

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

MARIA CAROLINA MICHALAK

**PAPEL DO ESTRESSE NEONATAL NO EFEITO DE MANUTENÇÃO DO
COMPORTAMENTO TIPO-DEPRESSIVO APÓS A INTERRUÇÃO DE
ESTRESSOR NA VIDA ADULTA**

CURITIBA

2017

MARIA CAROLINA MICHALAK

**AVALIAÇÃO DO EFEITO DO ESTRESSE PÓS-NATAL NA MANUTENÇÃO
DO FENÓTIPO TIPO DEPRESSIVO NA VIDA ADULTA APÓS
INTERRUPÇÃO DE ESTRESSE CRÔNICO DE IMOBILIZAÇÃO**

Monografia apresentada à disciplina
Estágio Supervisionado em Biologia
(BIO028), como requisito parcial à
conclusão da modalidade de
Bacharelado do Curso de Ciências
Biológicas, Universidade Federal do
Paraná

Orientador: Prof. Dr. Bruno Jacson
Martynhak.

Co-Orientador: Prof. Dr. Roberto
Andreatini

CURITIBA

2017

A todas as pessoas acometidas por transtornos psiquiátricos e suas comorbidades.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeira e principalmente ao meu orientador Bruno Jacson Martynhak, que não só me orientou durante a execução desse projeto, permitindo que eu participasse efetivamente desde a proposta do projeto até as interpretações dos resultados finais, mas também me concedeu todas as condições estruturais para tal, financiadas por ele mesmo. Bem como, pelo exemplo de cientista que é para mim e meus colegas de laboratório.

Agradeço ao Laboratório de Neurofisiologia, pelas instalações onde o projeto foi realizado.

À equipe do Biotério central da Universidade Federal do Paraná, que me proporcionou estrutura e serviços para a manutenção dos animais utilizados nesse estudo.

Às vidas dos animais utilizados na realização desse estudo.

Aos meus colegas de laboratório, pela ajuda sem a qual esse estudo não teria sido realizado: Betina Blum, Marina Saade, Kamila Costa, Franco Souza, Vinicius Guilhen.

À minha irmã Maria Beatriz Michalak, que não só me ajudou com incentivos, mas participou ativamente da execução desse estudo.

Aos meus pais Jorge Michalak e Edilene Michalak, que me proporcionaram a oportunidade de ir em busca dos meus sonhos.

Aos meus amigos que me motivaram e auxiliaram: Julie Esaki, Eduardo Martins, Esther Midori, Letícia Medeiros, Luís Henrique, Gustavo da Silve, Camila Pinotti, Mateus Leal.

E por fim, à minha querida amiga e eterna professora que me apresentou a Biologia e a ciência e me motivou, com suas ações, a me tornar bióloga, Icléa Brenneisen.

*“A ciência se compõe de erros que,
por sua vez, são passos até a
verdade”.*

(Júlio Verner)

RESUMO

Os transtornos psiquiátricos sabidamente são resultado da interação de fatores genéticos e fatores ambientais. Dentre os principais fatores ambientais que podem dispor um indivíduo a essa condição está o estresse crônico, motivo de inúmeras outras condições patológicas que acometem a sociedade atual. Inúmeros estudos com modelos animais já demonstraram os efeitos que o estresse crônico pode provocar no comportamento e na neurobiologia dos animais, porém, é frequente que ao fim dos protocolos de estresse, esses efeitos desapareçam quase que imediatamente. Contudo, um fator determinante das reações do organismo ao estresse é a fase do desenvolvimento em que o indivíduo é exposto. O estresse neonatal pode alterar a neurobiologia dos indivíduos podendo torná-los tanto susceptíveis como resilientes e interferir na maneira como lidam com novos eventos estressantes. Frente a isso, buscando aproximar os modelos das condições reais dos indivíduos acometidos, esse estudo teve como objetivo avaliar a manutenção dos efeitos do estresse após um protocolo de dois hits: separação materna de 14 dias (neonatal) e estresse de restrição de movimento de 21 dias (vida adulta). Os animais foram (40 machos e 37 fêmeas) avaliados através do teste de preferência por sacarose semanalmente durante o segundo hit de estresse e a recuperação e através de testes comportamentais como: campo aberto, reconhecimento de objetos, labirinto em cruz elevado e teste de suspensão pela cauda. Os resultados foram contraditórios e não corroboraram a hipótese proposta de que o estresse neonatal levaria a uma manutenção dos efeitos de um segundo hit de estresse na vida adulta. Contudo, sabe-se das dificuldades de avaliar efeitos comportamentais de estressores neonatais, devido à alta sensibilidade dos animais nessa fase a inúmeros fatores ambientais que interferem no protocolo.

Palavras-chave: Transtornos depressivos. Estresse crônico. Estresse pós-natal.

ABSTRACT

The psychiatric disorders are the results of an interaction between genetic and environmental factors. One of the main environmental factors that can dispose an individual to that condition is the chronic stress, reason of innumerable other pathological conditions that rush the actual society. Many studies that use animal models have already demonstrated the effects that the chronic stress can produce in the behavior and in the neurobiology of the animals, however it is usual that in the end of the stress protocols, these effects vanish almost immediately. Although, a determinant factor to the organism reactions to the stress is the individual developmental phase during the exposure. The neonatal stress can change the individual neurobiology making them become susceptible or resilient and interfering in the way they deal with new stressful events. According to that, seeking out approximate the animal models to the real conditions of the individual affected, this study had as goal to evaluate the maintenance of the stress effects after a two stress hits protocol: a 14 days maternal separation (neonatal) and a 21 days movement restriction protocol (adult life). The animals (40 males and 37 females) were evaluated through tests as like weekly sucrose preference test during the restraint stress protocol and recovery, and through behavioral tests as like: open field, novel object recognition, elevated plus maze and tail suspension test. The results were contradictory and do not corroborate the first hypothesis that the neonatal stressors would lead to the maintenance of the effects of the second stress hit in the adult life. However, it is known about the difficulties of evaluating the behavior effects of neonatal stress, due to the high sensibility of the animals in this phase to numerous environmental factors that interfere in the protocols.

Inglês

Key-words: Depressive disorders. Chronic stress. Post natal stress.

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	9
2	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	11
2.1	ESTRESSE CRÔNICO NA VIDA ADULTA	11
2.2	ESTRESSE CRÔNICO NA INFÂNCIA	15
2.3	RECUPERAÇÃO	18
3	OBJETIVOS	19
3.1	OBJETIVOS GERAIS	19
3.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	19
4	MATERIAIS E MÉTODOS	20
4.1	ANIMAIS	20
4.2	ESTRESSE CRÔNICO POR SEPARAÇÃO MATERNA	20
4.3	ESTRESSE CRÔNICO POR IMOBILIZAÇÃO	21
4.4	TESTES COMPORTAMENTAIS	22
4.4.1	PREFERÊNCIA POR SACAROSE	22
4.4.2	CAMPO ABERTO	23
4.4.3	RECONHECIMENTO DE NOVOS OBJETOS	23
4.4.4	LABIRINTO EM CRUZ ELEVADO	24
4.4.5	TESTE DE SUSPENSÃO PELA CAUDA	25
4.5	ANÁLISES ESTATÍSTICAS	25
5	RESULTADOS	25
5.1	PREFERÊNCIA POR SACAROSE	25
5.2	CAMPO ABERTO	27
5.3	TESTE DE SUSPENSÃO PELA CAUDA	28
5.4	LABIRINTO EM CRUZ ELEVADO	28
5.5	RECONHECIMENTO DE NOVOS OBJETOS	31
6	DISCUSSÃO E CONCLUSÃO	32
6.1	EFEITOS DO PROTOCOLO DE SEPARAÇÃO MATERNA	33
6.2	EFEITOS DO PROTOCOLO DE RESTRIÇÃO DE MOVIMENTO	34
7	REFERÊNCIAS	37

1 INTRODUÇÃO

Todos estamos propícios a situações estressantes ao longo da vida, sejam elas situações que ativem comportamentos de luta ou fuga, ou situações de estresse psicológico. Ao enfrentarmos situações como essas, alterações fisiológicas ocorrem e são capazes de mobilizar sistemas específicos do organismo com intuito de promover respostas adaptativas.

Uma das principais respostas provocadas pelo estresse é a ativação do eixo hipotálamo-pituitária-adrenal (HPA) que promove a liberação de hormônios glicocorticoides. Esses hormônios possuem o papel de mobilizar e inativar sistemas do organismo de acordo com suas atuações em respostas que permitiriam lidar com o risco eminente de perigo. Funções não inerentes a sobrevivência imediata com funções do sistema imune, funções hormonais como liberação do hormônio do crescimento e reprodução, funções relacionadas a memória, entre outras, são reduzidas pela atividade desses hormônios (Gee e Casey, 2015 e McEwen, 2006).

Contudo, o caráter adaptativo das respostas produzidas pela exposição ao estresse tende a perder essa característica quando a exposição passa a ser crônica. Ratos submetidos a um protocolo de estresse de restrição de movimento por um período de 21 dias, apresentam não apenas alterações comportamentais, mas na estrutura cerebral. As regiões da amígdala, do hipocampo e do córtex pré-frontal são áreas do cérebro envolvidas diretamente com respostas ao estresse, inclusive apresentarem receptores para hormônios glicocorticoides, mediadores do estresse.

Dentre as alterações estruturais encontradas estão a atrofia dendrítica apical e diminuição da arborização de neurônios piramidais no hipocampo e no córtex pré-frontal, sendo essas alterações reversíveis após recuperação. Entretanto as alterações provocadas pelo estresse na amígdala, como o aumento do comprimento dendrítico e da arborização continuam evidentes após um período de recuperação de 21 dias. A hiporresponsividade das áreas pré-frontais e do hipocampo e a hiperresponsividade da amígdala são também observadas por alterações em suas funcionalidades, que fletem no

comportamento dos animais. Esses animais tendem a ficar ansiosos e a apresentar déficits cognitivos, de memória e alterações de comportamentos sociais (Kooij *et al.*, 2014; Vyas, *et al.*, 2002, 2003 e 2004; Radley *et al.*, 2005 e Liston *et al.*, 2006).

A potencialidade dos efeitos que o estresse pode causar no sistema nervoso central está diretamente relacionada com o momento do desenvolvimento em que o cérebro se encontra e por quanto tempo o indivíduo é exposto ao estressor. Como o sistema nervoso central possui um desenvolvimento dinâmico, há momentos da vida do indivíduo em que sua neuroplasticidade se encontra aumentada, denominados períodos de sensibilidade. Embora esses períodos variem de estrutura para estrutura, de maneira geral, eles permeiam a infância e a adolescência.

Delinear esses períodos de sensibilidade é de extrema importância para o entendimento dos efeitos do estresse em diferentes fases da vida do organismo. Assim como podem também auxiliar no entendimento de processos que gerem sensibilidade ou resiliência e o mais importante, podendo apontar para períodos em que intervenções terapêuticas culminariam em resultados mais eficazes (Gee e Casey, 2015).

Para estudar esses períodos pode-se fazer uso de vários protocolos de estresse, sendo o principal deles o de separação materna. A premissa desse protocolo baseia-se nas características fixadas evolutivamente nos mamíferos, de maneira mais pronunciada, de cuidado parental e apego materno. Ao nascerem, esses indivíduos apresentam suas funções somatossensoriais muito imaturas, bem como suas funções motoras e seus mecanismos de controle de temperatura. Sem a proteção dos pais, esses organismos ficariam expostos a predadores e a condições ambientais, portanto o comportamento de apego materno se tornou adaptativo, uma vez que resulta em proteção, controle da temperatura e acesso a alimento (Moriceau e Sullivan, 2005).

Os efeitos do estresse neonatal podem, contudo, não ser percebidos no primeiro momento, uma vez que esse é um período de alta neuroplasticidade, característica que poderia permitir uma maior capacidade do indivíduo de lidar com o estressor. Entretanto, de maneira contraditória, há estudo que apontam

que o aumento da plasticidade neuronal pode atuar como uma fragilidade do SNC para com os efeitos do estresse, causando alterações capazes de perdurar até a vida adulta do indivíduo. Essas alterações seriam uma possível explicação para a susceptibilidade aumentada de alguns indivíduos a transtornos relacionados a situações de estresse (Gee e Casey, 2015).

Dessa forma, os objetivos deste estudo foram avaliar o processo de recuperação de uma exposição crônica a estresse na vida adulta, em camundongos submetidos ao protocolo de separação materna, buscando compreender os efeitos a longo prazo das respostas ao estresse nesse período de neuroplasticidade aumentada. A compreensão desse processo se faz necessária devido frequente susceptibilidade a doenças psiquiátricas que a exposição ao estresse na infância tem gerado.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 ESTRESSE CRÔNICO NA VIDA ADULTA

Atualmente os índices de pessoas acometidas por transtornos psiquiátricos tem aumentado ano após ano, sugerindo que vivemos uma epidemia de condições patológicas onde situações estressantes são um componente ambiental frequente. Estima-se que até 30% de um transtorno possa ser causado pela exposição ao estresse (Gee e Casey, 2015).

Estudos têm demonstrado que a exposição crônica, bem como a exposição durante períodos específicos de desenvolvimento, ao estresse, possui a capacidade de ativar respostas patológicas em diversos sistemas de maneira simultânea. (McEwen, 2006).

Sendo um dos sistemas preferencialmente afetados, o sistema nervoso central apresenta inúmeras respostas deletérias ao estresse crônico causando alterações em regiões cerebrais relacionadas a respostas emocionais, memória e cognição, como amígdala, hipocampo, córtex pré-frontal, entre outros.

Um dos principais modelos utilizados para estudar os efeitos do estresse crônico em animais é o modelo de estresse por restrição de movimento. Esse modelo desenvolvido para roedores conta com um aparato de forma cilíndrica onde o animal é colocado e tem seus movimentos contidos por um determinado período de tempo.

Vários autores já demonstraram que esse estressor aplicado de maneira crônica em roedores pode levar o animal a manifestar comportamentos tipo-depressivos como anedonia, medidos pelo teste de preferência por sacarose, e desamparo aprendido, medido tanto pelo teste do nado forçado como assim como pelo teste de suspensão pela cauda para camundongos. Sendo esses comportamentos inclusive revertidos com a utilização de drogas com efeito antidepressivos, como a Imipramina, fluoxetina e inclusive a quetamina, que tem se mostrado eficaz em pacientes refratários (Tan, et al.; 2017, Tong, et al.; 2017, Ding, et al.; 2016, Liu, et al.; 2016 e Christianses, et al.; 2011).

Vyas e colaboradores demonstraram em vários trabalhos (2002, 2003 e 2004) os efeitos neurobiológicos desse modelo de estresse crônico por restrição de movimentos em regiões como amígdala e hipocampo. Segundo Vyas esse modelo animal leva a um remodelamento dendrítico dos neurônios piramidais da região CA3 do hipocampo. Os neurônios hipocámpais sofrem um atrofia, ou seja, um encurtamento dos dendritos apicais, que parece justificar a diminuição do volume do hipocampo encontrada em pacientes com distúrbio depressivo maior, transtorno de estresse pós-traumático e síndrome de Cushing. Sendo o hipocampo a área majoritariamente responsável pelas memórias declarativas e aprendizado espacial, é possível verificar um prejuízo dessas funções em animais submetidos ao modelo de restrição de movimento, através de testes como o de reconhecimento de objetos e o de localização de objetos (Dong, et al.; 2017).

Supõem-se que as alterações encontradas no hipocampo sejam mediadas pela exposição exacerbada a glicocorticoides, causada pela desregulação do eixo HPA (Hipotálamo-Pituitária-Adrenal), que em resposta a estímulos estressantes crônicos apresenta hiperatividade. Essa hiperatividade pode ser mediada em partes pelo próprio hipocampo, uma vez que essa é uma

das regiões cerebrais que controla a atividade do eixo HPA via *feedback* negativo.

Outro efeito da exposição crônica a glicocorticoides do hipocampo é a redução da atividade de neurogênese mediada principalmente pelo fator neurotrófico derivado do cérebro (BDNF) (Wang et al., 2016). Porém, essas alterações hipocampais mencionadas parecem ocorrer apenas se a duração e o momento do desenvolvimento do indivíduo o tornarem susceptível a resposta crônica ao estresse.

Em relações aos efeitos provocados pelo estresse crônico no hipocampo, essa condição possui um efeito contrário na amígdala, que apresenta um aumento da atividade no modelo de estresse crônico por imobilização. Esse aumento da atividade deve ser mediado pelo aumento da arborização dendrítica encontrada em neurônios piramidais e estrelados da amígdala basolateral (BLA) no mesmo modelo animal. Esses dados podem explicar em partes o fenômeno da facilitação do aprendizado aversivo mediada pelo estresse, sendo o aprendizado aversivo uma competência da amígdala. Corroborando esses dados celulares, os animais submetidos ao protocolo de estresse por imobilização apresentaram também comportamento tipo ansioso, comportamento esse regulado em suma pela amígdala.

Diferentemente dos resultados obtidos para o hipocampo quanto a durabilidade dos efeitos do estresse crônico por imobilização, os efeitos encontrados na amígdala parecem ser duradouros, uma vez que análises realizadas 21 dias após o fim do protocolo de estresse demonstrou que os neurônios piramidais da BLA continuavam a apresentar hipertrofia.

Assim como o hipocampo, a amígdala possui interações com o eixo HPA que podem reforçar a hiperatividade desse, criando um “*looping*” bidirecional, onde a exposição exacerbada a glicocorticoides media a hiperatividade da amígdala, e essa por sua vez, contribui para a desregularização das funções do eixo HPA (Vyas, et al., 2002, 2003 e 2004).

Bem como a amígdala, o córtex pré-frontal (CPF) é uma região cerebral diretamente afetada pelos níveis de glicocorticoides, uma vez que, essa possui receptores para tais hormônios. A área do córtex pré-frontal desempenha um

papel fundamental na integração de informações sensoriais passadas e estímulos apresentados no presente, sendo responsável a principal região responsável pelo aprendizado de estímulo-resposta.

Especificamente o córtex pré-frontal medial (CPFm) é uma região relacionada a atenção e que integra o processamento de informações cognitivas e emocionais e assim, modula respostas ao estresse psicológico através do eixo HPA. Os prejuízos avaliados em transtornos psiquiátricos estão associados a estrutura e funções do CPF. Transtornos como transtorno de estresse pós-traumático (TEPT) apresentam alterações na região do CPFm e alguns estudos demonstraram que essas alterações apresentam semelhanças com alterações morfológicas encontradas em modelos animais de TEPT.

Modelos de estresse por contenção em roedores apresentam alterações de morfologia celular como uma atrofia do dendritos apicais e perda da espinha sináptica na região cortical. Especificamente no CPFm, foi encontrada uma diminuição de 20% do comprimento dos dendritos apicais de neurônios piramidais, assim como a diminuição da ramificação desses mesmos dendritos (Radley *et al.*, 2005, Liston *et al.*, 2006). Radley e colaboradores verificaram que essas alterações morfológicas se manifestam apenas com 3 semanas de protocolo de contenção, e esse mesmo período de tempo (3 semanas) é o suficiente para a recuperação completa da atrofia, após o termino do protocolo de estresse.

Dentre as funções do CPF também estão as funções executivas, relacionadas a planejamentos, flexibilidade de atenção e inibição de comportamentos. Em um estudo de 2012, Sheridan e colaboradores verificaram a relação entre o prejuízo das funções executivas e o baixo status socioeconômico em crianças de 8 a 12 anos. Utilizando imagens de ressonância magnética funcional durante a aplicação de um teste de aprendizado de estímulo-resposta foi verificado que crianças de famílias com baixo status socioeconômico apresentavam uma maior dificuldade para aprender novas regras de previsibilidade e recrutavam mais áreas do CPF para tal tarefa, quando comparadas a crianças de famílias com alto status socioeconômico.

Essas disparidades foram associadas a pobreza de linguagem utilizada pela família das crianças, fator que influencia diretamente o desenvolvimento do CPF, que possui uma maturidade tardia quando comparada a outras áreas cerebrais. Bem como, foi relacionada a um aumento do nível de cortisol circulante, fator relacionado ao ambiente estressor em que essas crianças de baixa classe social estão sujeitas. As conclusões desse estudo apontam que a exposição a fatores associados a baixa classe socioeconômica, como estresse de ambiente violentos e pobreza de estímulos cognitivos durante a infância, sujeitam o indivíduo a uma exposição exacerbada a glicocorticoides e afetam a funcionalidade do CPF.

Portanto fica claro que o estresse quando crônico pode perder sua característica de promotor de adaptabilidade e criar condições patológicas em várias áreas cerebrais. Contudo, o momento e a duração da exposição ao estresse podem ser fatores determinantes para a característica de seus efeitos.

2.2 ESTRESSE CRÔNICO NA INFÂNCIA

Durante o desenvolvimento o organismo passa por períodos de sensibilidade, que são períodos onde a neuroplasticidade encontra-se aumentada. É durante esses períodos que o cérebro se torna extremamente susceptível a fatores ambientais. Mesmo que varie de estrutura para estrutura, em geral, o período sensível ocorre durante a infância e adolescência dos organismos.

A exposição ao estresse durante esses períodos pode gerar respostas contraditórias uma vez que o aumento da plasticidade pode aumentar a capacidade do indivíduo de lidar com a situação estressante, ou aumentar as consequências do estresse de uma forma não adaptativa. Essa contradição se dá pelo fato de durante os períodos sensíveis o cérebro possuir uma maior capacidade de se remodelar, contudo esse remodelamento pode gerar consequências prejudiciais a condição do indivíduo, manifestando-se apenas tardiamente.

Delinear esses períodos sensíveis torna-se extrema importância, pois pode revelar como os efeitos do estresse se manifestam dependendo de em

que fase da vida e quanto dura a exposição ao estresse, podendo gerar também informações sobre quais momentos seriam mais propícios a intervenções terapêuticas. Por esse motivo os estudos qualitativos e quantitativos têm sido feitos em diferentes fases da vida em modelos animais (Gee e Casey, 2015).

Os protocolos de estresse na vida infantil geralmente envolvem um período de separação dos neonatos da mãe, uma vez que durante as primeiras horas após o nascimento, os filhotes de roedores já começam a expressar um comportamento de preferência pelo odor da mãe. Embora em todas as espécies que expressem cuidado parental os neonatos se apeguem aos cuidadores nas primeiras horas de vida, em mamíferos, esse comportamento é pronunciado e resulta inclusive na tolerância a abusos durante esse período.

Um provável motivo para o sistema de aprendizado dos recém-nascidos de roedores exacerbar o comportamento de preferência pelo odor da mãe é a imaturidade de suas funções somatossensoriais, o que lhes confere extrema dependência, uma vez que o cuidador lhe fornece alimento (leite materno) e o neonato é incapaz de forragear. Os pais também são responsáveis, nessa fase, por auxiliar no controle térmico e por fornecer proteção contra predadores, já que o neonato tem olfato, visão e funções motoras muito imaturas.

A dependência neonatal irá garantir a sobrevivência do filhote e por esse motivo, do dia pós-natal (DPN) 1 até o DPN 9, o filhote não somente apresenta uma preferência pelo odor da mãe, mas também é imune ao aprendizado aversivo. Como esses não conseguem andar nos primeiros dias após o nascimento, a mãe acaba exibindo comportamentos um tanto áspero com os filhotes, por muitas vezes os pisoteado ou os carregando pelas pernas, ao invés da nuca. No entanto, em nenhum momento os filhotes adquirem aversão ao seu odor.

Experimentos foram realizados com ratos neonatos expondo-os ao odor da mãe e ao mesmo tempo a estímulos aversivos, como choques, e como resultado os neonatos não demonstraram aquisição de aversão durante os primeiros 10 dias de vida. Entretanto, quando o mesmo protocolo foi realizado

com roedores no DPN 12, foi possível verificar aversão, apresentado no dia posterior ao protocolo. Esse período (DPN 0 até o DPN10), também denominado período sensitivo, possivelmente termina no DPN 10 por coincidir com o início do desenvolvimento da habilidade motora de locomoção dos neonatos. Dessa forma, o aprendizado aversivo se torna essencial, uma vez que os filhotes começarão a deixar o ninho e se expor, sem a supervisão materna, a situações potencialmente perigosas.

O sistema de aprendizado vigente durante o período sensitivo é regulado por três áreas cerebrais: o bulbo-olfatório, o locus coeruleus e a amígdala. Enquanto o locus coeruleus media o aprendizado de preferência por odor no bulbo olfatório, através da liberação de grandes quantidades de noradrenalina, é na amígdala que ocorre a prevenção do aprendizado aversivo, devido a sua imaturidade e falta de conexões com outras áreas cerebrais.

A amígdala se torna funcional nos neonatos por volta do DPN 10 e só alcançará sua maturidade plena no DPN 30. Ela é responsável pelo aprendizado de comportamentos aversivos condicionados por funções olfativas, comportamentos inibitórios e evitação passiva, comportamentos que só passam a ser expressos pelos roedores após o DPN 10.

No entanto, essas funções expressas pela amígdala possuem uma forte relação com a atividade do eixo HPA. Durante o período sensitivo (DPN 0 – DPN 10), o eixo HPA possui baixa responsividade, bem como a amígdala que ainda está imatura. Dessa forma, a liberação de glicocorticoides frente a estímulos estressores é extremamente reduzida. Quando submetidos a uma dose intraperitoneal de corticosterona (CORT) nessa fase, ratos neonatos não aprendem a preferência pelo odor da mãe quando expostos a um choque, aprendizado que normalmente ocorre na ausência de altos níveis de CORT no período sensitivo. De mesmo modo é possível observar que em neonatos no DPN 12, quando privados da liberação de CORT, não são capazes de aprender a aversão ao odor na presença de estímulo aversivo. Esses dados demonstram que os níveis de glicocorticoides aos quais os neonatos são expostos são peças chave de seu sistema de aprendizado.

As influências mediadas pela liberação de glicocorticoides não somente modulam o sistema de aprendizado de neonatos, mas também afetam o desenvolvimento de várias áreas cerebrais, dentre elas a amígdala. Vários estudos demonstram que quando submetidos a um protocolo de 21 dias de estresse pós-natal, os neonatos apresentam uma liberação exacerbada de CORT e dessa maneira uma maturidade precoce da amígdala, que entra em hiperatividade. Esse cenário de hiperatividade da área na infância é relacionado a predisposição a desenvolvimento de transtornos psiquiátricos na vida adulta (Moriceau e Sullivan, 2005).

Como já mencionado, o aumento da atividade da amígdala e a diminuição da atividade pré-frontal em juvenis, parece levar a uma diminuição da capacidade de suprimir informações emocionalmente irrelevantes e levar a uma desregulação das emoções. O estresse neonatal adianta a formação da conectividade da amígdala com o córtex pré-frontal, da adolescência para a infância, e a aceleração da maturação dessa conectividade está associada a ansiedade na vida adulta. (Gee e Casey, 2015).

2.3 RECUPERAÇÃO

Um aspecto pouco estudado é o efeito de cronificação do comportamento tipo-depressivo após a interrupção de um estressor na vida adulta. Em modelos animais de estresse crônico brando e imprevisível, o aumento da preferência por sacarose ocorre logo após uma semana da interrupção do estresse (Rygula et al., 2013; Pothion et al., 2014). O mesmo efeito rápido de recuperação é observado após duas semanas quando a atividade locomotora espontânea no campo aberto, a avaliação do estado da pelagem e a ritmicidade locomotora circadiana são avaliados duas semanas após o término do estresse crônico (Logan et al., 2015).

Mais especificamente para o estressor utilizado neste estudo, após 21 da interrupção de um estresse de restrição de movimento de 21 dias, há uma reversão da redução da arborização dentrítica nos neurônios da região CA3. Porém, enquanto o estresse de restrição de movimentos induz aumento da

arborização dentrítica nos neurônios da amígdala basolateral, 21 dias de interrupção do estresse não são suficientes para a reversão à condição basal (Vyas et al., 2004).

Porém, dado o caráter recorrente dos transtornos de humor em pacientes, os modelos animais de estresse crônico levam um fenótipo consideravelmente efêmero, reduzindo sua validade de constructo. Portanto, levantamos a hipótese que um estressor neonatal possa levar a uma cronificação do comportamento tipo-depressivo em modelo adulto de depressão. Ou seja, que mesmo após a remoção do estresse crônico no adulto, os animais expostos à separação materna ainda apresentem comportamento tipo-depressivo.

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVOS GERAIS

Os objetivos desse projeto foram de avaliar o processo de recuperação da exposição ao estresse crônico na vida adulta (estresse por imobilização), em camundongos expostos ao protocolo de separação materna. O intuito desse estudo é compreender como o estresse aplicado durante uma fase de alta neuroplasticidade pode afetar comportamentos a longo prazo e predispor os indivíduos ao desenvolvimento de transtornos psiquiátricos.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar o efeito do estresse de imobilização sobre comportamentos tipo-depressivo e tipo-ansioso e sobre a memória;
- Avaliar o efeito da separação materna sobre comportamentos tipo-depressivo e tipo-ansioso e sobre a memória;
- Avaliar se a separação materna é capaz de tornar os indivíduos susceptíveis ou resilientes ao fenótipo tipo depressivo após o estresse de imobilização crônico;

- Analisar se o estresse na infância pode impedir a recuperação espontânea do fenótipo tipo depressivo após o estresse crônico de imobilização

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 ANIMAIS

Foram utilizados camundongos Swiss machos (52) e fêmeas (61) fornecidos pelo Biotério da Universidade Federal do Paraná. Os animais foram mantidos em um ambiente com temperatura controlada ($22\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$) e com fotoperíodo de 12/12 horas (em fase clara das 07:00 as 19:00 e em fase escura das 19:00 até as 07:00 do dia seguinte). Ficaram alojados em caixas de polipropileno ($28 \times 17 \times 14\text{ cm}^3$) com maravalha como cama. Água e ração pelletizada ficaram livremente disponível à vontade.

Este estudo foi realizado em acordo com o guia de Uso e Cuidado com animais, Instituto de Saúde dos Estados Unidos. Os protocolos estão de acordo com as recomendações da Universidade Federal do Paraná e foram submetidos a Comissão de Ética para o Uso de Animais do Setor de Ciências Biológicas da *Universidade Federal do Paraná (CEUA/BIO – UFPR)*.

4.2 ESTRESSE CRÔNICO POR SEPARAÇÃO MATERNA

As fêmeas adultas de camundongo Swiss (24) foram alojadas duas a duas e expostas a um macho adulto (12) durante o período de 15 dias. Após esse período os machos foram separados das fêmeas e elas alojadas individualmente. 5 dias após a individualização das fêmeas, as caixas foram inspecionadas diariamente a procura de neonatos. O dia do nascimento foi considerado o dia pós-natal 0 (DPN 0).

No DPN 0 foi realizado o *cross fostering* dos neonatos, que consiste em transferir parte dos animais de uma ninhada para outra, de idade semelhante, para que através da mistura das ninhadas se torne possível separar as influências genéticas e as influências ambientais no comportamento dos animais. Outros fatores como as contribuições maternas no fenótipo dos neonatos, feitas através do leite materno, também podem ser

observadas devido o *cross fostering* (Bartolomucci. A, et al., 2004). As ninhadas com número de animais semelhantes foram pareadas e tiveram metade dos neonatos transferidos para a sua ninhada par. As ninhadas pareadas foram aleatoriamente classificadas como controles e estressadas, sendo a ninhadas “estressadas” as que participaram do protocolo de separação materna.

A partir do DPN 1 até o DPN 14 foi realizado o protocolo de separação materna que consiste em manter os neonatos isolados da mãe por 3 horas/dias. Os neonatos foram alojados em uma caixa de polipropileno (28×17×14 cm³) com cepilho novo e permaneceram em uma sala exclusiva para a separação, com objetivo de evitar exposição mutua, entre mãe e filhotes, a vocalizações. Na sala de separação as caixas com as ninhadas permaneceram durante todo o período de separação sobre uma manta térmica elétrica para manter a temperatura na caixa a 32 °C ± 2 °C. Após o desmame (DPN 22) os filhotes foram separados da mãe, sexados e alojados em grupos, com seus irmãos do mesmo sexo até atingirem a vida adulta (DPN 60). A partir do DPN 60, os animais foram alojados individualmente em caixas de polipropileno (28×17×14 cm³) para a continuação dos experimentos (Kawakami, et al.; 2013; Kikusui, et al.; 2005).

4.3 ESTRESSE CRÔNICO POR IMOBILIZAÇÃO

A partir do DPN 63, metade dos animais controle no protocolo de separação materna (CONTROLES TOTAL: 40 sendo, 21 machos e 19 fêmeas) e metade dos animais que foi submetido ao protocolo de separação materna (SEPARAÇÃO TOTAL: 37 sendo, 19 machos e 18 fêmeas) foram submetidos a imobilização em falcons de 50 mL perfurados para permitir a circulação de ar, por 2 horas/dia durante a fase clara, por um período de 21 dias.

Após esse período, os animais foram submetidos a um regime de recuperação de 14 dias, onde serão manipulados apenas para higienização das caixas moradias e testes comportamentais. Ao fim dos protocolos de estresse e teste de comportamento os animais serão sacrificados por rápida

decapitação. Os cérebros serão rapidamente removidos e dissecados para posterior análises. (Vyas, et al.; 2002, 2003 e 2004)

Nº	Neonatal	Adulto	N
1	Controle	Controle	20 (10♂/ 10♀)
2	Estresse neonatal	Controle	20 (11♂/ 9♀)
3	Controle	Estresse restrição	20 (11♂/ 9♀)
4	Estresse neonatal	Estresse restrição	17 (8♂/ 9♀)

4.4 TESTES COMPORTAMENTAIS

Os testes comportamentais foram realizados em dois momentos diferentes: primeiramente após a detecção de anedonia, avaliada pelo teste de preferência por sacarose, com objetivo de avaliar funções relacionadas as principais áreas cerebrais afetadas pelos efeitos do estresse. E por fim, ou após o regime de recuperação de 14 dias visando avaliar se após recuperação os parâmetros comportamentais foram ou não reestabelecidos.

4.4.1 PREFERÊNCIA POR SACAROSE

Os animais passarão primeiramente por uma habituação de 3 dias, onde ficaram expostos as primeiras 24 horas exclusivamente a uma garrafa com solução 2,0 % de sacarose, e os 2 dias seguintes a duas garrafas, uma contendo solução de sacarose e outra contendo apenas água. Passadas 24 horas após a habituação foi iniciado o teste de preferência por sacarose. Os animais ficaram expostos por 24 horas a uma garrafa de solução de sacarose 2,0 % e a outra garrafa contendo apenas água. As garrafas serão pesadas antes e após a realização do teste, possibilitando a quantificação do consumo. A preferência será expressa em percentagem de solução de sacarose consumida em relação à ingestão total de líquido.

4.4.2 CAMPO ABERTO

O teste do campo aberto é um teste desenvolvido para avaliar a atividade ambulatoria dos animais, bem como aspectos de subjetividade emocional, como comportamento tipo ansioso. A premissa da avaliação emocional se baseia no comportamento fixado evolutivamente em roedores de evitar ambientes claros, abertos e desconhecidos, pois neles, se tornariam presas fáceis (Seibenhener, M. L. et al., 2015).

O campo aberto consiste em uma arena circular plástica (40 cm de diâmetro e 28 cm de altura). Para realização do teste os animais foram ambientados na sala onde o teste será realizado por 1 hora. Em seguida os animais foram, um a um, colocados no centro do campo aberto e filmados por 10 minutos. Para análise dos parâmetros o software Smart Junior (Smart Junior, PanLab, Harvard Apparatus, Spain) foi utilizado e nele foram avaliados os seguintes aspectos: distância percorrida, número de quadrantes percorridos e tempo gasto no centro e na periferia da arena. Entre cada sessão de teste, a arena foi limpa com álcool 10% para apagar as pistas olfatórias deixadas pelo último animal a passar pelo protocolo.

4.4.3 RECONHECIMENTO DE NOVOS OBJETOS

O teste de reconhecimento de novos objetos é um teste utilizado desde 1980, quando foi desenvolvido baseado na observação do comportamento exploratório de roedores quando expostos a novidades no ambiente. Esse teste vem sendo utilizado para avaliação das funções cerebrais relacionadas a memória, uma vez que o teste conta com a observação de parâmetros comportamentais durante uma reexposição do animal a um objeto que já é conhecido. O teste consiste em duas sessões de apresentação do animal a uma dupla de objetos que devem ter o mesmo tamanho, porém textura e brilho diferentes (Lager, M. et al., 2013).

O teste foi realizado na mesma do teste de campo aberto e foi composto duas sessões com um intervalo de 1 horas entre elas: A sessão de familiarização e a sessão teste.

Durante a sessão de familiarização os animais foram apresentados a dois recipientes de vidro vazios, um em cada extremidade da arena. Cerca de 1 hora depois, foram expostos a um dos objetos utilizados na sessão de familiarização (recipiente de vidro vazio) e a um novo objeto, um recipiente de plásticos translúcido preenchido com pequenas pedras coloridas. Apenas a sessão teste foi filmada e os vídeos posteriormente analisados utilizando o software Smart Junior onde os parâmetros: tempo gasto explorando o objeto conhecido e tempo gasto explorando o objeto, novo foram quantificados. Os resultados foram expressos em um index de diferenciação (tempo gasto explorando o novo objeto/ tempo gasto explorando qualquer objeto).

Entre cada sessão de teste, a arena foi limpa com álcool 10% para apagar as pistas olfatórias deixadas pelo último animal a passar pelo protocolo.

4.4.4 LABIRINTO EM CRUZ ELEVADO

O teste do labirinto em cruz elevado foi desenvolvido sob a premissa de que os roedores possuem como um comportamento fixado evolutivamente de evitar espaços abertos, claros e desconhecidos, uma vez que ser tonariam presas fáceis a seus predadores (Arabo, A. et al., 2014). Baseado nesse conhecimento esse teste foi desenhado para medir o comportamento tipo ansioso em roedores expondo-os a um labirinto em formato de cruz, que fica acima do chão (50 cm) e possui um eixo com braços fechados (30x5x25 cm) por uma parede lateral e outro eixo com braços abertos (30x5 cm), apenas com uma base com bordas (0,5 cm).

Os animais foram colocados individualmente no centro do labirinto, voltados para um dos braços abertos e foram filmados durante 5 minutos. Os parâmetros analisados nos vídeos tanto com utilização de software (Smart Junior) e manualmente: tempo de permanência em cada braço do labirinto, bem como o número de comportamento de *head-dipping* (comportamento em que o animal coloca a cabeça para fora da plataforma para explorar), *stretched-attended posture* (o animal estica o corpo para explorar mais à frente de onde está e retrai o corpo novamente) e número de entradas nos braços abertos ou fechados.

4.4.5 TESTE DE SUSPENSÃO PELA CAUDA

O teste de suspensão pela cauda foi desenvolvido primeiramente com o intuito de medir o efeito de antidepressivos, assim como o teste de nado forçado. Porém, foi concluído após vários estudos, que esse também pode ser um teste para avaliar um comportamento tipo depressivo em modelos animais de depressão, tendo como premissa a dificuldade que tanto os animais quanto os pacientes expressam de lidar com situações estressantes, geralmente desistindo frente a elas (Cryan et al.; 2005). O teste baseia-se em suspender o animal pela cauda pelo menos 50 cm de uma superfície, utilizando uma fita adesiva. Durante a suspensão o animal foi filmado por 6 minutos e os vídeos foram posteriormente analisados, sendo o tempo de imobilidade do animal quantificado como parâmetro de avaliação.

4.5 ANÁLISES ESTATÍSTICAS

As análises estatísticas utilizadas nesse estudo foram ANOVA de medidas repetidas tendo como variáveis categóricas os fatores estresse por separação materna e estresse por restrição de movimento e como variáveis dependentes as medidas semanais de preferência por sacarose e o tempo de exploração do objeto familiar e do novo, no teste de reconhecimento de objetos. Para os demais testes foi utilizada a ANOVA fatorial, sempre tendo como variáveis categóricas o estresse neonatal e o estresse na vida adulta, e quando obtidos resultados significativos foi utilizado o teste post-hoc Newman-Keuls para comparações entre grupos.

5 RESULTADOS

5.1 PREFERÊNCIA POR SACAROSE

Foram obtidos efeitos significativos nas medidas de preferência por sacarose dos machos na terceira semana de estresse de restrição, sendo uma

redução significativa na preferência dos animais do grupo IMOB com relação a seus controles ($F_{(3,99)}= 3,4042$; $p= 0,01$). Após a primeira semana de recuperação, houve um aumento significativo do grupo de todos os grupos ($F_{(1,36)}$; $p=0,000002$) e uma queda significativa na segunda semana de recuperação ($F_{(1,36)}$; $p=0,001$).

Para as fêmeas, nenhum efeito dos protocolos de estresse especificamente foi significativo, apenas no fator semana, onde todos os animais, incluindo controles, tiveram uma redução significativa na segunda semana de estresse de restrição ($F_{(3,99)}=6,7740$; $p=0,0003$) e um aumento significativo na primeira semana de recuperação ($F_{(1,33)}=19,6379$; $p=0,0001$).

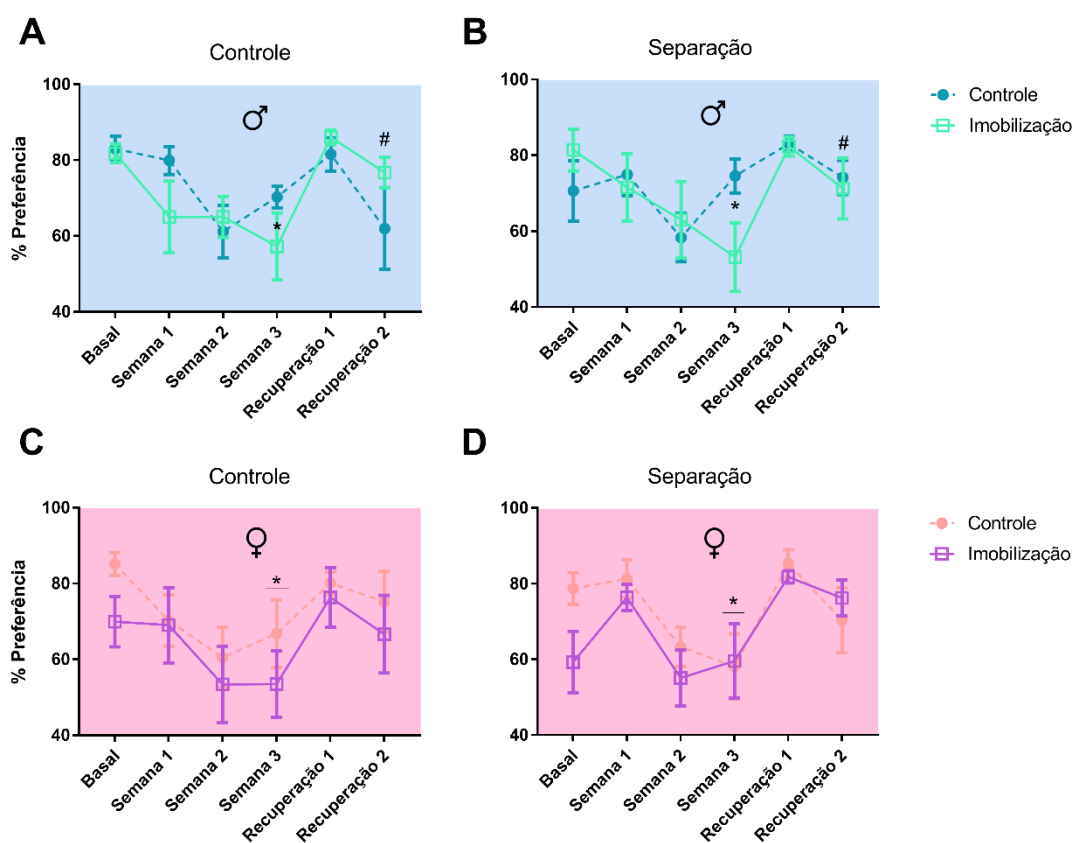


Figura 1. Percentual de preferência por sacarose medido semanalmente durante o segundo hit de estresse e a recuperação. (A) Grupo Machos CON-IMO e CON-COM; (B) Grupo Machos SEP-CON e SEP-IMO; (C) Grupo Fêmeas CON-IMO e CON-COM e (D) Grupo fêmeas SEP-CON e SEP-IMO. *= diferente das semanas de protocolos anteriores e #= diferente da semana de recuperação anterior.

5.2 CAMPO ABERTO

Na bateria de testes comportamentais realizada logo após o término do protocolo de restrição de movimento, foi verificado um aumento significativo quanto a medida de distância total percorrida para os machos nos grupos que passaram pelo protocolo de restrição de movimento (CON-IMOB e SEP-IMOB) ($F_{(1,36)}=7,4170$; $p=0,01$). Quanto a distância percorrida no centro da arena, foi observada uma diminuição significativa da distância percorrida no grupo de fêmeas que participou do protocolo de separação materna (SEP-COM e SEP-IMOB) ($F_{(1,26)}=5,4435$; $p=0,02$).

Logo após duas semanas de recuperação, em uma nova bateria de testes, foi verificada apenas uma diminuição na distância total percorrida nas fêmeas que passaram pelo estresse de restrição de movimento (CON-IMOB e SEP-IMOB) ($F_{(1,31)}=8,8680$; $p=0,005$).

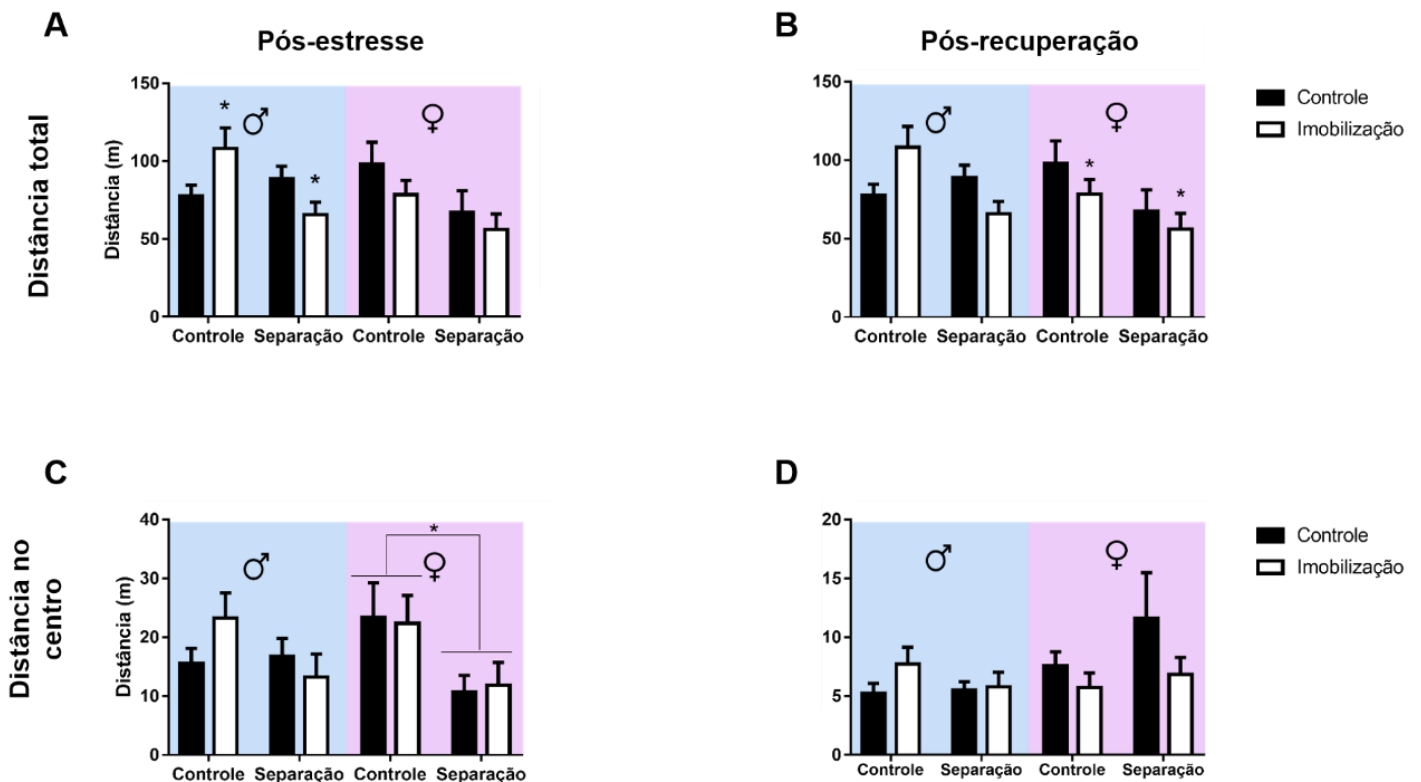


Figura 2. (A, B) Distância total percorrida no teste campo aberto logo após a interrupção do segundo hit e logo após o período de recuperação, respectivamente. (C,D) Distância percorrida na área central da arena no teste de campo aberto logo após a interrupção do segundo hit e

logo após o período de recuperação, respectivamente. *= significativo em comparação a seu respectivo controle.

5.3 TESTE DE SUSPENSÃO PELA CAUDA

Uma diminuição significativa de imobilidade, durante o teste de suspensão pela cauda, foi verificada nos amais fêmeas que passaram pelo estresse de imobilização (CON-IMOB e SEP-IMOB) durante a primeira bateria de testes comportamentais realizada logo após a interrupção do protocolo de estresse de restrição de movimento ($F_{(1,33)}=9,30060$; $p=0,004$).

Quanto a segunda bateria de testes comportamentais, realizada após duas semanas de recuperação, foi verificado um aumento significativo da imobilidade nos grupos de machos que passaram pelo protocolo de estresse por restrição de movimento (CON-IMOB e SEP-IMOB) ($F_{(1,35)}=4,3600$; $p=0,004$).

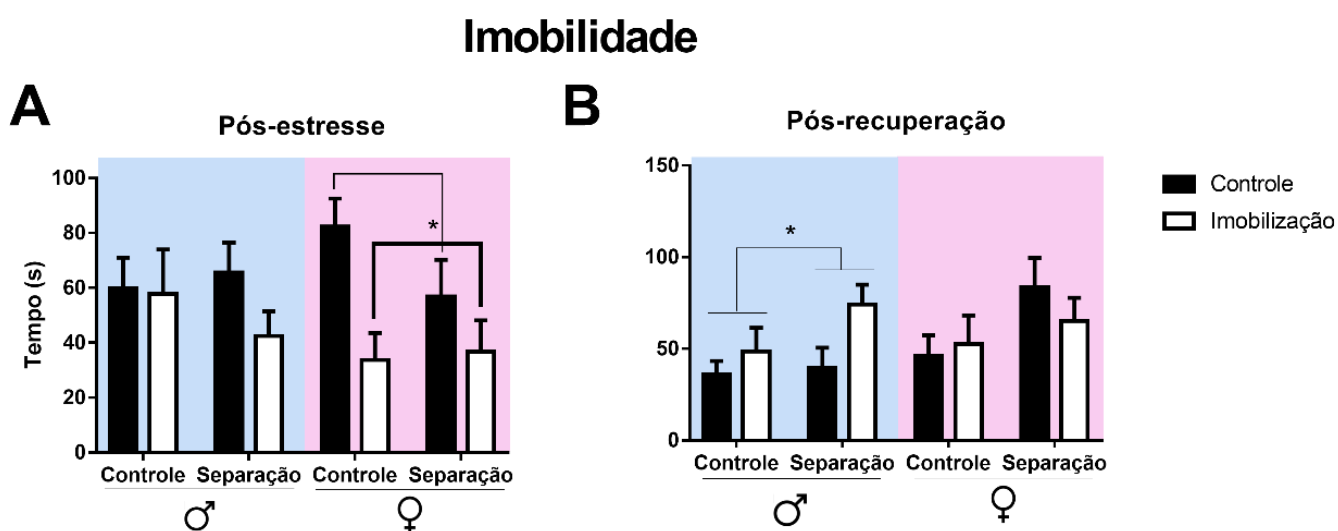


Figura 3. Tempo de imobilidade durante o teste de suspensão pela cauda (A) logo após a interrupção do segundo hit de estresse e (B) logo após o período de recuperação. *= significativo em comparação ao controle correspondente.

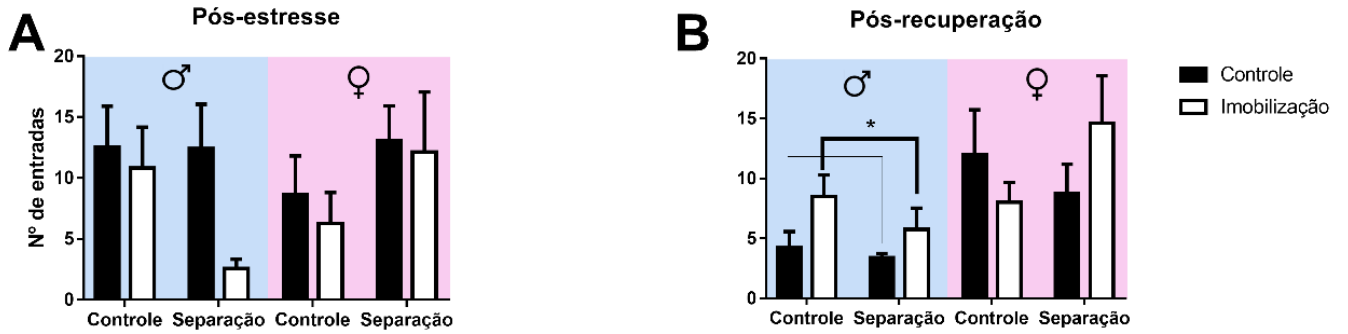
5.4 LABIRINTO EM CRUZ ELEVADO

Foi observado apenas um aumento significativo no número de entradas nos braços abertos para os grupos de machos que passaram pelo protocolo de estresse por restrição de movimento (CON-IMOB e SEP-COM) ($F_{(1,33)}=9,30060$; $p=0,004$) na segunda bateria testes, realizada logo após duas semanas de recuperação.

Quanto aos fatores etológicos avaliados durante o teste do labirinto em cruz elevado, realizado logo após o fim do segundo hit de estresse, foram observados um aumento tanto da frequência de head dipping ($F_{(1,30)}=4,6845$; $p=0,03$) quanto de stretched-attended posture ($F_{(1,30)}=7,2987$; $p=0,01$) para as fêmeas dos grupos que passaram pela separação materna (SEP-CON e SEP-IMOB) e um aumento na frequência de stretched-attended posture ($F_{(1,30)}=12,207$; $p=0,001$) nos grupos que passaram pelo protocolo de estresse por restrição de movimento, embora a interação dos dois hits de estresse (SEP-IMOB) não tenha sido significativa. No grupo dos machos, observou-se um aumento significativo da frequência de stretched-attended posture para o grupo SEP-IMOB ($F_{(1,34)}=5,3479$; $p=0,02$) e uma redução significativa da frequência de head dipping nos grupos que passaram pelo estresse de restrição de movimento ($F_{(1,34)}=5,8884$; $p=0,02$).

Após as duas semanas de recuperação, foi possível observar a penas a manutenção do aumento significativo da frequência de head dipping nos grupos de fêmeas que passaram pela separação materna ($F_{(1,30)}=5,1686$; $p=0,03$).

Nº de entradas no braço aberto



% de Tempo de permanência no braço aberto

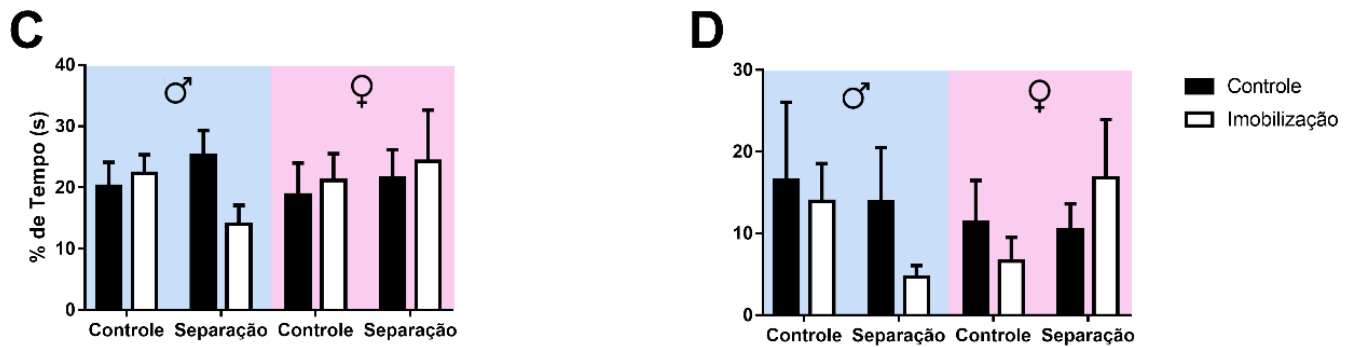


Figura 4. (A, B) Número de entradas nos braços abertos durante o teste no labirinto em cruz elevado logo após a interrupção do segundo hit de estresse e logo após o período de recuperação, respectivamente. (C, D) Percentual de tempo de permanência nos braços abertos no teste de labirinto em cruz elevado, logo após a interrupção do segundo hit de estresse e logo após o período de recuperação, respectivamente. * = significativo em comparação ao controle correspondente.

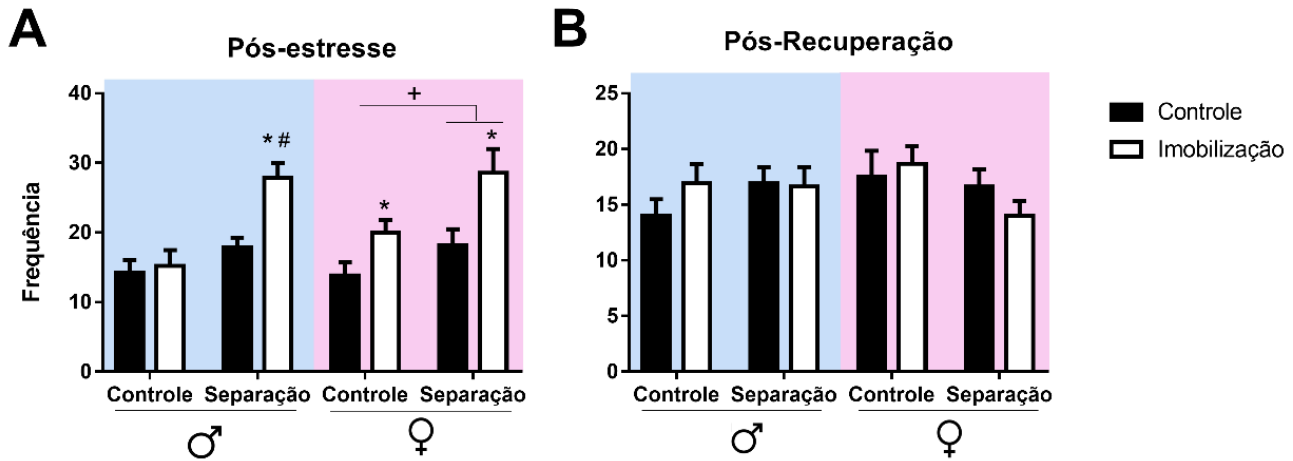


Figura 5. Frequência de *stretched-attended posture* durante o teste no labirinto em cruz elevado (A) logo após a interrupção do segundo hit de estresse e (B) logo após o período de recuperação. *= significativo em comparação ao controle correspondente, #= significativo em comparação com seu correspondente em outro fator e += significativo em comparação com o grupo controle correspondente.

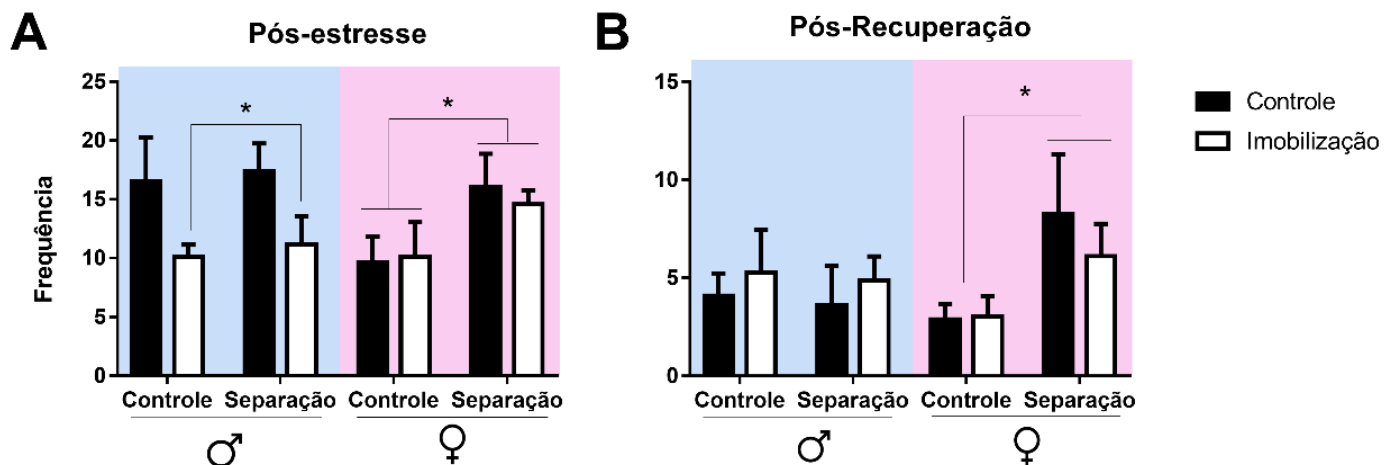


Figura 6. Frequência de *Head-dipping* durante o teste de labirinto em cruz elevado (A) logo após a interrupção do segundo hit de estresse e (B) logo após o período de recuperação. *= significativo em comparação ao controle correspondente

5.5 RECONHECIMENTO DE NOVOS OBJETOS

Na bateria de testes comportamentais realizada logo após o fim do protocolo de estresse por restrição de movimento foi observada um aumento no tempo de exploração do objeto familiar para os machos de maneira geral ($F_{(1,32)}=5,1397$; $p=0,03$).

Por sua vez, na bateria de testes comportamentais realizada após duas semanas de recuperação, foi detectado um aumento no tempo de exploração do objeto novo no grupo dos machos ($F_{(1,31)}=11,6739$; $p=0,001$) de maneira geral. Para o grupo de fêmeas, foi verificado um aumento, nessa mesma bateria, do tempo de exploração do objeto novo para todos os animais ($F_{(1,31)}=11,674$; $p=0,001$).

Tempo de exploração do objeto

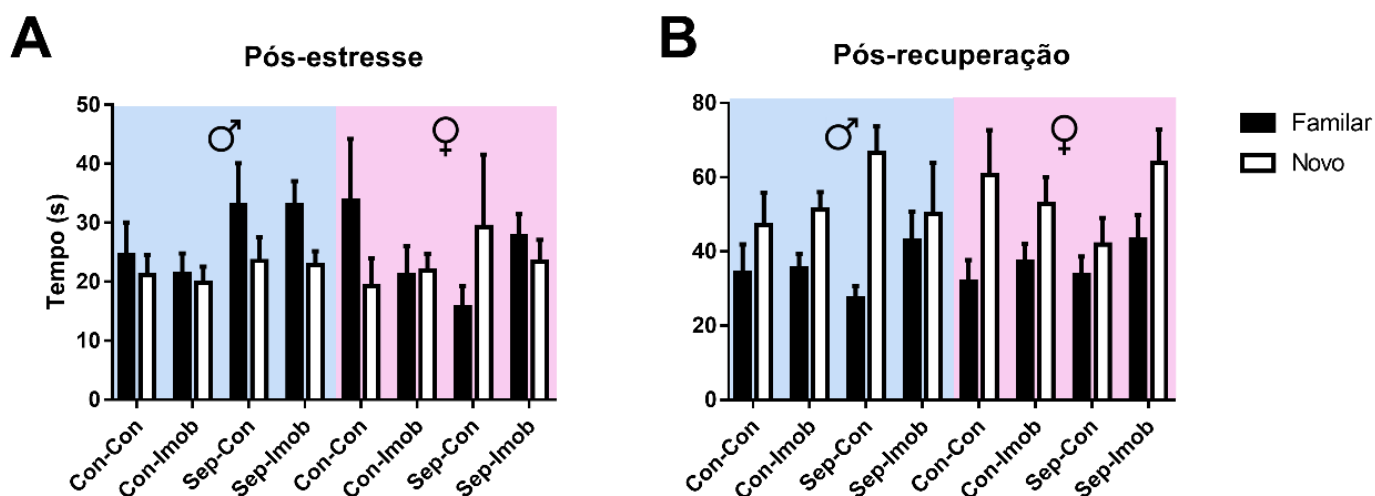


Figura 7. Tempo de exploração do objeto no teste de reconhecimento de novos objetos elevado (A) logo após a interrupção do segundo hit de estresse e (B) logo após o período de recuperação. Em (A) os machos apresentaram preferência pelo objeto familiar, embora sem diferenças significativas entre os grupos, e as fêmeas não apresentaram nenhuma preferência. Em (B) ambos os sexos apresentaram preferência pelo objeto novo, porém sem diferenças significativas entre os grupos.

6 DISCUSSÃO E CONCLUSÃO

A hipótese inicial deste trabalho supunha que animais expostos à separação materna não iriam se recuperar dos efeitos do estresse de restrição de movimentos. Porém, os resultados não confirmam esta hipótese. Para diferentes parâmetros, para os diferentes fatores (separação/restrrição) e para os dois momentos (pós estresse/recuperação), houve diferentes efeitos. Estes

efeitos foram algumas vezes contraditórios, como por exemplo, efeito ansiolítico e ansiogênico em um mesmo grupo em testes diferentes.

6.1 EFEITOS DO PROTOCOLO DE SEPARAÇÃO MATERNA

O protocolo de separação materna provocou efeitos, em suma, de tipo depressivo, ansiogênico ou prejudicando funções, que após as semanas de recuperação do segundo hit de estresse desapareceram. Esses efeitos só apresentaram concordância entre os sexos para um único parâmetro avaliado: a frequência de *stretched-attended posture*, um comportamento medido durante o teste no labirinto em cruz elevado, classificado com um comportamento tipo-ansioso. Nesse comportamento o animal, que está num braço fechado do labirinto, ou seja, em uma área protegida, estica o corpo para avaliar os riscos nos braços abertos. Quando ansioso, o animal tende a avaliar o risco das áreas desprotegidas e desiste de explorá-la e dessa forma é possível inferir um aumento da ansiedade dos indivíduos. Ambos os sexos apresentaram um aumento desse comportamento devido, em algum grau, a exposição a separação materna. Embora a separação materna possa gerar esse efeito, a restrição de movimento por si só também pôde.

Outros efeitos relacionados a ansiedade, causados pela exposição a separação materna foram a diminuição na distância percorrida no centro do campo aberto para o grupo de fêmeas, parâmetro que indica ansiedade por evitação de lugar abertos e expostos. Bem como uma tendência ($p=0,078$) de diminuição da percentagem de tempo gasto nos braços abertos no labirinto em cruz elevado, para o grupo de machos na condição da combinação dos dois hits de estresse.

Um outro efeito provocado por esse protocolo, porém apenas quando combinado com o segundo hit de estresse, foi o prejuízo ambulatorio inferido pela diminuição da distância total percorrida no campo aberto nos animais machos. Embora esse prejuízo possa interferir no desempenho dos animais nos demais testes comportamentais, alterações nas funções motoras também são sintomas relacionados a transtornos depressivos no DSM-V.

De maneira geral, esse protocolo parece afetar os animais durante a infância, de modo a tanto deixá-los susceptíveis ao efeito deletério de futuros estressores, ou até mesmo como efector por si só de alterações comportamentais tipo-ansiosas que perduram até a vida adulta.

6.2 EFEITOS DO PROTOCOLO DE RESTRIÇÃO DE MOVIMENTO

O protocolo de restrição de movimento provocou, de maneira geral, efeitos contraditórios. No teste de preferência por sacarose, houve uma diminuição significativa da preferência no grupo dos machos, na terceira semana de aplicação desse protocolo. Diferença essa, que não foi observada no grupo das fêmeas, que apresentou uma diminuição da preferência na terceira semana, mas não associada ao fator restrição de movimento, uma vez que os controles também apresentaram uma diminuição da preferência no mesmo momento. Uma das hipóteses levantadas é que pelo fato de a realização da imobilização dos animais do grupo imobilizado ser realizada na mesma sala em que permanecem os animais controle, o estresse provocado diretamente nos animais imobilizados esteja estressando os animais controle por meio de exposição as vocalizações ultrassônicas.

Como demonstrado em um estudo de Gilmore e colaboradores (2008) camundongos que não passavam pelo estresse crônico de restrição, mas permaneciam na mesma sala onde ocorria o protocolo, e depois permaneciam na mesma caixa moradia que os animais submetidos ao estresse, apresentavam um efeito agudo de até uma hora, na elevação da temperatura e ritmo cardíaco. Efeitos esses relacionados a liberação de noradrenalina e cortisol, comuns como resposta a estressores.

O fato de os controles também terem respondido aos estressores torna inviável uma comparação adequada dos resultados para os respectivos grupos, uma vez que não podendo inferir com significância estatística os efeitos dos estressores, comparar os resultados pós protocolo de estresse e pós recuperação não reflete os reais resultados desses protocolos.

De qualquer forma, os efeitos do estresse de restrição de movimento observados na preferência por sacarose concordam apenas com os efeitos

observados para a expressão do comportamento de *stretched-attended posture*, avaliado durante o teste do labirinto em cruz elevado. Esse comportamento aumentou significativamente sua frequência após o segundo hit, em machos, quando combinado com o estresse de separação materna, e em fêmeas, pelo estresse de restrição de movimento por si só. Esse comportamento, como já mencionado, é interpretado como uma avaliação de risco que o animal desempenha com maior frequência quando ansioso.

O protocolo de restrição de movimento também desencadeou efeito tipo antidepressivo com relação aos parâmetros de tempo de imobilidade no teste de suspensão pela cauda (em fêmeas). Por outro lado, logo após o estresse de imobilização, machos não apresentaram alterações no tempo de imobilidade, mas houve efeito tipo depressivo atribuído à separação materna.

Outro fator parâmetro com resultados significativos obtido após as duas semanas de recuperação, devido estresse de restrição de movimento, foi o aumento do número de entradas no braço aberto do labirinto em cruz elevado, no grupo dos machos. Logo após a interrupção do segundo hit de estresse, esse mesmo grupo não apresentou resultados significativos para esse fator.

Por fim, o estresse por restrição de movimento também provocou resultados contrastantes quanto a atividade locomotora dos animais. Foi verificado um aumento significativo na atividade locomotora do grupo CON-IMO nos machos, logo após a interrupção do segundo hit de estresse, e um prejuízo significativo na atividade locomotora das fêmeas, após as duas semanas de recuperação.

Frente a todas essas disparidades nos resultados, se faz necessário também repensar a efetividade dos testes comportamentais em medir os parâmetros alvo. Além da variabilidade dos protocolos encontrados na literatura, outros fatores podem ter influenciado na eficácia dos testes como a situação mencionada em um estudo de Walf e colaboradores (2007) que ao aplicar o teste do labirinto em cruz elevado mais de uma vez para o mesmo animal, perceberam que a atividade nos braços abertos reduz significativamente. Ainda segundo esse estudo, é recomendado que esse teste não seja aplicado mais de uma vez, exceto se 3 semanas depois da primeira

exposição ao teste e em uma sala diferente, nessas condições não foram detectadas diferenças nos resultados do teste.

Novos estudos envolvendo estressores neonatais utilizando camundongos necessitam ser realizados, com foco em identificar que fatores na execução dos protocolos podem influenciar nas respostas comportamentais dos animais, bem como investigações acerca de como os animais submetidos ao estresse podem afetar os animais controles alojados na mesma sala. De maneira geral, ficou claro que mesmo com muitas variáveis interferindo nos resultados do estudo, seja desde sua execução, até a aplicação dos testes comportamentais, o estresse neonatal de separação materna produz efeitos tipo ansiolíticos e depressivos detectáveis até a vida adulta do animal.

7 REFERÊNCIAS

- Arabo, A., Potier, C., Ollivier, G., Lorivel, T. e Roy, V. Temporal analysis of free exploration of an elevated plus-maze in mice. *J Exp Psychol Anim Learn Cogn.* (2014) 40(4):457-66. doi: 10.1037/xan0000031.
- Bartolomucci, A., Gioiosa, L., Chirieleison, A., Cerensinis, G., Permigiani, S., e Palanza, P. Cross fostering in mice: behavioral and physiological carry-over effects in adulthood. *Genes, Brain and Behavior* (2004) 3: 115–122. DOI: 10.1111/j.1601-183X.2003.00059.x.
- CHRISTIANSEN, S.h. et al. Fluoxetine reverts chronic restraint stress-induced depression-like behaviour and increases neuropeptide Y and galanin expression in mice. **Behavioural Brain Research**, [s.l.], v. 216, n. 2, p.585-591, 20 jan. 2011. Elsevier BV.
- CRYAN, John F.; MOMBÉREAU, Cedric; VASSOUT, Annick. The tail suspension test as a model for assessing antidepressant activity: Review of pharmacological and genetic studies in mice. **Neuroscience & Biobehavioral Reviews**, [s.l.], v. 29, n. 4-5, p.571-625, jan. 2005. Elsevier BV
- DING, Qin et al. Zinc and imipramine reverse the depression-like behavior in mice induced by chronic restraint stress. **Journal Of Affective Disorders**, [s.l.], v. 197, p.100-106, jun. 2016. Elsevier BV.
- DONG, Liming et al. Memory enhancement of fresh ginseng on deficits induced by chronic restraint stress in mice. **Nutritional Neuroscience**, [s.l.], p.1-8, 15 set. 2017. Informa UK Limited. <http://dx.doi.org/10.1080/1028415x.2017.1373928>.
- Gee, D.G., Casey, B.J., 2015. The impact of developmental timing for stress and recovery. *Neurobiol. Stress* 1, 184–194. doi:10.1016/j.ynstr.2015.02.001.
- GILMORE, A J; BILLING, R L; EINSTEIN, R. The effects on heart rate and temperature of mice and vas deferens responses to noradrenaline when

their cage mates are subjected to daily restraint stress. **Laboratory Animals**, [s.l.], v. 42, n. 2, p.140-148, abr. 2008. SAGE Publications. <http://dx.doi.org/10.1258/la.2007.06030e>.

HOLMES, Andrew et al. Early life genetic, epigenetic and environmental factors shaping emotionality in rodents. **Neuroscience & Biobehavioral Reviews**, [s.l.], v. 29, n. 8, p.1335-1346, jan. 2005. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.neubiorev.2005.04.012>.

Kawakami SE1, Quadros IM, Machado RB, Suchecki D. Sex-dependent effects of maternal separation on plasma corticosterone and brain monoamines in response to chronic ethanol administration. *Neuroscience*. (2013); 253,55-66. doi: 10.1016/j.neuroscience.2013.08.031.

Kikusui, T., Faccidomo, S. e Miczek, K. A. Repeated maternal separation: differences in cocaine-induced behavioral sensitization in adult male and female mice. *Psychopharmacology*. (2005) 178(2-3):202-10. DOI: 10.1007/s00213-004-1989-1.

Kooij, M. A. V., Fantini, M., Korshunova, I., Grosse, J., Zanoletti, O., Guirado, R., Garcia-Mompo, C., Nacher, J., Stewart, M. G., Berezin, V. e Sandi, C. Impaired Hippocampal Neurotrophin-2 Function by Chronic Stress or Synthetic Peptide Treatment is Linked to Social Deficits and Increased Aggression. *Neuropsychopharmacology* (2014) 39, 1148–1158. DOI:10.1038/npp.2013.315.

LOGAN, Ryan W. et al. Chronic Stress Induces Brain Region-Specific Alterations of Molecular Rhythms that Correlate with Depression-like Behavior in Mice. **Biological Psychiatry**, [s.l.], v. 78, n. 4, p.249-258, ago. 2015. Elsevier BV.

Leger, M., Quiedeville, A., Bouet, V., Haelewyn, B., Boulouard, M., Schumann-Bard, P. e Freret, T. Object recognition test in mice. *Nat Protoc*. (2013) 8(12):2531-7. doi: 10.1038/nprot.2013.155.

LISTON, C. et al. Stress-Induced Alterations in Prefrontal Cortical Dendritic Morphology Predict Selective Impairments in Perceptual Attentional Set-

Shifting. **Journal Of Neuroscience**, [s.l.], v. 26, n. 30, p.7870-7874, 26 jul. 2006. Society for Neuroscience.

LIU, Lanxiang et al. The identification of metabolic disturbances in the prefrontal cortex of the chronic restraint stress rat model of depression. **Behavioural Brain Research**, [s.l.], v. 305, p.148-156, maio 2016. Elsevier BV.

McEwen BS. Protective and damaging effects of stress mediators: central role of the brain. *Dialogues in Clinical Neuroscience*. 2006;8(4):367-381.

McEwen BS. Understanding the potency of stressful early life experiences on brain and body function. *Metabolism: clinical and experimental*. 2008;57(Suppl 2):S11-S15. doi:10.1016/j.metabol.2008.07.006.

MILLSTEIN, Rachel A.; HOLMES, Andrew. Effects of repeated maternal separation on anxiety- and depression-related phenotypes in different mouse strains. **Neuroscience & Biobehavioral Reviews**, [s.l.], v. 31, n. 1, p.3-17, jan. 2007. Elsevier BV.

Morriceau, S. e Sullivan, R. M. Neurobiology of Infant Attachment. *Dev Psychobiol*. (2005) 47(3): 230–242. doi:10.1002/dev.2009.

POTHION, Stéphanie et al. Strain differences in sucrose preference and in the consequences of unpredictable chronic mild stress. **Behavioural Brain Research**, [s.l.], v. 155, n. 1, p.135-146, nov. 2004. Elsevier BV.

Radley, J. J., Rocher, A. B., Janssen, W. G. M., Hof, P. R., McEwen, B. S. e Morrison, J. H. Reversibility of apical dendritic retraction in the rat medial pré-frontal cortex following repeated stress. *Experimental Neurology* 196 (2005) 199 – 203. DOI: 10.1016/j.expneurol.2005.07.008.

RYGULA, Rafal; PAPCIAK, Justyna; POPIK, Piotr. Trait Pessimism Predicts Vulnerability to Stress-Induced Anhedonia in Rats. **Neuropsychopharmacology**, [s.l.], v. 38, n. 11, p.2188-2196, 10 maio 2013. Springer Nature.

- Seibenhener ML, Wooten MC. Use of the Open Field Maze to Measure Locomotor and Anxiety-like Behavior in Mice. *Journal of Visualized Experiments : JoVE*. 2015;(96):52434. doi:10.3791/52434.
- SHERIDAN, Margaret A. et al. The Impact of Social Disparity on Prefrontal Function in Childhood. **Plos One**, [s.l.], v. 7, n. 4, p.334-336, 26 abr. 2012. Public Library of Science (PLoS).
- SHERIDAN, Margaret A. et al. What are the links between maternal social status, hippocampal function, and HPA axis function in children? **Developmental Science**, [s.l.], v. 16, n. 5, p.665-675, 7 ago. 2013. Wiley-Blackwell.
- TAN, Sijie et al. Ketamine Alleviates Depressive-Like Behaviors via Down-Regulating Inflammatory Cytokines Induced by Chronic Restraint Stress in Mice. **Biological & Pharmaceutical Bulletin**, [s.l.], v. 40, n. 8, p.1260-1267, 2017. Pharmaceutical Society of Japan. <http://dx.doi.org/10.1248/bpb.b17-00131>.
- TONG, Lijuan et al. Microglia Loss Contributes to the Development of Major Depression Induced by Different Types of Chronic Stresses. **Neurochemical Research**, [s.l.], v. 42, n. 10, p.2698-2711, 22 abr. 2017. Springer Nature.
- Vyas, A.; Mitra, R.; Rao, B. S. S. e Chattarji, S. 2002. Chronic Stress Induces Contrasting Patterns of Dendritic Remodeling in Hippocampal and Amygdaloid Neurons. *The Journal of Neuroscience*, 2002 (15):6810–6818. doi.org/20026655.
- Vyas, A., Pillai, A. G. e Chattarji, S. Recovery after chronic stress fails to reverse Amygdaloid neuronal hypertrophy and enhance Anxiety-like behavior. *Neuroscience* 128 (2004) 667–673. DOI: 10.1016/j.neuroscience.2004.07.013.
- A WALF, Alicia; A FRYE, Cheryl. The use of the elevated plus maze as an assay of anxiety-related behavior in rodents. **Nature Protocols**, [s.l.], v. 2, n. 2, p.322-328, mar. 2007. Springer Nature.

WANG, Guang-yan et al. Glucocorticoid Induces Incoordination between Glutamatergic and GABAergic Neurons in the Amygdala. **Plos One**, [s.l.], v. 11, n. 11, p.354-358, 18 nov. 2016. Public Library of Science (PLoS).