical effects of corticosteroids on neural tissues. Physiol Rev. 1985;65(4):946-1020.

Michael Kaplan E, DuPont RL. Benzodiazepines and anxiety disorders: a review for the practicing physician. Curr Med Res Opin. 2005;21(6):941-50.

Mihalek RM, Banerjee PK, Korpi ER, Quinlan JJ, Firestone LL, Mi ZP, Lagenaur C, Tretter V, Sieghart W, Anagnostaras SG, Sage JR, Fanselow MS, Guidotti A, Spigelman I, Li Z, DeLorey TM, Olsen RW, Homanics GE. Attenuated sensitivity to neuroactive steroids in gamma-aminobutyrate type A receptor delta subunit knockout mice. Proc Natl Acad Sci U S A. 1999;96(22):12905-10.

Mihic SJ, Ye Q, Wick MJ, Koltchine VV, Krasowski MD, Finn SE, Mascia MP, Valenzuela CF, Hanson KK, Greenblatt EP, Harris RA, Harrison NL. Sites of alcoholand volatile

anaesthetic action on GABA(A) and glycine receptors. Nature. 1997;389(6649):385-9.

Miller AH, Spencer RL, Pulera M, Kang S, McEwen BS, Stein M. Adrenal steroid receptor activation in rat brain and pituitary following dexamethasone: implications for the dexamethasone suppression test. Biol Psychiatry. 1992;32(10):850-69.

Misslin R Cigrang M. Does neophobia necessarily imply fear or anxiety?; 1986. 12(1):45-50

Mody I. Aspects of the homeostaic plasticity of GABAA receptor-mediated inhibition. J Physiol. 2005;562(Pt 1):37-46.

Möhler H, Fritschy JM, Rudolph U. A new benzodiazepine pharmacology. J Pharmacol Exp Ther. 2002;300(1):2-8.

Moriceau S, Sullivan RM. Maternal presence serves as a switch between learning fear and attraction in infancy. Nat Neurosci. 2006a;9(8):1004–6.

Moriceau S, Wilson DA, Levine S, Sullivan RM. Dual circuitry for odor-shock conditioning during infancy: corticosterone switches between fear and attraction via amygdala. J Neurosci. 2006b;26(25):6737–48.

Morris HV, Dawson GR, Reynolds DS, Atack JR, Stephens DN. Both alpha2 and alpha3 GABAA receptor subtypes mediate the anxiolytic properties of benzodiazepine site ligands in the conditioned emotional response paradigm. Eur J Neurosci. 2006;23(9):2495-504.

Moscovitch M, Nadel L, Winocur G, Gilboa A, Rosenbaum RS. The cognitive neuroscience of remote episodic, semantic and spatial memory. Curr Opin Neurobiol. 2006;16(2):179-90

Mountjoy KG, Bird IM, Rainey WE, Cone RD. ACTH induces up-regulation of ACTH receptor mRNA in mouse and human adrenocortical cell lines. Mol Cell Endocrinol. 1994;99(1):R17-20.

Nagaya M, Arai M, Widmaier EP. Ontogeny of immunoreactive and bioactive microsomal steroidogenic enzymes during adrenocortical development in rats. Mol Cell Endocrinol. 1995;114(1-2):27–34.

Nemeroff CB. Psychopharmacology of affective disorders in the 21st century.Biol Psychiatry. 1998;44(7):517-25.

Nesse RM. Proximate and evolutionary studies of anxiety, stress and depression: synergy at the interface. Neurosci Biobehav Rev. 1999;23(7):895–903.

Newport DJ, Stowe ZN, Nemeroff CB. Parental depression: animal models of an adverse life event. Am J Psychiatry. 2002;159(8):1265–83.

O'Connor KA, Johnson JD, Hammack SE, Brooks LM, Spencer RL, Watkins LR, et al. Inescapable shock induces resistance to the effects of dexamethasone. Psychoneuroendocrinology. 2003;28(4):481–500.

O'Grady MP, Hall NR, Menzies RA. Interleukin-1 beta stimulates adrenocorticotropin and corticosterone release in 10-day-old rat pups.Psychoneuroendocrinology. 1993;18(3):241-7.

Oitzl MS, Fluttert M, de Kloet ER. The effect of corticosterone on reactivity to spatial novelty is mediated by central mineralocorticosteroid receptors. Eur J Neurosci. 1994;6(7):1072-9.

Okimoto DK, Blaus A, Schmidt MV, Schmidt M, Gordon MK, Dent GW, et al. Differential expression of c-fos and tyrosine hydroxylase mRNA in the adrenal gland of the infant rat: evidence for an adrenal hyporesponsive period. Endocrinology. 2002;143(5):1717–25.

Papadopoulos V, Berkovich A, Krueger KE, Costa E, Guidotti A. Diazepam binding inhibitor and its processing products stimulate mitochondrial steroid biosynthesis via an interaction with mitochondrial benzodiazepine receptors. Endocrinology. 1991a;129(3):1481-8.B

Papadopoulos V, Berkovich A, Krueger KE. The role of diazepam binding inhibitor and its processing products at mitochondrial benzodiazepine receptors: regulation of steroid biosynthesis. Neuropharmacology. 1991b;30(12B):1417-23.

Papadopoulos V, Brown AS. Role of the peripheral-type benzodiazepine receptor and the polypeptide diazepam binding inhibitor in steroidogenesis. J Steroid Biochem Mol Biol. 1995;53(1-6):103-10.

Paris JJ, Frye CA. Estrous cycle, pregnancy, and parity enhance performance of rats in object recognition or object placement tasks. Reproduction. 2008;136(1):105-15.

Parker KJ, Schatzberg AF, Lyons DM. Neuroendocrine aspects of hypercortisolism in major depression. Horm Behav. 2003;43(1):60–6.

Paul SM, Purdy RH. Neuroactive steroids. FASEB J. 1992 Mar;6(6):2311-22.

Poisbeau P, Cheney MC, Browning MD, Mody I. Modulation of synaptic GABAA receptor function by PKA and PKC in adult hippocampal neurons. J Neurosci. 1999;19(2):674–83.

Porcello DM, Huntsman MM, Mihalek RM, Homanics GE, Huguenard JR. Intact synaptic GABAergic inhibition and altered neurosteroid modulation of Thalamic relay neurons in mice lacking delta subunit. J Neurophysiol. 2003;89(3):1378-86.

Poulter MO, Du L, Weaver IC, Palkovits M, Faludi G, Merali Z, Szyf M, Anisman H. GABAA receptor promoter hypermethylation in suicide brain: implications for the involvement of epigenetic processes. Biol Psychiatry. 2008;64(8):645-52.

Prakash P, Merali Z, Kolajova M, Tannenbaum BM, Anisman H. Maternal factors and monoamine changes in stress-resilient and susceptible mice: cross-fostering effects. Brain Res. 2006;1111(1):122–33.

Protopopescu X, Butler T, Pan H, Root J, Altemus M, Polanecsky M, McEwen B, Silbersweig D, Stern E. Hippocampal structural changes across the menstrual cycle. Hippocampus. 2008;18(10):985-8.

Pryce CR, Rüedi-Bettschen D, Dettling AC, Weston A, Russig H, Ferger B, et al. Long-term effects of early-life environmental manipulations in rodents and primates: Potential animal models in depression research. Neurosci Biobehav Rev.2005;29(4-5):649–74.

Purdy RH, Morrow AL, Moore PH Jr, Paul SM. Stress-induced elevations of gamma-aminobutyric acid type A receptor-active steroids in the rat brain. Proc Natl Acad Sci U S A. 1991;88(10):4553-7.

Purdy RH, Morrow AL, Moore PH Jr, Paul SM. Stress-induced elevations of gammaaminobutyric acid type A receptor-active steroids in the rat brain. Proc Natl Acad Sci U S A. 1991;88(10):4553-7.

Ramos A, Pereira E, Martins GC, Wehrmeister TD, Izídio GS. Integrating the open field, elevated plus maze and light/dark box to assess different types of emotional behaviors in one single trial. Behav Brain Res. 2008;193(2):277-88.

Randall RD, Lee SY, Meyer JH, Wittenberg GF, Gruol DL. Acute alcohol blocks neurosteroid modulation of synaptic transmission and long-term potentiation in the rat hippocampal slice. Brain Res. 1995;701(1-2):238-48.

Reddy DS, Kulkarni SK. Role of GABA-A and mitochondrial diazepam binding inhibitor receptors in the anti-stress activity of neurosteroids in mice. Psychopharmacology (Berl). 1996;128(3):280–92.

Responses and Body Weight in Neonatal Rats: Interaction with Maternal Deprivation. Stress. 1997;1(4):213-230.

Reynolds DS, Rosahl TW, Cirone J, O'Meara GF, Haythornthwaite A, Newman RJ, Myers J, Sur C, Howell O, Rutter AR, Atack J, Macaulay AJ, Hadingham KL, Hutson PH, Belelli D, Lambert JJ, Dawson GR, McKernan R, Whiting PJ, Wafford KA. Sedation and anesthesia mediated by distinct GABA(A) receptor isoforms. J Neurosci. 2003;23(24):8608-17.

Rosenbaum RS, Priselac S, Kohler S, Black SE, Gao F, Nadel L, Moscovitch M. Remote spatial memory in an amnesic person with extensive bilateral hippocampal lesions. Nat Neurosci. 2000;3(10):1044-8.

Rosenfeld P, Suchecki D, Levine S. Multifactorial regulation of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis during development. Neurosci Biobehav Rev. 1992;16(4):553-68.

Rubin RT, Poland RE, Lesser IM, Martin DJ, Blodgett AL, Winston RA. Neuroendocrine aspects of primary endogenous depression. III. Cortisol secretion in relation to diagnosis and symptom patterns. Psychol Med. 1987;17(3):609-19.

Rudolph U, Möhler H. Analysis of GABAA receptor function and dissection of the pharmacology of benzodiazepines and general anesthetics through mouse genetics. Annu Rev Pharmacol Toxicol. 2004;44:475-98.

Rupprecht R. Neuroactive steroids: mechanisms of action and neuropsychopharmacological properties. Psychoneuroendocrinology. 2003;28(2):139-68.

Sachar EJ, Hellman L, Roffwarg HP, Halpern FS, Fukushima DK, Gallagher TF. Disrupted 24-hour patterns of cortisol secretion in psychotic depression. Arch Gen Psychiatry. 1973;28(1):19-24.

Sanchez-Perez AM, Messing RO. Supersensitivity to allosteric GABA(A) receptor modulators and alcohol in mice lacking PKCepsilon. Nat Neurosci. 1999;2(11):997-1002.

Sapolsky RM, Krey LC, McEwen BS, Rainbow TC. Do vasopressin-related peptides induce hippocampal corticosterone receptors?: Implications for aging. J Neurosci. 1984;4(6):1479–85.

Sapolsky RM, Krey LC, McEwen BS. The adrenocortical axis in the aged rat: impaired sensitivity to both fast and delayed feedback inhibition. Neurobiol Aging. 1986;7(5):331-5.

Sapolsky RM, Romero LM, Munck AU. How do glucocorticoids influence stress responses? Integrating permissive, suppressive, stimulatory, and reparative actions. Endocr Rev. 2000;21(1):55-89.

Schapiro S, Geller E, Eiduson S. Neonatal adrenal cortical response to stress and vasopressin. Proc Soc Exp Biol Med. 1962;109:937-41.

Schmidt M, Enthoven L, van Woezik JH, Levine S, de Kloet ER, Oitzl MS. The dynamics of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis during maternal deprivation. J Neuroendocrinol. 2004;16(1):52-7.

Schoofs D, Wolf OT. Stress and memory retrieval in women: no strong impairing effect during the luteal phase. Behav Neurosci. 2009;123(3):547-54.

Schroeder RJ, Henning SJ. Roles of plasma clearance and corticosteroid-binding globulin in the developmental increase in circulating corticosterone in infant rats. Endocrinology. 1989;124(5):2612-8.

Seckl JR. Glucocorticoids, feto-placental 11 beta-hydroxysteroid dehydrogenase type 2, and the early life origins of adult disease. Steroids. 1997;62(1):89–94.

Selye H. The Significance Of The Adrenals For Adaptation. Science. 1937; 85(2201):247-248.

Selye H. The stress syndrome. The american Journal of Nursing. 1965; 65(3):97-99.

Serra M, Pisul MG, Dazzi L, Purdy RH, Biggio G. Prevention of the stress-induced increase in the concentration of neuroactive steroids in rat brain by long-term administration of mirtazapine but not of fluoxetine. J Psychopharmacol. 2002;16(2):133-8.

Shanks N, Meaney MJ. Hypothalamic-pituitary-adrenal activation following endotoxin administration in the developing rat: a CRH-mediated effect. J Neuroendocrinol. 1994;6(4):375-83.

Shea A, Walsh C, Macmillan H, Steiner M. Child maltreatment and HPA axis dysregulation: relationship to major depressive disorder and post traumatic stress disorder in females. Psychoneuroendocrinology. 2005;30(2):162-78.

Shear MK, Brunelli SR, Hofer MA. The effects of maternal deprivation and of refeeding on the blood pressure of infant rats. Psychosom Med. 1983;45(1):3-9.

Sher L. Combined dexamethasone suppression-corticotropin-releasing hormone stimulation test in studies of depression, alcoholism, and suicidal behavior. ScientificWorldJournal. 2006;6:1398-404.

Sher L. The role of the endogenous opioid system in the pathogenesis of anxiety disorders. Med Hypotheses. 1998;50(6):473-4.

Sieghart W, Sperk G. Subunit composition, distribution and function of GABA(A) receptor subtypes. Curr Top Med Chem. 2002;2(8):795-816.

Sieghart W. Structure and pharmacology of gamma-aminobutyric acidA receptor subtypes. Pharmacol Rev. 1995;47(2):181-234.

Sigel E, Buhr A. The benzodiazepine binding site of GABAA receptors. Trends Pharmacol Sci. 1997;18(11):425-9.

Sillaber I, Panhuysen M, Henniger MS, Ohl F, Kühne C, Pütz B, et al. Profiling of behavioral changes and hippocampal gene expression in mice chronically treated with the SSRI paroxetine. Psychopharmacology (Berl). 2008;200(4):557–72.

Smith MA, Kim SY, van Oers HJ, Levine S. Maternal deprivation and stress induce immediate early genes in the infant rat brain. Endocrinology. 1997;138(11):4622–8.

Southwick SM, Vythilingam M, Charney DS. The psychobiology of depression and resilience to stress: implications for prevention and treatment. Annu Rev Clin Psychol. 2005;1:255-91.

Spielberger C: Manual for the State-Trait Anxiety Inventory. Revised edition. Palo Alto, Calif, Consulting Psychologists Press, 1983.

Spiers HJ, Burgess N, Hartley T, Vargha-Khadem F, O'Keefe J. Bilateral hippocampal pathology impairs topographical and episodic memory but not visual pattern matching. Hippocampus. 2001;11(6):715-25.

Spruston N, McBain C. Structural and functional properties of hippocampal neurons. In: Andersen P, Morris R, Amaral D, Bliss T, O´Keef J, eds. The hippocampus book. New York: Oxford University Press; 2007. p.133-201.

Stanton ME, Gutierrez YR, Levine S. Maternal deprivation potentiates pituitary-adrenal stress responses in infant rats. Behav Neurosci. 1988;102(5):692-700.

Stell BM, Brickley SG, Tang CY, Farrant M, Mody I. Neuroactive steroids reduce neuronal excitability by selectively enhancing tonic inhibition mediated by delta subunitcontaining GABAA receptors. Proc Natl Acad Sci U S A. 2003;100(24):14439-44.

Sterling, P. & J. Eyer. 1998. Allostasis : A new paradigm to explain arousal pathology. In Handbook of Life Stress, Cognition and Health. S Fisher and J Reason, Eds.: 629-649. John Wiley & Sons. New York.

Suchecki D, Duarte Palma B, Tufik S. Pituitary-adrenal axis and behavioural responses of maternally deprived juvenile rats to the open field. Behav Brain Res. 2000;111(1-2):99-106.

Suchecki D, Nelson DY, Van Oers H, Levine S. Activation and inhibition of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis of the neonatal rat: effects of maternal deprivation. Psychoneuroendocrinology. 1995;20(2):169–82.

Suchecki D, Rosenfeld P, Levine S. Maternal regulation of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis in the infant rat: the roles of feeding and stroking. Brain Res Dev Brain Res. 1993;75(2):185-92.

Suchecki D, Tufik S. Long-term effects of maternal deprivation on the corticosterone response to stress in rats. Am J Physiol. 1997;273(4 Pt 2):1332.

Sutanto W, Rosenfeld P, de Kloet ER, Levine S. Long-term effects of neonatal maternal deprivation and ACTH on hippocampal mineralocorticoid and glucocorticoid receptors. Brain Res Dev Brain Res. 1996;92(2):156–63.

Swaab DF, Bao AM, Lucassen PJ. The stress system in the human brain in depression and neurodegeneration. Ageing Res Rev. 2005;4(2):141–94.

Szyf M. DNA methylation and cancer therapy. Drug Resist Updat. 2003;6(6):341-53.

Teicher MH, Andersen SL, Polcari A, Anderson CM, Navalta CP, Kim DM. The neurobiological consequences of early stress and childhood maltreatment. Neurosci Biobehav Rev. 2003;27(1-2):33–44.

Teixeira-Silva F, Dias Antunes F, Santos Silva PR, Goes TC, Dantas EC, Santiago MF, Machado de Andrade R. The free-exploratory paradigm as a model of trait anxiety in rats: test-retest reliability. Physiol Behav. 2009;96(4-5):729-34.

Thoeringer C, Erhardt A, Sillaber I, Mueller M, Ohl F, Holsboer F, Keck M. Long-term anxiolytic and antidepressant-like behavioural effects of tiagabine, a selective GABA transporter-1 (GAT-1) inhibitor, coincide with a decrease in HPA system activity in C57BL/6 mice. J Psychopharmacol. 2009 in press

Tiba PA, Tufik S, Suchecki D. Effects of maternal separation on baseline sleep and cold stress-induced sleep rebound in adult Wistar rats. Sleep. 2004;27(6):1146-53.

Tiba PA, Tufik S, Suchecki D. Long lasting alteration in REM sleep of female rats submitted to long maternal separation. Physiol Behav. 2008 ;93(3):444-52.

Tinbergen N. On the aims and methods of ethology. Zeitschrift fur Tierpsychol 1963;20:410–63.

Treit D. Animal models for the study of anti-anxiety agents: a review. Neurosci Biobehav Rev. 1985;9(2):203-22.

Tunnicliff G, Malatynska E. Central GABAergic systems and depressive illness. Neurochem Res 2003;28:965–976.

Tyrka AR, Price LH, Gelernter J, Schepker C, Anderson GM, Carpenter LL. Interaction of Childhood Maltreatment with the Corticotropin-Releasing Hormone Receptor

Gene: Effects on Hypothalamic-Pituitary-Adrenal Axis Reactivity. Biol Psychiatry. 2009;66(7):681-5.

Tyrka AR, Wier L, Price LH, Ross N, Anderson GM, Wilkinson CW, et al. Childhood parental loss and adult hypothalamic-pituitary-adrenal function. Biol Psychiatry. 2008;63(12):1147–54.

van Oers HJ, de Kloet ER, Levine S. Early vs. late maternal deprivation differentially alters the endocrine and hypothalamic responses to stress. Brain Res Dev Brain Res. 1998a;111(2):245–52.

van Oers HJ, de Kloet ER, Li C, Levine S. The ontogeny of glucocorticoid negative feedback: influence of maternal deprivation. Endocrinology. 1998b;139(6):2838–46.

van Oers HJ, de Kloet ER, Whelan T, Levine S. Maternal deprivation effect on the infant's neural stress markers is reversed by tactile stimulation and feeding but not by suppressing corticosterone. J Neurosci. 1998c;18(23):10171-9.

van Oers HJ, de Kloet ER, Levine S. Persistent effects of maternal deprivation on HPA regulation can be reversed by feeding and stroking, but not by dexamethasone. J Neuroendocrinol. 1999;11(8):581–8.

van Wingen G, van Broekhoven F, Verkes RJ, Petersson KM, Backstrom T, Buitelaar J, Fernandez G. How progesterone impairs memory for biologically salient stimuli in healthy young women. J Neurosci. 2007;27(42):11416-23.

Vázquez DM. Stress and the developing limbic-hypothalamic-pituitary-adrenal axis. Psychoneuroendocrinology. 1998;23(7):663–700.

Viau V, Sharma S, Meaney MJ. Changes in plasma adrenocorticotropin, corticosterone, corticosteroid-binding globulin, and hippocampal glucocorticoid receptor occupancy/translocation in rat pups in response to stress. J Neuroendocrinol. 1996;8(1):1–8.

Wafford KA, Macaulay AJ, Fradley R, O'Meara GF, Reynolds DS, Rosahl TW. Differentiating the role of gamma-aminobutyric acid type A (GABAA) receptor subtypes. Biochem Soc Trans. 2004;32(Pt3):553-6.

Wafford KA, Thompson SA, Thomas D, Sikela J, Wilcox AS, Whiting PJ. Functional characterization of human gamma-aminobutyric acidA receptors containing the alpha 4 subunit. Mol Pharmacol. 1996;50(3):670-8.

Walker CD, Scribner KA, Cascio CS, Dallman MF. The pituitary-adrenocortical system of neonatal rats is responsive to stress throughout development in a time-dependent and stressor-specific fashion. Endocrinology. 1991;128(3):1385-95.

Walker CD, Tankosic P, Tilders FJ, Burlet A. Immunotargeted lesions of paraventricular CRF and AVP neurons in developing rats reveal the pattern of maturation of these systems and their functional importance. J Neuroendocrinol.1997;9(1):25-41.

Walker SJ, Vrana KE. Pituitary corticotroph function during the stress hyporesponsive period in neonatal rats. Neuroendocrinology.1993;57(6):1003-10.

Wei S, Feng Y, Kalinina E, Fricker LD. Neuropeptide-processing carboxypeptidases. Life Sci. 200327;73(6):655-62.

Widmaier EP. Changes in responsiveness of the hypothalamic-pituitary-adrenocortical axis to 2-deoxy-D-glucose in developing rats. Endocrinology. 1990;126(6):3116-23.

Wigger A, Sánchez MM, Mathys KC, Ebner K, Frank E, Liu D, et al. Alterations in central neuropeptide expression, release, and receptor binding in rats bred for high anxiety: critical role of vasopressin. Neuropsychopharmacology. 2004;29(1):1–14.

Wisden W, Herb A, Wieland H, Keinänen K, Lüddens H, Seeburg PH. Cloning, pharmacological characteristics and expression pattern of the rat GABAA receptor alpha 4 subunit. FEBS Lett. 1991;289(2):227-30.

Witek-Janusek L. Pituitary-adrenal response to bacterial endotoxin in developing rats. Am J Physiol. 1988;255(4 Pt 1):E525-30.

Wohlfarth KM, Bianchi MT, Macdonald RL. Enhanced neurosteroid potentiation of ternary GABA(A) receptors containing the delta subunit. J Neurosci. 2002;22(5):1541-9.

Yehuda R. Sensitization of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis in posttraumatic stress disorder. Ann N Y Acad Sci. 1997;821:57-75.

Yoo A, Harris J, Dubrovsky B. Dose-response study of Dehydroepiandrosterone sulfate on dentate gyrus long-term potentiation. Exp Neurol. 1996;137(1):151-6.

Zilz A, Li H, Castello R, Papadopoulos V, Widmaier EP. Developmental expression of the peripheral-type benzodiazepine receptor and the advent of steroidogenesis in rat adrenal glands. Endocrinology. 1999;140(2):859–64.

ABSTRACT

Adverse events in childhood have been associated to the development of psychopathologies, such as depression and anxiety disorders. In rats, stressful events during neonatal period, like 24h Maternal Deprivation (MD), may be an interesting tool to understand how stress during early life leads to changes in behavior and stress response in adulthood. According to some studies, MD on the 3rd day (MD 3-4) or 11th day (MD 11-12) of life results in opposite changes in the activity of the Hypothalamus-Pituitary-Adrenal (HPA) axis, i.e., hyper and hyporresponsiveness, respectively. Since in human beings psychopathologies has been related to impairment in resilience to stress the aim of this work was to investigate whether MD leads to long lasting changes in HPA axis functioning and differential behavioral features in animal models of anxiety. The results obtained indicate that only the ACTH release presented the pattern we hypothesized. Conversely the corticosterone (CORT) plasmatic levels do not reflect this pattern. Moreover, MD did not affect the CORT release in response to the Dexamethasone Suppression Test, indicating that there are MD did not alter the negative feedback system. Although MD did not lead to convincing alteration to CORT levels it did change anxiety-like behavior in the group MD 11-12. However this behavioral change did not seem to be mediated by expression of benzodiazepine site in GABAA receptors. The results indicate that even though the MD procedure does not lead to consistent changes in the peripheral component of the HPA axis it could still be an interesting animal model to study the

neurobiological underpinnings of how adverse events in early life increase the vulnerability to psychopathologies.

Keywords: maternal deprivation, stress, anxiety, HPA axis and GABAA receptors.

Bibliografia consultada

Paxinos G, ed. The rat nervous system, 3rd ed. San Diego, CA: Elsevier Academic Press; 2004.

Rother TR, Braga MER. Como elaborar sua tese: estrutura e referências. 2nd ed. São Paulo, SP: 2005.