

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE MEDICINA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM SAÚDE DA CRIANÇA E DO
ADOLESCENTE

**ESTUDO TRANSLACIONAL SOBRE A QUALIDADE
DO CUIDADO MATERNO EM RESPOSTA AO
ESTRESSE NEONATAL, SUA ASSOCIAÇÃO COM
ANSIEDADE NA VIDA ADULTA E INVESTIGAÇÃO DE
POTENCIAIS MECANISMOS ENVOLVIDOS**

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

ROBERTA DALLE MOLLE

Porto Alegre, Brasil

2011

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE MEDICINA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM SAÚDE DA CRIANÇA E DO
ADOLESCENTE

**ESTUDO TRANSLACIONAL SOBRE A QUALIDADE
DO CUIDADO MATERNO EM RESPOSTA AO
ESTRESSE NEONATAL, SUA ASSOCIAÇÃO COM
ANSIEDADE NA VIDA ADULTA E INVESTIGAÇÃO DE
POTENCIAIS MECANISMOS ENVOLVIDOS**

ROBERTA DALLE MOLLE

A apresentação desta dissertação é exigência do Programa de Pós-Graduação em Saúde da Criança e do Adolescente, da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, para obtenção do título de Mestre.

Orientadora: Prof. Dra. Patrícia Pelufo Silveira

Porto Alegre, Brasil

2011

CIP - Catalogação na Publicação

Dalle Molle, Roberta

Estudo translacional sobre a qualidade do cuidado materno em resposta ao estresse neonatal, sua associação com ansiedade na vida adulta e investigação de potenciais mecanismos envolvidos / Roberta Dalle Molle. -- 2011.

144 f.

Orientadora: Patrícia Pelufo Silveira.

Dissertação (Mestrado) -- Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Faculdade de Medicina, Programa de Pós-Graduação em Saúde da Criança e do Adolescente, Porto Alegre, BR-RS, 2011.

1. trauma precoce. 2. comportamento materno. 3. ansiedade. 4. fator neurotrófico derivado do encéfalo. I. Silveira, Patrícia Pelufo, orient. II. Título.

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE MEDICINA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM SAÚDE DA CRIANÇA E DO
ADOLESCENTE

ESTA DISSERTAÇÃO FOI DEFENDIDA PUBLICAMENTE EM:

01 / 09 / 2011

E, FOI AVALIADA PELA BANCA EXAMINADORA COMPOSTA POR:

Prof. Dr. Rodrigo Grassi de Oliveira
Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul

Profa. Dra. Rosa Maria Martins de Almeida
Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Profa. Dra. Ursula da Silveira Matte
Hospital de Clínicas de Porto Alegre

DEDICATÓRIA

Aos meus pais, Nelci e Roberto e ao meu irmão, Luis Felipe;
pela educação, amor, incentivo e apoio.

AGRADECIMENTOS

Ao Núcleo de Estudos da Saúde da Criança e do Adolescente (NESCA) por ter me acolhido, em especial, à minha orientadora Prof. Dra. Patrícia Pelufo Silveira, a quem admiro muito, e que com dedicação, inteligência e paciência me apoiou na realização deste trabalho. Muito obrigada pelo carinho, ensinamentos e pelo exemplo de profissionalismo.

À Prof. Ilaine Schuch por ter me apresentado ao NESCA e sempre acreditar no meu potencial.

À equipe do NESCA pelo auxílio, em especial ao colega Dr. André K. Portella pela colaboração constante e imensa paciência.

À equipe da Unidade de Experimentação Animal (UEA/HCPA) e do Laboratório de Neurobiologia do Estresse do Departamento de Bioquímica da UFRGS pelo apoio nos experimentos realizados.

À Prof. Dra. Gisele Gus Manfro e ao Giovanni A. Salum pelas importantes contribuições para a construção deste trabalho.

À minha família e amigos por entenderem minha ausência e me ajudarem nos momentos difíceis. Ao Tarso pelo amor, paciência e companheirismo.

À Universidade Federal do Rio Grande do Sul e ao Programa de Pós-Graduação em Saúde da Criança e do Adolescente pela oportunidade.

Ao CAPES, CNPq e FINEP pelo apoio financeiro.

A todos que de forma direta ou indireta me auxiliaram na realização deste trabalho.

RESUMO

Introdução: Em humanos, sugere-se que um trauma precoce está relacionado com o desenvolvimento de transtornos de ansiedade na vida adulta. Essa relação poderia ser mediada pela resposta ao estresse, fator neurotrófico derivado do encéfalo (BDNF) e/ou óxido nítrico sintase neuronal (nNOS). O objetivo deste trabalho foi propor um modelo animal para o desenvolvimento de ansiedade, utilizando, como intervenção, um ambiente neonatal hostil que afeta o cuidado materno, além de verificar potenciais mecanismos relacionados ao desenvolvimento de ansiedade. Também objetivou-se investigar associações similares em humanos. **Métodos:** Ao segundo dia de vida, ninhadas de ratos Wistar e suas genitoras foram divididas em dois grupos: grupo intervenção, com redução do material disponível para a confecção do ninho, ou grupo controle. O comportamento materno foi observado do dia 1 ao dia 9 de vida. Após o desmame, o peso corporal e o consumo de ração padrão foram avaliados uma vez por semana. Na vida adulta, os ratos foram submetidos a testes comportamentais. Foram determinados os níveis plasmáticos de glicose e o perfil lipídico, além da quantidade de BDNF no plasma, hipocampo, amígdala e substância cinzenta periaquedutal e de óxido nítrico no hipocampo. Um subgrupo de animais intactos foi submetido ao estresse por restrição para avaliação da curva de corticosterona. Em humanos, 129 adolescentes com sintomas ansiosos, avaliados pela escala *Screen for Children and Anxiety Related Emotional Disorders* (SCARED), responderam ao *Parental Bonding Instrument* (PBI), coletaram sangue para avaliação do BDNF e foram genotipados para o polimorfismo Val66Met do BDNF. **Resultados:** As genitoras do grupo intervenção apresentaram um maior contato de baixa qualidade com seus filhotes, comparadas às genitoras controles. O consumo alimentar de ração padrão foi menor no grupo intervenção. Não houve diferença entre os grupos no peso corporal, no consumo de alimento palatável, na hiperfagia de rebote, nem no teste do campo aberto. No teste do labirinto em cruz elevado, observou-se que a intervenção esteve associada a maior ansiedade, porém de forma diferenciada entre os sexos. Foram observados níveis maiores de BDNF plasmáticos no grupo intervenção e uma correlação positiva entre o contato de baixa qualidade e o BDNF periférico. Não houve diferença entre os grupos na quantidade de BDNF no hipocampo, amígdala e substância cinzenta periaquedutal e, também, nos níveis de óxido nítrico no hipocampo. Machos do grupo intervenção levaram mais tempo para atingir o pico de corticosterona em resposta ao estresse. No estudo clínico, observaram-se correlações negativas entre o cuidado materno e sintomas ansiosos, assim como uma correlação positiva entre a superproteção materna e os níveis periféricos de BDNF apenas nos indivíduos portadores do alelo Met. **Conclusão:** O modelo animal proposto mostrou que o estresse precoce, capaz de alterar a relação mãe-filhote, tem impacto persistente sobre o comportamento do tipo ansioso e os níveis periféricos de BDNF. Estes achados são similares às associações descritas em humanos. A abordagem translacional da questão evidenciou que os efeitos do trauma no início da vida podem ser mediados pelo cuidado materno, sendo o aumento do BDNF periférico um marcador em potencial para esses indivíduos.

Palavras-chave: comportamento materno, ansiedade, fator neurotrófico derivado do encéfalo.

ABSTRACT

Introduction: In humans, there is the suggestion that an adverse early life environment is related to the development of anxiety disorders in adulthood. This association could potentially be mediated by stress responses, brain-derived neurotrophic factor (BDNF) and by neuronal nitric oxide synthase (nNOS). This study aimed at proposing an animal model for the development of adult anxiety-like behavior, using as intervention an adverse early life environment affecting maternal care, and verifies potential mechanisms related to the development of anxiety-like behavior. Another aim was investigate similar associations in humans. **Methodology:** By the second day of life, litters of Wistar rats and their dams were divided in two groups: intervention, with limited access to nesting material, or control. Maternal behavior was observed from day 1 to day 9 of life. After weaning, animals' weight and standard chow consumption were measured once a week. Starting on day 60 of life, rats were submitted to behavioral testing. Glucose and lipid profile were assessed. Plasma, hippocampus, amygdala and periaqueductal gray BDNF contents and hippocampus nitric oxide were also measured. A subgroup of naive animals was submitted to restraint stress for determination of corticosterone curve. In humans, 129 adolescents, screened for anxiety using the Screen for Children and Anxiety Related Emotional Disorders (SCARED) scale, responded to the Parental Bonding Instrument (PBI), collected blood for BDNF measurements and were genotyped for BDNF Val66Met polymorphism. **Results:** Intervention dams showed increased contact of low quality with their pups when compared to control dams. The intervention group consumed less standard chow than the control group. No differences in body weight gain, acute palatable food consumption, rebound hyperphagia and open field test were observed between groups. On plus maze test, the intervention was associated with higher anxiety-like behavior, however differently between the sexes. Higher plasma BDNF levels were found in the intervention group and low quality maternal care (pure contact) was positively correlated with adult peripheral BDNF. There were no differences in hippocampus, amygdala and periaqueductal gray BDNF contents, as hippocampus nitric oxide contents. Males of the intervention group took longer to reach the corticosterone peak. In humans, negative correlations between maternal care and anxiety symptoms were observed, as well as a positive correlation between overprotection and serum BDNF levels only among the Met carriers. **Conclusion:** The animal model proposed showed that an early life stress, able to alter the relationship between dam and pup, have a persistent impact on anxiety-like behavior and peripheral BDNF levels. These findings were similar to the associations described in humans. The translational approach to the question evidenced that the effects of early trauma may be mediated through maternal care, being the increased peripheral BDNF a potential relevant marker for these individuals.

Keywords: maternal behavior, anxiety, brain-derived neurotrophic factor.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 – Estressores distintos provocam respostas diferentes.....	21
Figura 2 – Esquema mostrando a distribuição das ninhadas nos diferentes experimentos realizados.....	32
Figura 3 – Linha de tempo do procedimento experimental e testes comportamentais.....	33
Figura 4 – Vista de cima do aparato utilizado para o teste do campo aberto.....	38
Figura 5 – Aparato utilizado para o teste do labirinto em cruz elevado.....	39
Figura 6 – Distribuição do escore do LG nos grupos controle (n=8) e intervenção (n=9)....	48
Figura 7 – Peso corporal, ao longo de oito semanas de vida após o desmame, nos machos controle (n=16), machos intervenção (n=28), fêmeas controle (n=27) e fêmeas intervenção (n=24). Dados expressos em média ± EP. ANOVA de medidas repetidas mostrou efeito do tempo (p<0,0001) e do sexo (p<0,0001).....	50
Figura 8 – Consumo de ração padrão, da 5ª a 9ª semana de vida, nos machos controle (n=7 caixas), machos intervenção (n=11 caixas), fêmeas controle (n=10 caixas) e fêmeas intervenção (n=11 caixas). Dados expressos em média ± EP. ANOVA de medidas repetidas mostrou efeito do tempo (p<0,0001), efeito do sexo (p<0,0001) e efeito do grupo (p=0,002).....	51
Figura 9 – Consumo de alimento doce nos dias de habituação nos machos controle (n=8), machos intervenção (n=19), fêmeas controle (n=19) e fêmeas intervenção (n=14). Dados expressos em média ± EP. ANOVA de medidas repetidas mostrou efeito do tempo (p<0,0001).....	52
Figura 10 – Consumo de alimento doce no dia do teste nos machos controle (n=8), machos intervenção (n=19), fêmeas controle (n=19) e fêmeas intervenção (n=14). Dados expressos em média ± EP. Na ANOVA de duas vias a interação entre grupo e sexo não chega a atingir significância estatística (p=0,056).....	52

Figura 11 – Consumo de ração padrão em 24h, após jejum prolongado, nos machos controle (n=4 caixas), machos intervenção (n=9 caixas), fêmeas controle (n=8 caixas) e fêmeas intervenção (n=7 caixas). Dados expressos em média ± EP. ANOVA de duas vias mostrou efeito do sexo (p<0,0001).....	53
Figura 12 – Níveis plasmáticos de BDNF nos machos controle (n=6), machos intervenção (n=7), fêmeas controle (n=7) e fêmeas intervenção (n=6). Dados expressos em média ± EP. ANOVA de duas vias mostrou efeito do grupo (p=0,040).....	58
Figura 13 – Correlação entre os níveis de BDNF plasmático e o escore do contato puro (n=26).....	58
Figura 14 – Quantidade de NO no hipocampo nos machos controle (n=5), machos intervenção (n=6), fêmeas controle (n=8) e fêmeas intervenção (n=6). Dados expressos em média ± EP. ANOVA de duas vias não mostrou efeitos, nem interação.....	59
Figura 15 – Curva de corticosterona em resposta ao estresse por restrição de movimento nos machos controle (n=6), machos intervenção (n=7), fêmeas controle (n=8) e fêmeas intervenção (n=8). A barra preta representa o período de exposição ao estresse por restrição de movimento. Dados expressos em média ± EP. ANOVA de medidas repetidas mostrou efeito do tempo (p<0,001), efeito do sexo (p=0,004) e interação tempo*sexo*grupo (p=0,017).....	60
Figura 16 – Correlações entre o escore de superproteção do PBI e os níveis séricos de BDNF nos indivíduos portadores (n=30) e não portadores do alelo Met (n=62).....	62

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Comparação entre as médias das variáveis relacionadas com o cuidado materno.....	49
Tabela 2 – Variáveis analisadas no teste do campo, conforme sexo e grupo.....	54
Tabela 3 – Variáveis analisadas no teste do labirinto em cruz elevado, conforme sexo e grupo.....	55
Tabela 4 – Resultados das análises de colesterol total, HDL, LDL, triglicérides e glicose, conforme sexo e grupo.....	56
Tabela 5 – Percentual de gordura abdominal, conforme sexo e grupo.....	57
Tabela 6 – Quantidade de BDNF (ng/mg de proteína) no hipocampo (n=4-6), amígdala (n=5-7) e substância cinzenta periaquedutal (n=5-7), conforme sexo e grupo.....	58
Tabela 7 – Características da amostra do estudo clínico (n=129).....	61

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ACTH	Hormônio adrenocorticotrópico
AMPc	AMP cíclico
BDNF	Fator neurotrófico derivado do encéfalo
CREB	Proteína de ligação ao elemento de resposta do AMPc
CRH	Hormônio liberador de corticotrofina
DSM-IV	Manual Diagnóstico e Estatístico de Doenças Mentais – 4ª edição
eNOS	Óxido nítrico sintase endotelial
fMRI	Imagem por ressonância magnética funcional
GPPG	Grupo de Pesquisa e Pós-Graduação
GR	Receptores glicocorticóides
HCPA	Hospital de Clínicas de Porto Alegre
HDL	Lipoproteína de alta densidade
HPA	Hipotálamo-Hipófise-Adrenal
iNOS	Óxido nítrico sintase induzível
IP	Intra-peritoneal
LDL	Lipoproteína de baixa densidade
LG	<i>Licking and grooming</i> – lambar os filhotes
Met	Metionina
MR	Receptores mineralocorticóides
mtNOS	Óxido nítrico sintase mitocondrial
NGFI-A	Fator de Crescimento do Nervo Induzível pelo Fator A
NO	Óxido nítrico
NOS	Óxido nítrico sintase

nNOS	Óxido nítrico sintase neuronal
PBI	<i>Parental Bonding Instrument</i>
PVN	Núcleo paraventricular do hipotálamo
RNAm	RNA mensageiro
rpm	Rotações por minute
SCARED	<i>Screen for Children and Anxiety Related Emotional Disorders</i>
SNC	Sistema nervoso central
SPSS	<i>Statistical Package for the Social Sciences</i>
TGs	Triglicerídeos
TP	Transtorno do pânico
TrkB	Receptor de tropomiosina quinase B
UEA	Unidade de Experimentação Animal
Val	Valina
5-HT1A	Receptor de serotonina tipo 1 ^a
5-HT1B	Receptor de serotonina tipo 1B

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	15
2 REVISÃO DA LITERATURA.....	18
2.1 ANSIEDADE.....	18
2.2 RESPOSTA AO ESTRESSE – FISIOLOGIA DO EIXO HPA.....	21
2.3 ESTUDOS EXPERIMENTAIS E PROGRAMAÇÃO.....	23
2.4 FATOR NEUROTROFICO DERIVADO DO ENCÉFALO (BDNF).....	25
2.5 ÓXIDO NÍTRICO SINTASE (NOS).....	27
3 JUSTIFICATIVA.....	28
4 OBJETIVOS.....	29
4.1 OBJETIVO GERAL.....	29
4.2 OBJETIVOS SECUNDÁRIOS.....	29
5 HIPÓTESE.....	30
6 METODOLOGIA.....	31
6.1 ESTUDO EXPERIMENTAL.....	31
6.1.1 Animais.....	31
6.1.2 Grupos.....	33
6.1.3 Observações do cuidado materno.....	34
6.1.4 Avaliação do consumo de ração padrão.....	35
6.1.5 Testes comportamentais.....	36
6.1.5.1 Consumo de alimento palatável.....	36
6.1.5.2 Hiperfagia de rebote.....	37
6.1.5.3 Teste do campo aberto.....	37
6.1.5.4 Teste do labirinto em cruz elevado.....	38
6.1.6 Curva de corticosterona em resposta ao estresse por restrição de movimento.....	39
6.1.7 Coleta e armazenamento de tecidos.....	40
6.1.8 Análises bioquímicas e neuroquímicas.....	41
6.2 ESTUDO CLÍNICO.....	42
6.2.1 Sujeitos.....	42
6.2.2 Questionários utilizados neste trabalho.....	43
6.2.3 Coleta de sangue, armazenamento das amostras e análise bioquímica.....	44

6.2.4 Extração de DNA e genotipagem.....	44
6.3 ASPECTOS ÉTICOS.....	44
6.3.1 Animais.....	44
6.3.2 Humanos.....	45
6.4 ANÁLISES ESTATÍSTICAS.....	45
6.4.1 Animais.....	45
6.4.2 Humanos.....	46
7 RESULTADOS.....	48
7.1 ESTUDO EXPERIMENTAL.....	48
7.1.1 Cuidado materno.....	48
7.1.2 Peso corporal.....	49
7.1.3 Consumo de ração padrão.....	50
7.1.4 Testes comportamentais.....	51
7.1.4.1 Consumo de alimento palatável.....	51
7.1.4.2 Hiperfagia de rebote.....	53
7.1.4.3 Teste do campo aberto.....	53
7.1.4.4 Teste do labirinto em cruz elevado.....	54
7.1.5 Análises bioquímicas.....	55
7.1.6 Gordura abdominal.....	56
7.1.7 Fator neurotrófico derivado do encéfalo (BDNF).....	57
7.1.8 Óxido Nítrico (NO).....	59
7.1.9 Curva de corticosterona em resposta ao estresse por restrição de movimento.....	59
7.2 ESTUDO CLÍNICO.....	60
8 DISCUSSÃO.....	63
9 CONCLUSÃO.....	77
REFERÊNCIAS.....	78
ANEXO A – ARTIGO SUBMETIDO (VERSÃO EM INGLÊS).....	93
ANEXO B – ARTIGO (VERSÃO EM PORTUGUÊS).....	118

1 INTRODUÇÃO

A ansiedade, assim como a depressão e outros transtornos de humor, pode contribuir significativamente para a incapacidade, morbidade e mortalidade (BALON, 2006). Eventos estressantes no início da vida, como o abuso e a negligência, têm sido associados com o desenvolvimento de ansiedade e transtornos de humor (WEAVER, 2009). Além disso, o comportamento materno inadequado pode gerar registros na memória que predisõem a alterações neurobiológicas com repercussões no eixo hipotálamo-hipófise-adrenal (HPA) e hipocampo (KANDEL, 1999).

A natureza e o “*timing*” dos eventos adversos precoces que podem ter seqüelas a longo prazo têm sido delineados em alguns modelos animais. Um estudo com ratas e suas ninhadas, baseado na diminuição do material para a construção do ninho, mostrou que essa intervenção influencia tanto a qualidade quanto a quantidade do cuidado materno, conseguindo transferir um importante elemento presente na negligência e abuso no início da vida em humanos para o modelo animal (IVY *et al.*, 2008). Filhotes deste modelo animal apresentam alterações do eixo HPA persistentes até a vida adulta (RICE *et al.*, 2008), caracterizando anormalidades neuroendócrinas similares às encontradas na ansiedade.

A patogênese dos transtornos de ansiedade tem sido estudada, mas ainda permanece como uma questão de pesquisa muito interessante. Nos últimos anos, estudos têm pesquisado a relação do fator neurotrófico derivado do encéfalo (BDNF) e do sistema serotoninérgico com algumas psicopatologias, dentre elas a ansiedade.

O BDNF tem surgido como um alvo em potencial para o desenvolvimento e o tratamento da ansiedade, assim como de outras desordens psiquiátricas como a depressão e os transtornos alimentares (LYONS *et al.*, 1999; RIBASES *et al.*, 2004; HASHIMOTO *et al.*, 2004). O BDNF é uma proteína da família das neurotrofinas que influencia na proliferação,

diferenciação, morfologia e atividade funcional dos neurônios (KAPCZINSKI *et al.*, 2008). Em humanos, tem sido demonstrado que pacientes com esquizofrenia e depressão têm baixos níveis séricos de BDNF (KAREGE *et al.*, 2002, TOYOOKA *et al.*, 2002, KIM *et al.*, 2007). Além disso, um polimorfismo no gene do BDNF (Val66Met) está associado com uma pior memória episódica e uma ativação hipocampal anormal (EGAN *et al.*, 2003). Curiosamente, animais que apresentam esse polimorfismo exibem um aumento nos comportamentos do tipo ansioso (CHEN *et al.*, 2006), sugerindo associação entre a fisiologia desta neurotrofina e a patogênese dos transtornos de ansiedade.

A relação entre o sistema serotoninérgico e a ansiedade perpassa pela atividade de alguns de seus receptores. Dentre os vários subtipos de receptores de serotonina, a subsensibilização (*downregulation*) do receptor 5-HT_{1A}, no hipocampo e no lobo temporal, está frequentemente associada com a ansiedade e a depressão (GROSS *et al.*, 2000). A óxido nítrico sintase neuronal (nNOS) tem um papel importante na função pós-sináptica dos receptores 5-HT_{1A} e/ou 5-HT_{1B} (CHIAVEGATTO *et al.*, 2001), e estudos têm indicado que a nNOS está envolvida nos comportamentos relacionados à ansiedade (MIGUEL e NUNES-DE-SOUZA, 2008; WORKMAN *et al.*, 2008). Além disso, um estudo recente encontrou que a inibição da nNOS produz efeitos ansiolíticos e anula o efeito ansiogênico do antagonista do receptor 5-HT_{1A}, sugerindo que a nNOS está relacionada com a regulação dos comportamentos do tipo ansioso (ZHANG *et al.*, 2010).

Como o trauma no início da vida parece influenciar o risco para o desenvolvimento de psicopatologias (MANFRO *et al.*, 1996; HORESH *et al.*, 1997), é de extrema importância que se desenvolvam modelos para compreender melhor os fatores de risco e os mecanismos envolvidos. Sendo assim, este trabalho tem como principal objetivo estudar o desenvolvimento de ansiedade em um modelo animal de adversidade no início da vida,

baseado na qualidade do comportamento materno, assim como investigar possíveis mecanismos envolvidos no desenvolvimento dessa psicopatologia.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 ANSIEDADE

Aubrey Lewis (1979), após extensa revisão sobre o tema, atribuiu as seguintes características à ansiedade: (1) é um estado emocional, com a experiência subjetiva de medo ou outra emoção relacionada, como terror, horror, alarme, pânico; (2) a emoção é desagradável, podendo ser uma sensação de morte ou colapso iminente; (3) é direcionada em relação ao futuro. Está implícita a sensação de um perigo iminente. Não há um risco real, ou se houver, a emoção é desproporcionalmente mais intensa; (4) há desconforto corporal subjetivo durante o estado de ansiedade. Sensação de aperto no peito, na garganta, dificuldade para respirar, fraqueza nas pernas e outras sensações subjetivas.

Os transtornos de ansiedade estão entre os transtornos psiquiátricos mais comuns, afetando um quarto da população durante toda a vida. São transtornos altamente persistentes, tipicamente crônicos e frequentemente coexistem com outras condições psiquiátricas. Dentre os sintomas psicológicos estão a preocupação excessiva, o medo e a apreensão, mas sintomas físicos como fadiga, taquicardia e tensão também estão presentes (GARIEPY *et al.*, 2010).

Um estudo realizado em São Paulo, que avaliou a prevalência de transtornos psiquiátricos em indivíduos com 18 anos ou mais, encontrou que os transtornos de ansiedade estão entre os mais frequentes, com prevalências de 12,5% ao longo da vida (ANDRADE *et al.*, 2002). A prevalência encontrada é menor que a dos EUA (24,9%) (KESSLER *et al.*, 1994) e Holanda (19,3%) (BIJL *et al.*, 1998).

Estudos retrospectivos observaram que mais de 50% dos pacientes adultos com transtornos de ansiedade preenchem critérios para transtornos de ansiedade na infância (ISOLAN *et al.*, 2005), demonstrando que eles podem ter início precoce.

A ansiedade, assim como a depressão e outros transtornos de humor, pode contribuir significativamente para a incapacidade, morbidade e mortalidade (BALON, 2006). Está associada à presença de asma (GOODWIN *et al.*, 2004) e doença cardiovascular (SOWDEN E HUFFMAN, 2009), a menos opções de carreiras profissionais, a maior chance de ser solteiro ou separado, a menor qualidade de vida (HELDT *et al.*, 2006) e ao abuso de substâncias secundário (KONNOPKA *et al.*, 2008). Também constitui um fator de risco independente para suicídio (BOLTON *et al.*, 2008) e contribui com o aumento nos custos em saúde pública (KONNOPKA *et al.*, 2008).

Uma revisão sistemática da literatura que incluiu 16 estudos (2 prospectivos e 14 transversais) relacionando ansiedade e obesidade na vida adulta, sugere que existe uma associação positiva entre obesidade e ansiedade, em ambos os sexos (GARIEPY *et al.*, 2010). Outro estudo que investigou a relação entre obesidade e transtornos mentais em 13 países encontrou uma modesta associação entre obesidade e transtornos de ansiedade, sendo que essas associações ficaram concentradas entre aqueles com obesidade severa, e entre as mulheres (SCOTT *et al.*, 2008). Segundo Davis *et al.* (2008) a ansiedade pode ser um dos fatores que contribui para o surgimento da obesidade. Em revisão sobre alimentação e emoção Canetti *et al.* (2002), sugerem que indivíduos obesos não têm a habilidade de distinguir entre fome e ansiedade porque eles aprenderam a comer em resposta a ambos os estados. Então, comer para reduzir a ansiedade pode levar à super alimentação (*overeating*) compulsiva e à obesidade, causando um ciclo vicioso.

A etiologia dos transtornos de ansiedade é complexa e multifatorial, envolvendo fatores biológicos, psicológicos e sócio-ambientais que interagem permanentemente entre si. Um fator de risco ambiental bem documentado para o desenvolvimento de psicopatologia é a presença de trauma. O significado de trauma e suas repercussões psíquicas e psicopatológicas na vida de um indivíduo vêm sendo estudado e caracterizado ao longo dos anos. Nas últimas

décadas, diversas pesquisas foram realizadas com o objetivo de investigar a relação entre traumas infantis e o desenvolvimento de transtornos de ansiedade. Manfro *et al.* (1996) examinaram a frequência de eventos estressores em 223 pacientes com transtorno do pânico (TP) e observaram que 80% dos pacientes apresentaram eventos estressores no ano anterior ao desenvolvimento de TP e referiam mais ansiedade na infância e comorbidade com depressão na vida adulta. Isso sugere uma incapacidade de lidar com conflitos desde a infância, e maior morbidade na vida adulta. Horesh *et al.* (1997) avaliaram a associação entre eventos estressores na infância, adolescência, vida adulta e no ano anterior ao aparecimento do TP em 44 pacientes e 44 controles de Israel e observaram que os eventos estressores foram significativamente maiores na infância e adolescência dos pacientes com TP, e não na idade adulta e no ano do aparecimento do TP. Além de situações traumáticas, como abuso sexual, alguns estudos observaram que o abuso emocional na infância e a percepção de pais muito controladores e pouco afetivos têm um efeito indireto na psicopatologia (SPERTUS *et al.*, 2003).

Um dos mecanismos investigados na relação entre eventos estressores na infância e um maior risco de psicopatologia na vida adulta é a alteração persistente no eixo HPA. Estudos com modelos animais demonstraram que o estresse no início da vida pode influenciar no desenvolvimento do eixo HPA (MEANEY *et al.*, 1996; LIU *et al.*, 2000; KALINICHEV *et al.*, 2002). Uma revisão realizada por Mello *et al.* (2003) sugere que a hiperatividade do eixo HPA encontrada em adultos com depressão e transtornos de ansiedade pode constituir um elo entre a ocorrência de adversidades na infância e o desenvolvimento de psicopatologias na vida adulta. Outros estudos clínicos encontraram níveis reduzidos de cortisol em pacientes com depressão maior sem sintomas psicóticos (POSENER *et al.*, 2000), aumento nos níveis de cortisol em resposta ao hormônio liberador de corticotrofina (CRH) e hormônio adrenocorticotrópico (ACTH) em mulheres com TP crônico (RASMUSSEN *et al.*, 2001) e

também um nível de cortisol basal reduzido em homens com TP (KANTER *et al.*, 2001), reforçando a provável alteração no funcionamento do eixo HPA na presença de determinadas psicopatologias.

2.2 RESPOSTA AO ESTRESSE – FISIOLOGIA DO EIXO HPA

“Estressor” é definido como qualquer perturbação real ou potencial no ambiente que é reconhecida ou percebida por regiões cerebrais específicas. O estado subjetivo de detecção de alterações potencialmente adversas no ambiente é chamado de “estresse” (JOËLS e BARAM, 2009).

O “estresse” requer mudanças comportamentais, assim como alterações em comportamentos futuros. Isto acontece através da modulação da função neuronal em diversos níveis do sistema nervoso central (SNC), que envolvem tomada de decisão, aprendizado e memória, assim como respostas hormonais, autonômicas e emocionais. O tipo de estressor influencia quais locais do cérebro irão perceber a ameaça, assim como os neurônios e mediadores do estresse que estarão envolvidos na resposta adaptativa, causando respostas distintas (Figura 1). (JOËLS e BARAM, 2009).

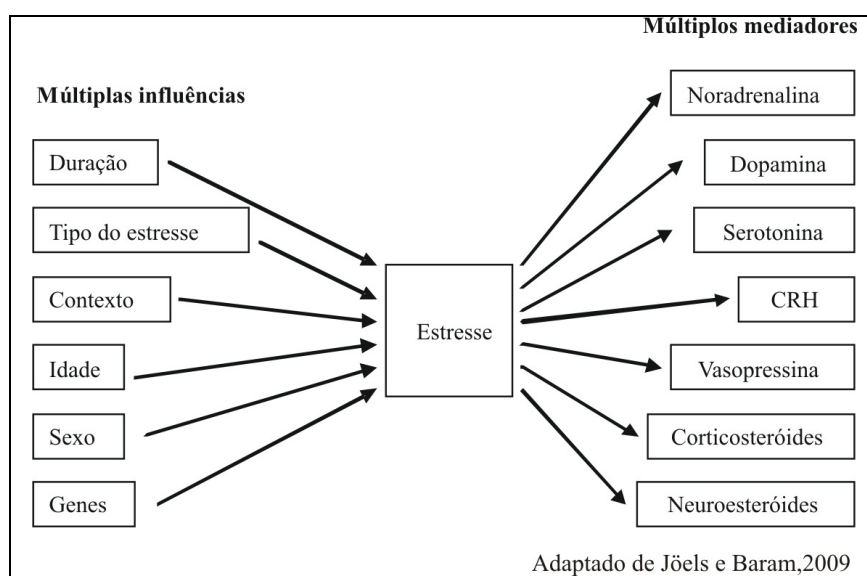


Figura 1 – Estressores distintos provocam respostas diferentes.

Como respostas adaptativas a um estressor agudo, podemos citar (1) aumento da oxigenação e nutrição do coração, cérebro e músculos, que são órgãos fundamentais para a coordenação central da resposta ao estresse e reação de “luta ou fuga” (o aumento do suprimento energético é feito principalmente pela liberação de catecolaminas e glicocorticóides que, em geral, ativam a gliconeogênese e a glicogenólise hepáticas, inibem a captação de glicose por diversos tecidos e aumentam a proteólise e a lipólise), (2) aumento do tônus cardiovascular e frequência respiratória, (3) inibição das funções vegetativas como comportamento alimentar, digestão, crescimento, reprodução e imunidade, (3) alterações comportamentais como aumento do estado de alerta e vigília, melhora da cognição e memória para o evento estressor, aumento da agressão, assim como analgesia (CHARMANDARI *et al.*, 2005; CHROUSOS, 2009).

Os componentes centrais e periféricos do sistema nervoso autônomo e o eixo HPA constituem dois pilares importantes para a manutenção das funções vitais durante a resposta ao estresse (KYROU e TSIGOS, 2007). O eixo HPA recebe e integra uma diversidade de estímulos cognitivos, emocionais, neurosensoriais e periféricos somáticos que chegam por vias distintas (CHARMANDARI *et al.*, 2005). Núcleos específicos do tronco cerebral captam estes estímulos e promovem a secreção de CRH, liberando este hormônio no sistema porta hipofisário que tem acesso à porção anterior da glândula pituitária. A ligação do CRH no seu receptor na pituitária induz a liberação do ACTH na circulação sistêmica. O principal alvo do ACTH é o córtex da glândula adrenal, onde ele estimula a síntese e secreção de glicocorticóides na zona fasciculada. Os glicocorticóides são os efetores periféricos do eixo HPA e promovem alterações fisiológicas através da ligação em seus receptores intracelulares (MUNCK *et al.*, 1984; BAMBERGER *et al.*, 1996).

Os glicocorticóides, cortisol em humanos e corticosterona em roedores, são a maior subclasse de hormônios esteróides que regulam processos metabólicos, cardiovasculares,

imunológicos e comportamentais (CHARMANDARI *et al.*, 2005; SAPOLSKY *et al.*, 2000). Existem duas formas de receptores para esses hormônios no cérebro, os receptores glicocorticóides (GR) e os receptores mineralocorticóides (MR). Os glicocorticóides se ligam com uma afinidade 10 vezes maior aos MR, localizados predominantemente no hipocampo, do que aos GR, amplamente distribuídos no cérebro. Os MR ficam saturados com baixas concentrações de glicocorticóides, enquanto altas concentrações desse hormônio (ex.: durante o estresse agudo) ocupam ambos os receptores (MR e GR) (DE KLOET *et al.*, 1998).

A regulação do eixo HPA é feita, em grande parte, por retroalimentação negativa dos glicocorticóides sobre componentes do SNC, aumentando ou diminuindo sua atividade de acordo com as necessidades fisiológicas. Várias estruturas cerebrais estão envolvidas nos processos de retroalimentação, dentre as quais se destacam o hipotálamo, a amígdala, o córtex pré-frontal e o hipocampo (CAMPEAU *et al.*, 1998; TASKER e HERMAN, 2011), sendo esta última estrutura uma das mais fortemente relacionadas à regulação do eixo, devido a sua alta concentração de receptores glicocorticóides.

2.3 ESTUDOS EXPERIMENTAIS E PROGRAMAÇÃO

A natureza e o “timing” dos eventos adversos precoces que terão seqüelas a longo prazo têm sido delineados em alguns modelos animais. Um estudo com macacos, utilizando duplas mãe-filhote, mostrou que filhotes expostos a um ambiente que provoca comportamento materno ansioso, inconsistente e, às vezes, negligente ficam mais assustados com novidades e mais dependentes de suas mães no primeiro ano de vida; e, quando adultos jovens, são tímidos, menos sociáveis e independentes (COPLAN *et al.*, 1996). Estudos clássicos com ratos manipulados, ou seja, separados de suas mães por um período breve (≤ 15 min./dia) nas primeiras semanas de vida, mostraram que os animais apresentam maior contato social com

seus pares e uma maior habilidade em lidar com estímulos estressores quando adultos (NEWPORT *et al.*, 2002; CIRULLI *et al.*, 2003; PRYCE e FELDON, 2003). Ao contrário, ratos expostos diariamente a um período maior de separação materna (>60min.) durante as primeiras semanas de vida exibem aumento de comportamentos relacionados à ansiedade e comprometimento cognitivo na vida adulta (PLOTSKY *et al.*, 2005). Sabe-se que nos animais manipulados há uma clássica persistência da exacerbação da retroalimentação negativa dos glicocorticóides na vida adulta (ADER e GROTA, 1969), com redução da expressão de RNA mensageiro (RNAm) para CRH no hipotálamo e diminuição do conteúdo de CRH na eminência média (PLOTSKY e MEANEY, 1993). Além disso, há maior concentração de receptores glicocorticóides no hipocampo (MEANEY *et al.*, 1989), com aumento da inibição mediada pelo hipocampo e diminuição da excitação mediada pela amígdala na resposta neuroendócrina do eixo HPA (DE KLOET *et al.*, 1998). Também, uma marcante diminuição da liberação de noradrenalina no núcleo paraventricular do hipotálamo (PVN) em resposta ao estresse por contenção (LIU *et al.*, 2000) contribui para uma marcada supressão crônica da resposta de liberação de glicocorticóides frente ao estresse pelo eixo. Portanto, os animais manipulados apresentam menor medo quando expostos a ambiente diferente da caixa-moradia, com maior atividade e exploração (LEVINE *et al.*, 1967), enquanto os animais separados demonstram mais medo e maior resposta ao estresse quando adultos (MACRI, 2008).

As seqüelas a longo prazo da manipulação e separação maternas têm sido atribuídas a diferenças na quantidade de cuidado materno que os filhotes recebem quando retornam para o ninho: a separação breve (manipulação) faz com que as mães lambam e amamentem mais seus filhotes (LIU *et al.*, 1997; PRYCE *et al.*, 2001). O mecanismo pelo qual o cuidado materno leva a essas alterações persistentes tem sido descrito em detalhes por Meaney e colaboradores em uma série de estudos desde a década de 90. Eles propõem que esses eventos

pós-natais (manipulação e aumento do cuidado materno) atuam através de vias serotoninérgicas ascendentes do núcleo da rafe (SMYTHE *et al.*, 1994) que induzem a expressão de receptores glicocorticóides no hipocampo (MITCHELL *et al.*, 1992; YAU *et al.*, 1997a). A serotonina atua provavelmente através do receptor 5HT7, que é regulado por glicocorticóides (YAU *et al.*, 1997b), e positivamente ligado ao AMP cíclico (AMPC). Ocorre então a estimulação de fatores de transcrição associados ao AMPC como o Fator de Crescimento do Nervo Induzível pelo Fator A (NGFI-A) (MEANEY *et al.*, 2000). A estimulação tátil promove uma elevação nos níveis de NGFI-A, aumentando a chance de ligação no exon promotor 1₇ do GR. A ligação do NGFI-A resulta em acetilação das histonas, desmetilação do DNA e ativação do exon promotor 1₇ do GR, promovendo a transcrição (WEAVER *et al.*, 2007) de um maior número de receptores glicocorticóides e, portanto, um mecanismo de retroalimentação negativa mais eficiente.

2.4 FATOR NEUROTROFICO DERIVADO DO ENCÉFALO (BDNF)

Considerando que o cuidado materno pode levar a alterações epigenéticas, Roth *et al.* (2009) investigaram, através de um modelo animal, a relação entre maus-tratos na infância e a metilação do DNA do BDNF e encontraram que o gene do BDNF permanece metilado durante toda a vida, ocorrendo uma diminuição na expressão do gene do BDNF no córtex pré-frontal na vida adulta. Eles também demonstraram que essa alteração epigenética pode ser transgeracional. Por outro lado, filhotes de mães naturalmente muito cuidadoras possuem maior expressão de BDNF no hipocampo na vida adulta, associada a maior habilidade para induzir potenciação sináptica no giro denteado e árvores dendríticas mais complexas (VAN HASSELT *et al.*, 2011).

O BDNF é uma das proteínas da família das neurotrofinas envolvida na neuroproteção, incluindo sobrevivência neuronal, na arborização dendrítica, na plasticidade neuronal e no neurodesenvolvimento (KAPCZINSKI *et al.*, 2008). Estudos clínicos e experimentais indicam que o córtex pré-frontal, o hipocampo e a amígdala podem ter um papel importante nos déficits cognitivos e nas alterações emocionais originadas por adversidades no início da vida (TEICHER *et al.*, 2003; DE BELLIS, 2005; FUMAGALLI *et al.*, 2007). Existe uma hipótese de que as alterações comportamentais induzidas pelo estresse podem ser atribuídas a mudanças na plasticidade neuronal nessas áreas (KAFFMAN e MEANEY, 2007; FUMAGALLI *et al.*, 2007; MCEWEN, 2007). Inclusive, em humanos, já foram encontradas alterações nos níveis de BDNF em diversos transtornos psiquiátricos, tais como depressão maior (BOCCHIO-CHIAVETTO *et al.* 2010), transtorno bipolar (GRANDE *et al.* 2010), esquizofrenia (XIU *et al.*, 2009) e transtorno obsessivo compulsivo (WANG *et al.*, 2011; MAINA *et al.*, 2010), considerado um transtorno de ansiedade crônico, assim como alteração nos níveis séricos dessa proteína em adultos que sofreram algum tipo de trauma precoce (GRASSI-OLIVEIRA *et al.*, 2008a).

Além disso, um polimorfismo no gene do BDNF, caracterizado pela substituição de uma valina (Val) por uma metionina (Met) no códon 66 (Val66Met), que diminui o transporte intracelular e a secreção atividade-dependente do BDNF, está associado com uma pior memória episódica, uma ativação hipocampal anormal avaliada através de imagem por ressonância magnética funcional (fMRI) (EGAN *et al.*, 2003) e a transtornos afetivos como depressão maior (VERHAGEN *et al.*, 2010) e maior presença de traços ansiosos (evitação de danos, medo da incerteza, preocupação antecipada) (MONTAG *et al.*, 2010). Utilizando um modelo animal com esse polimorfismo, Chen *et al.*, (2006) encontraram que camundongos portadores do alelo 66Met têm menor arborização dendrítica e um hipocampo com menor volume e, além disso, observaram que os camundongos homozigotos (BDNFMet/Met)

apresentam maior comportamento do tipo ansioso em testes clássicos como o campo aberto e labirinto em cruz elevado, sugerindo associação entre a fisiologia desta neurotrofina e a patogênese dos transtornos de ansiedade.

2.5 ÓXIDO NÍTRICO SINTASE (NOS)

Outros estudos têm indicado que a nNOS também pode ser um mecanismo envolvido no desenvolvimento de comportamentos relacionados à ansiedade (MIGUEL e NUNES-DE-SOUZA, 2008; WORKMAN *et al.*, 2008). A enzima NOS, a partir do aminoácido L-arginina, produz citrulina e óxido nítrico (NO), que pode funcionar como um neurotransmissor quando sintetizado pelos neurônios. Existem quatro formas de NOS: NOS neuronal (nNOS), NOS endotelial (eNOS), NOS induzível (iNOS) e a NOS mitocondrial (mtNOS) (GUIX *et al.*, 2005). A nNOS tem um papel importante no funcionamento do sistema serotoninérgico, especialmente na função pós-sináptica dos receptores 5-HT1A e/ou 5-HT1B (CHIAVEGATTO *et al.*, 2001). Entre vários receptores serotoninérgicos, o receptor 5-HT1A tem sido relacionado com a modulação do humor e comportamentos do tipo ansioso (SARGENT *et al.*, 2000; GROSS *et al.*, 2002). A ansiedade e a depressão são frequentemente associadas com subsensibilização (*downregulation*) do receptor 5-HT1A no hipocampo e no lobo temporal (GROSS *et al.*, 2000). Como os receptores serotoninérgicos e a nNOS provavelmente têm papel no desenvolvimento de comportamentos relacionados à ansiedade, Zhang *et al.* (2010) investigaram a relação entre esses dois possíveis mecanismos e encontraram que a inibição da nNOS produz efeitos ansiolíticos e anula o efeito ansiogênico do antagonista do receptor 5-HT1A, sugerindo que a serotonina pode regular comportamentos do tipo ansioso através da rota HT1AR-nNOS-CREB no hipocampo.

3 JUSTIFICATIVA

As desordens psiquiátricas, dentre elas a ansiedade, podem ser precipitadas por exposição ao estresse e levam a desfechos desfavoráveis tanto a nível psicológico/comportamental quanto metabólico. Há uma estreita relação entre estresse e ansiedade, quando imaginamos que a sensação de ansiedade é estressante, assim como a exposição ao estresse leva a alterações neuroendócrinas associadas aos estados ansiosos. Logo, torna-se necessária a elaboração de estudos que tentem explicar os mecanismos envolvidos nessas associações. A abordagem translacional, que reúne dados de estudos básicos e epidemiológicos/clínicos surge como uma nova forma de pesquisa importante para a investigação, possibilitando a aplicação de conceitos adquiridos em experimentos com animais para gerar hipóteses e questões relevantes à fisiologia humana, assim como a busca de possíveis mecanismos que expliquem os achados clínicos. A utilização do modelo animal torna possível que as hipóteses da pesquisa sejam respondidas de forma rápida, além de possibilitar o controle ambiental, evitando variáveis confundidoras, e o acesso a todos os tecidos corporais.

4 OBJETIVOS

4.1 OBJETIVO GERAL

Propor um modelo animal para o desenvolvimento de comportamentos relacionados à ansiedade, utilizando, como intervenção, um ambiente neonatal hostil que provoca estresse crônico na díade mãe-filhote afetando o cuidado materno.

4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Descrever o comportamento materno durante o período de intervenção neonatal.
- Descrever o crescimento e o consumo alimentar dos animais ao longo da vida.
- Avaliar o consumo de alimento palatável na vida adulta.
- Avaliar aspectos metabólicos como o acúmulo de gordura abdominal, o perfil lipídico e a glicose plasmática na vida adulta dos animais.
- Avaliar o desenvolvimento de comportamento do tipo ansioso na vida adulta em teste clássico como o labirinto em cruz elevado e o campo aberto.
- Verificar potenciais mecanismos relacionados ao desenvolvimento de ansiedade, como o papel do BDNF, da nNOS e da resposta ao estresse.
- Relacionar os achados desta pesquisa básica com uma pesquisa clínica que avaliou o cuidado materno, a presença de ansiedade e o BDNF sérico em escolares.

5 HIPÓTESE

Um ambiente neonatal hostil, que provoca estresse crônico na díade mãe-filhote e altera o cuidado materno está associado ao desenvolvimento de comportamentos relacionados à ansiedade na vida adulta, sendo o BDNF um marcador periférico de maior risco para essa psicopatologia nesses indivíduos. Como hipótese secundária, propomos que as associações descritas no modelo animal refletem correlações semelhantes em humanos.

6 METODOLOGIA

6.1 ESTUDO EXPERIMENTAL

6.1.1 Animais

Ratas Wistar prenhas nulíparas, acasaladas na Unidade de Experimentação Animal do Hospital de Clínicas de Porto Alegre (UEA-HCPA), permaneceram em caixas-moradia individuais, especialmente desenvolvidas para este modelo animal, medindo 40cm x 40cm x 30cm, com assoalho de malha metálica (1cm x 1cm) que permitisse apenas a passagem das fezes e urina para um coletor localizado na parte inferior da caixa. Durante toda a gestação, as fêmeas foram mantidas nessas caixas-moradia com o assoalho recoberto com maravalha e em um ambiente controlado: ciclo claro/escuro de 10/14horas (luzes acendiam às 9:00h e apagavam às 19:00h), temperatura de $22 \pm 2^{\circ}\text{C}$, água e comida *ad libitum*. A limpeza das caixas-moradia foi realizada uma vez por semana. O dia do nascimento dos filhotes foi considerado o Dia 0. O comportamento materno foi monitorado do dia 1 ao dia 9 de vida. No dia 2, as fêmeas e suas ninhadas foram randomizadas para dois grupos (ver abaixo). No dia 10, as fêmeas e seus filhotes foram removidos para uma caixa-moradia padrão, medindo 46cm x 31cm x 16cm, com o assoalho recoberto com maravalha e mantidos no mesmo ambiente controlado citado acima.

No dia 21 de vida, os filhotes foram desmamados e separados por sexo em dois ou três por caixa-moradia e mantidos em um ambiente controlado: ciclo claro/escuro de 12/12h (luzes acendiam às 7:00h e apagavam às 19:00h), temperatura de $22 \pm 2^{\circ}\text{C}$, água e comida *ad libitum*. Para evitar excesso de manipulação dos animais, a limpeza das caixas-moradia foi realizada uma vez por semana, momento em que também se realizavam as pesagens dos

animais e da ração consumida, utilizando uma balança da marca Marte® com precisão de 0,01g.

Foram utilizadas no total 17 ninhadas, sendo os filhotes machos e fêmeas distribuídos para diferentes experimentos, conforme a figura 2. O tamanho da ninhada variou de 3 a 15, mas a média do número de filhotes não foi diferente entre os grupos (média±DP – controle: 8,9±3,68 e intervenção: 10,3±3,39, p=0,409), sendo esta variável utilizada como co-variável em determinadas análises (ver “Análises Estatísticas”). As 17 ninhadas utilizadas para a observação do cuidado materno foram divididas em duas coortes e, ao comparar os componentes do cuidado materno entre as duas, não foram observadas diferenças estatísticas significativas.

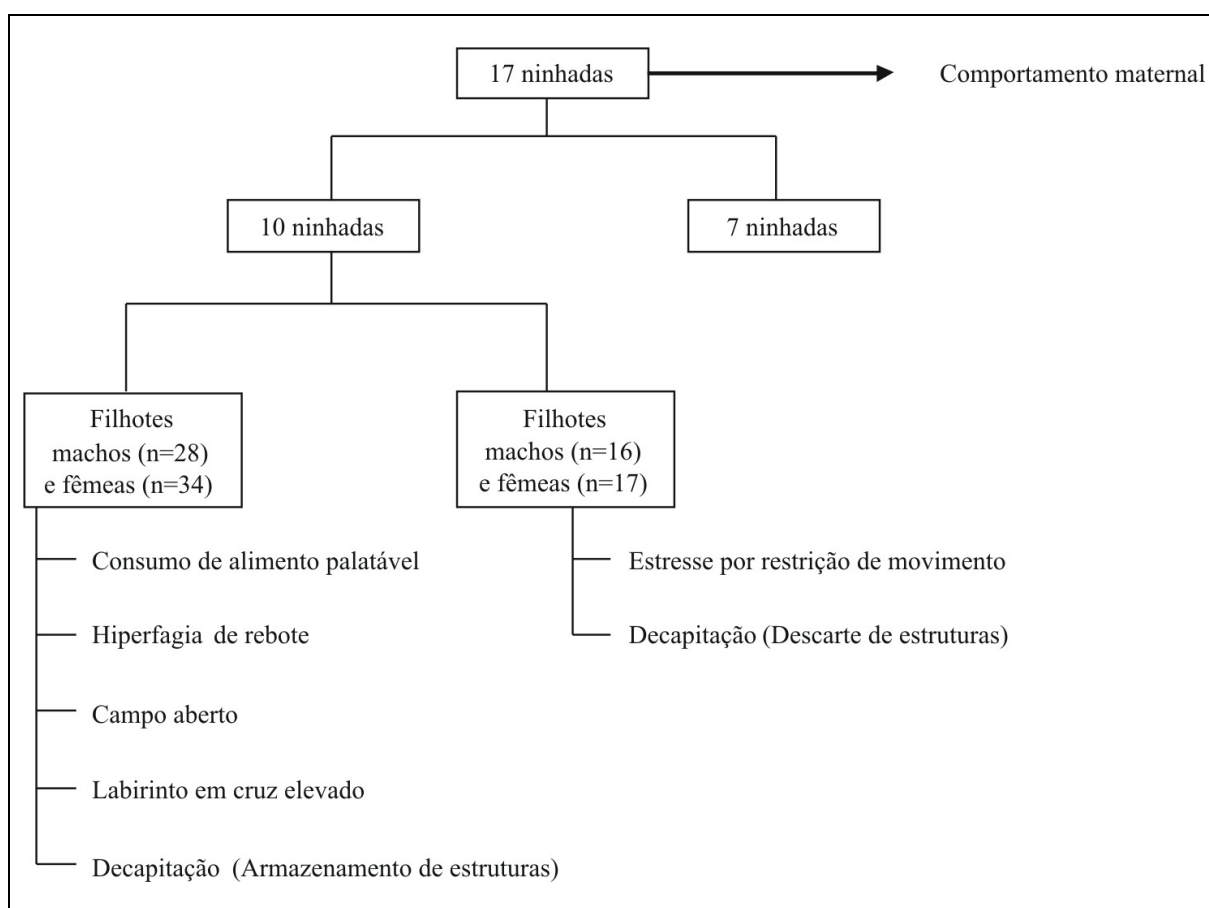
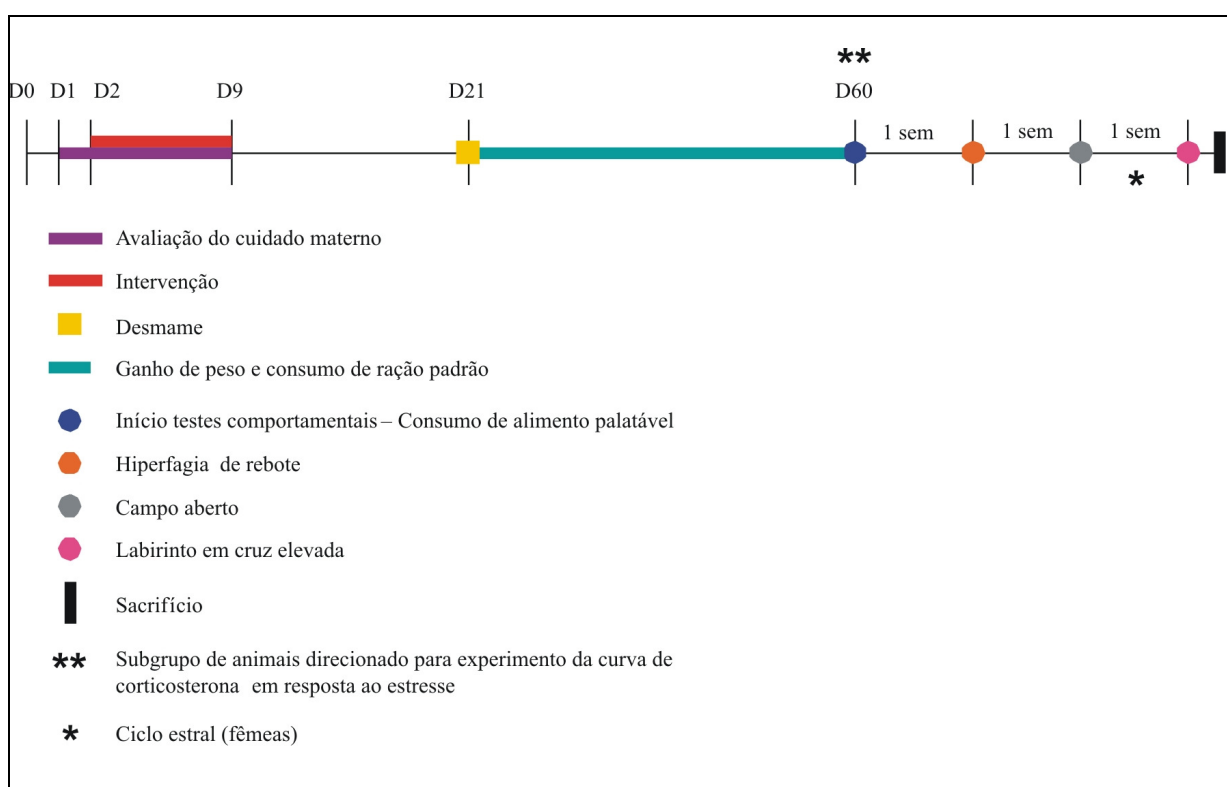


Figura 2 – Esquema mostrando a distribuição das ninhadas nos diferentes experimentos realizados.

Os testes comportamentais iniciaram no dia 60 de vida, momento em que os animais são considerados adultos. Cada animal foi utilizado para quatro testes comportamentais (consumo de alimento palatável, hiperfagia de rebote, campo aberto e labirinto em cruz elevado), exceto os animais submetidos ao teste de estresse por restrição de movimento que fizeram apenas esse procedimento. Para minimizar o efeito da ninhada, optou-se por utilizar no máximo dois animais de cada ninhada/grupo/experimento. Todos os testes foram realizados em salas comportamentais aclimatadas na UEA-HCPA. A figura 3 ilustra a linha de tempo do procedimento experimental e testes comportamentais.



D: dia de vida; sem: semana

Figura 3 – Linha de tempo do procedimento experimental e testes comportamentais.

6.1.2 Grupos

Grupo intervenção (ambiente neonatal hostil): seguindo os procedimentos descritos por Ivy *et al.* (2008), o grupo intervenção teve restrição do material para a confecção do ninho

durante oito dias (do dia 2 ao dia 9 pós-natal). A restrição consistiu em remover a maravalha da caixa-moradia, no dia 2, sem tocar nos animais, e oferecer um total de apenas 2000 cm³ de papel toalha para a confecção de um ninho rudimentar neste período. A urina e as fezes dos animais se depositavam no coletor localizado na parte inferior da caixa, e o assoalho de malha metálica era, geralmente, conservado limpo pela genitora. Todas as ninhadas foram mantidas sem troca do papel toalha do dia 2 ao dia 9.

Grupo controle: no grupo controle as genitoras tiveram à sua disposição quantidade suficiente de maravalha para a construção do ninho (aproximadamente 7200 cm³). Todas as ninhadas foram mantidas com este volume de maravalha, sem troca de caixa-moradia do dia 2 ao dia 9.

6.1.3 Observações do cuidado materno

Seguindo os procedimentos descritos por Champagne *et al.* (2003), o comportamento materno de cada genitora foi observado diariamente em cinco períodos, de 72 minutos cada, do dia 1 ao dia 9 pós-natal, por observadores que receberam treinamento padronizado no grupo de pesquisa para a realização desta tarefa. As observações ocorriam sempre nos mesmos horários, sendo três períodos durante a fase clara (10:00h, 13:00h, 17:00h) e dois períodos durante a fase escura (07:00h e 20:00h). Em cada período de observação, o comportamento da genitora foi registrado a cada três minutos (25 observações/dia x 5 períodos/dia = 125 observações/genitora/dia), sendo que o observador registrava o comportamento que estava acontecendo no instante em que ele olhava para os animais (ou seja, como se o observador tirasse uma foto do que estava acontecendo exatamente no instante da observação). Os seguintes comportamentos maternos foram registrados:

- a) Genitora em contato com os filhotes.

- b) Genitora fora do ninho.
- c) Genitora amamentando os filhotes, conforme a posição do dorso arqueado: (1), (2), (3) ou (4); sendo a posição (1) a menos arqueada e a posição (4) a mais arqueada.
- d) Genitora amamentando os filhotes de forma passiva, ou seja, quando ela está deitada de costas ou de lado ao amamentar.
- e) Genitora lambendo (*licking and grooming*) (LG) qualquer filhote.

As categorias comportamentais não são exclusivas, por exemplo, frequentemente a genitora lambia seus filhotes enquanto os amamentava. Os escores de cada comportamento foram calculados dividindo a frequência do comportamento pelo número total de observações utilizando uma planilha de Microsoft Excel®. O escore do contato puro foi calculado a partir do escore do contato total com os filhotes, subtraindo desse valor o contato no momento da amamentação e o contato no momento da lambida. Sendo assim, o contato puro significa que a genitora estava com seus filhotes, mas não os estava amamentando e nem lambendo, sendo considerado um contato de baixa qualidade (ou contato sem cuidado materno).

6.1.4 Avaliação do consumo de ração padrão

Desde o desmame até o início dos testes comportamentais, foi realizada a avaliação do consumo semanal de ração padrão por caixa-moradia. Uma quantidade conhecida de ração padrão foi colocada nas caixas-moradia e as sobras foram pesadas no final de cada semana, utilizando uma balança da marca Marte® com precisão de 0,01g. A quantidade de ração consumida foi calculada por caixa-moradia, sendo os resultados obtidos dividindo o consumo

total da caixa-moradia pelo número de ratos presentes na caixa. Os resultados foram calculados em gramas/dia/rato.

6.1.5 Testes comportamentais

6.1.5.1 Consumo de alimento palatável

Para a realização do teste em estado alimentado, os animais foram habituados ao ambiente contendo o novo alimento (Froot Loops® da Kellogs - rosquinhas de amido de milho, trigo e sacarose) por cinco dias tendo disponível apenas 80% do consumo habitual de ração padrão, o que é considerado uma restrição leve (SILVEIRA *et al.*, 2005). Nesses seis dias (habituação + teste) cada animal foi colocado sozinho, durante três minutos, em uma caixa-moradia, sem maravalha, com uma quantidade pré-pesada (em torno de 10 rosquinhas) de alimento doce disponibilizada em um dos cantos da caixa. Após cada habituação, quando os animais voltavam para sua caixa-moradia, disponibilizavam-se duas unidades de alimento doce por rato, para auxiliar na adaptação ao novo alimento. A quantidade de alimento doce ingerido em todas as seções de habituação em restrição alimentar, e no dia do teste, em estado alimentado, foi avaliada pesando o remanescente após cada exposição, utilizando uma balança da marca Marte® com precisão de 0,01g. Os animais que não consumiram o alimento doce em nenhum dos dias da habituação foram considerados como tendo falhado na habituação e, portanto foram excluídos das análises. As habituações e o teste foram realizados das 9:00h às 13:00h.

6.1.5.2 Hiperfagia de rebote

Este teste avaliou o consumo de alimento padrão habitual na caixa-moradia após jejum de 24h. Depois do período de jejum, uma quantidade conhecida de ração padrão ficou disponível na caixa-moradia por 24h (IWASAKI *et al.*, 2000), sendo medidas as sobras ao final desse período, utilizando uma balança da marca Marte® com precisão de 0,01g.

6.1.5.3 Teste do campo aberto

O teste do campo aberto foi realizado em uma arena circular, medindo 78 cm de diâmetro, com assoalho dividido em 25 quadrantes, cercada por paredes de acrílico de 36 cm (Figura 4). Os movimentos dos animais no campo aberto foram filmados durante 5 minutos em dois dias consecutivos (treino e teste). Após cada teste, o aparato foi higienizado com álcool 70%. As filmagens foram, posteriormente, avaliadas com a utilização do software livre OpenFLD v1.0, desenvolvido por Stefano Pupe Johann (disponível em <http://blog.sbneec.org.br/2010/07/software-gratuitos-para-analise-do-labirinto-em-cruz-elevado-e-campo-aberto/>), por um observador cego para a intervenção neonatal. Os seguintes componentes comportamentais foram analisados: locomoção (número de linhas cruzadas); respostas de orientação (*rearing* - ficar em pé sobre as patas traseiras), que é uma medida de exploração ambiental; *grooming* (auto-limpeza), que é um comportamento do tipo ansioso; e tempo de permanência nos quadrantes centrais, que reflete menor ansiedade (LIMA *et al.*, 2010). Os treinos e os testes foram realizados das 9:00h às 13:00h.

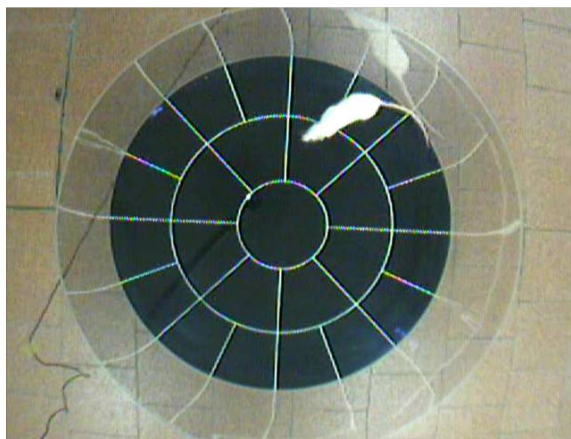


Figura 4 – Vista de cima do aparato utilizado para o teste do campo aberto.

6.1.5.4 Teste do labirinto em cruz elevado

O teste do labirinto em cruz elevado é específico para avaliar o comportamento do tipo ansioso, por isso as fêmeas tiveram o ciclo estral acompanhado, sendo que todas foram avaliadas no primeiro dia do diestro, quando a flutuação hormonal é menor (MARCONDES *et al.*, 2001; SEVERINO *et al.*, 2004). A fase do ciclo estral foi determinada por esfregaço vaginal todas as manhãs entre 8:00h e 9:00h, procedimento iniciado uma semana antes do teste. No dia do teste, a fase do ciclo (diestro) foi confirmada 1 hora antes da exposição ao aparato. Todos os animais foram transferidos para a sala observacional, iluminada com luz vermelha, 30 minutos antes do início do teste para que houvesse habituação ao local. Os testes ocorreram entre 10:00h e 13:00h. O aparato do labirinto em cruz elevado é feito de madeira, fica 64 cm elevado do chão, e possui: dois braços opostos abertos (50 X 10 cm) com borda de 0,5 cm de altura, dois braços opostos fechados sem cobertura (50 X 10 X 40 cm), e um quadrado central aberto (10 X 10 cm) (Figura 5). No momento do teste, o animal foi colocado no quadrado central do labirinto, olhando para um dos braços abertos, e deixado no aparato por cinco minutos, sendo filmado continuamente durante esse período. Após cada teste, o aparato foi higienizado com álcool 70%. Posteriormente, um observador cego para a

intervenção neonatal avaliou as filmagens, utilizando o software livre PlusMZ v1.0, desenvolvido por Stefano Pupe Johann (ver disponibilidade acima). Os seguintes componentes foram analisados: o número de entradas/tempo de permanência nos braços abertos e fechados e o número de mergulhos nos braços abertos (SEVERINO *et al.*, 2004).



Figura 5 – Aparato utilizado para o teste do labirinto em cruz elevado.

6.1.6 Curva de corticosterona em resposta ao estresse por restrição de movimento

Após o 60^o dia de vida, um subgrupo de animais intactos (ou seja, que não tinham realizado nenhum teste comportamental) representativo de cada grupo foi submetido a esse experimento. Os animais foram envoltos em uma toalha e tiveram 3 mm da ponta de sua cauda cortada com um bisturi. Um pequeno volume de sangue (0,15 ml) foi coletado da cauda do animal, realizando massagens suaves da base até a ponta. Depois disso, os animais foram rapidamente imobilizados em um tubo plástico de diâmetro variável, com uma das extremidades aberta para permitir a entrada de ar, fixado com fita adesiva, de forma a restringir a mobilidade dos grandes grupos musculares. Os animais ficaram imobilizados por 20 minutos e amostras adicionais de sangue foram obtidas ao final da imobilização e aos 20, 40 e 70 minutos subsequentes (TANNENBAUM *et al.*, 1997). As amostras sanguíneas foram

coletadas em tubos heparinizados, entre as 9:00h e 11:00h, centrifugadas a 4000 rotações por minuto (rpm) por 10 minutos a 4°C e o plasma foi armazenado a -80°C até serem analisados os níveis de corticosterona em resposta ao estresse (ver abaixo).

6.1.7 Coleta e armazenamento de tecidos

Um dia depois do último teste comportamental, os animais foram decapitados, após jejum de 4 horas, com aproximadamente 120 dias de vida. Uma amostra de cada grupo foi injetada com insulina intra-peritoneal (IP) 15 minutos antes da decapitação, porém dados neuroquímicos e bioquímicos destes animais não foram utilizados neste trabalho. O sangue do tronco foi coletado em tubos heparinizados para determinação dos níveis plasmáticos de glicose, colesterol total, lipoproteína de alta densidade (HDL), lipoproteína de baixa densidade (LDL) e triglicerídeos (TGs). As amostras sanguíneas foram centrifugadas a 4000 rpm por 10 minutos a 4°C e o plasma separado e armazenado a -80°C até o dia das análises.

Após a decapitação, o cérebro foi rapidamente removido e congelado, através de imersão no isopentano, e armazenado a -80°C. Posteriormente, os cérebros foram descongelados até -20°C e foram realizados cortes para a retirada de *punches* das áreas cerebrais de interesse (hipocampo, amígdala e substância cinzenta periaquedutal). Os cortes e *punches* foram realizados com o auxílio de um atlas da estrutura cerebral do rato (SWANSON, 1998).

As duas maiores porções de gordura abdominal (gonadal e retroperitoneal) foram dissecadas e pesadas usando uma balança da marca Marte® com precisão de 0,01g. Os resultados da quantidade de gordura abdominal foram calculados como percentual do peso corporal.

6.1.8 Análises bioquímicas e neuroquímicas

Os níveis plasmáticos de glicose, colesterol total, HDL e TGs foram determinados no Laboratório de Análises Clínicas do HCPA pelo método enzimático colorimétrico e os níveis de LDL foram estimados através da equação de Friedewald.

A corticosterona e o BDNF plasmáticos foram avaliados por ELISA, usando os kits comerciais Corticosterone EIA Kit Enzo Life Sciences Int'l Inc., Plymouth Meeting, PA, USA e ChemiKine™ Brain Derived Neurotrophic Factor (BDNF) Sandwich ELISA Kit, Millipore, USA, respectivamente, seguindo as instruções dos fabricantes.

Para determinar os níveis de BDNF na amígdala, hipocampo e substância cinzenta periaquedutal foi realizada a homogenização do tecido com tampão de extração nuclear (10 mM HEPES, 10mM KCl, 0,1mM EDTA, 0,1mM EGTA, pH 7,9) adicionado de um inibidor de protease (100:1). Em seguida, acrescentou-se um detergente a 1% (Nonidet P40 1%) e o homogeneizado foi centrifugado a 6000 rpm por 10 minutos a 4°C. O sobrenadante foi retirado para a avaliação dos níveis de BDNF por ELISA (ChemiKine™ Brain Derived Neurotrophic Factor (BDNF) Sandwich ELISA Kit, Millipore, USA), como previamente descrito. Os resultados foram normalizados pela quantidade total de proteínas presente no sobrenadante, medida pelo método de BCA (Pierce® BCA Protein Assay Kit, Thermo Scientific, USA), seguindo as instruções do fabricante. Os valores de BDNF foram calculados como ng por mg de proteína.

Para analisar a produção de NO no hipocampo, o tecido foi homogeneizado (1:10) com tampão fosfato de potássio 50mM (pH 7,4), contendo 1mM de EDTA. O homogeneizado foi centrifugado a 4000 rpm por 10 minutos a 4°C e o sobrenadante foi utilizado para a quantificação protéica por BCA (Pierce® BCA Protein Assay Kit, Thermo Scientific, USA) e para determinar a produção de NO através da mensuração dos metabólitos nitrato (NO₃⁻) e

nitrito (NO₂⁻), de acordo com Miranda *et al.* (2001). De forma simplificada, 85µL de cloreto de vanádio foi misturado a 85µL do sobrenadante para redução completa do nitrato a nitrito. Depois, 85µL do reagente de Griess (uma mistura de N-1-naftiletilenodiamino e sulfonilamida) foram adicionados e incubou-se em banho-maria por 1h a 37°C em uma sala escura. O resultado do pigmento rosa foi determinado por espectrofotometria a 540nm. A curva padrão foi feita utilizando nitrato de sódio e cada ponto da curva passou pelos mesmos passos realizados com o sobrenadante. Os valores da produção de óxido nítrico foram calculados como nmol por mg de proteína.

As determinações de corticosterona, BDNF e NO foram realizadas no Laboratório de Neurobiologia do Estresse do Departamento de Bioquímica da UFRGS.

6.2 ESTUDO CLÍNICO

6.2.1 Sujeitos

Um total de 2457 adolescentes, alunos de seis escolas pertencentes à área de atendimento da Unidade Básica de Saúde do HCPA que concordaram em participar do estudo, fizeram parte deste estudo transversal preliminar. Esta amostra foi desenhada, primeiramente, para investigar transtornos de ansiedade na comunidade e, em seguida, privilegiou a amostragem de casos de adolescentes ansiosos, conforme explicado abaixo. A descrição detalhada do estudo pode ser encontrada em Salum *et al.* (2011a). De maneira simplificada, todos os sujeitos que foram classificados no quartil superior quando analisados pela escala *Screen for Children and Anxiety Related Emotional Disorders* (SCARED) (ISOLAN *et al.*, 2011) e amostras de 10% de cada um dos outros três quartis foram convidados para seguir uma avaliação clínica mais extensa, que compreendeu avaliação

nutricional e diagnóstico psiquiátrico. O seguimento da pesquisa foi realizado com uma sub-amostra de 129 adolescentes que aceitaram completar todas as avaliações presentes no protocolo, incluindo genotipagem. O desenho da amostra foi escolhido de forma a garantir poder para investigar o efeito da ansiedade, assim como sintomas internalizantes e transtornos relacionados.

6.2.2 Questionários utilizados neste trabalho

O *Screen for Children and Anxiety Related Emotional Disorders* (SCARED), validado para a utilização em crianças e adolescentes brasileiros (ISOLAN *et al.* 2011) foi aplicado para avaliar sintomas ansiosos de acordo com o DSM-IV. É uma escala autoaplicativa composta por 41 itens que podem ser agrupados em cinco subescalas de sintomas ansiosos: transtorno de ansiedade de separação, transtorno de pânico, transtorno de ansiedade social ou fobia social, transtorno de ansiedade generalizada e fobia escolar.

A adaptação transcultural do Parental Bonding Instrument (PBI) para o português foi utilizada para mensurar o cuidado materno. O PBI é representado por uma escala *Likert-like* (0 to 3) consistindo em 25 itens relacionados a cuidados maternos e paternos retrospectivos. Essa escala considera dois fatores: afeto (afeto, calor, disponibilidade, cuidado, sensibilidade *versus* frieza e rejeição) e controle ou proteção (controle, intrusão *versus* encorajamento da autonomia). A avaliação da proteção apresenta itens sugerindo controle, superproteção, intrusão, contato excessivo, infantilização e prevenção de comportamentos independentes, que indicam alta superproteção, e itens sugerindo encorajamento de independência, que indicam baixa superproteção (PARKER *et al.*, 1979, HAUCK *et al.*, 2006, SEGANFREDO *et al.*, 2009). Neste trabalho foi utilizada somente a escala PBI relacionada à mãe.

6.2.3 Coleta de sangue, armazenamento das amostras e análise bioquímica

Amostras sanguíneas dos adolescentes, em jejum de 10 a 12h, foram coletadas no turno da manhã (entre 7:00h e 10:00h) por punção venosa. As amostras coletadas foram imediatamente transportadas, em caixas térmicas com gelo, para o Laboratório de Patologia Clínica do HCPA, onde foi realizada a centrifugação a 4500 rpm por 5 minutos a 4°C e a separação do soro. As amostras foram armazenadas a -80°C. Todas as análises dos níveis de BDNF foram realizadas no mesmo dia utilizando um kit comercial sanduíche para ELISA (R&D Systems, Minneapolis, Minnesota), seguindo as instruções do fabricante (mais detalhes em SALUM *et al.*, 2011b).

6.2.4 Extração de DNA e genotipagem

O DNA foi extraído de amostras de saliva utilizando o kit comercial DNA 2006 Oragene® Kit (Laboratory Protocol for Manual Purification of DNA from 4,0mL of Oragene® DNA saliva). A genotipagem para o polimorfismo Val66Met do BDNF foi baseada na técnica descrita por Ribases *et al.* (2004), que divide os indivíduos em portador de Met ou não portador de Met.

6.3 ASPECTOS ÉTICOS

6.3.1 Animais

Todos os procedimentos animais foram aprovados, em seus aspectos éticos e metodológicos de acordo com as Diretrizes e Normas Nacionais e Internacionais,

especialmente a Lei 11.794 de 08/10/2008, que estabelece procedimentos para o uso científico de animais, pela Comissão Científica e pela Comissão de Ética no Uso de Animais do Grupo de Pesquisa e Pós-Graduação do HCPA (GPPG/HCPA) (número do protocolo 09-527).

6.3.2 Humanos

A pesquisa clínica foi aprovada, em seus aspectos éticos e metodológicos de acordo com as Diretrizes e Normas Regulamentadoras de Pesquisas envolvendo Seres Humanos Resolução (196/96), pelo Comitê de Ética do HCPA do Grupo de Pesquisa e Pós-Graduação do HCPA (GPPG/HCPA) (número do protocolo 08-017). Tanto os pais ou responsáveis, como as crianças ou adolescentes foram informados e esclarecidos acerca dos objetivos da pesquisa. Foi garantido o sigilo com relação à identidade, privacidade e confidencialidade dos dados obtidos. Na primeira fase da pesquisa, foi utilizado um termo de dissentimento para a coleta dos dados. Nas fases seguintes foram coletados consentimentos informados separados dos responsáveis e da criança ou adolescente.

6.4 ANÁLISES ESTATÍSTICAS

6.4.1 Animais

Todos os dados coletados foram digitados e analisados no programa *Statistical Package for the Social Sciences* (SPSS) versão 18.0 (SPSS Inc., IBM Company, Chicago, EUA).

Para comparar os grupos experimentais com relação a uma variável quantitativa foram utilizados os testes: ANOVA de uma via, utilizando como fator o grupo (cuidado materno);

ANOVA de duas vias, utilizando como fatores o grupo e o sexo (consumo de alimento palatável, hiperfagia de rebote, teste do campo aberto, teste do labirinto em cruz elevado, análises bioquímicas, gordura abdominal, níveis de BDNF e quantidade de NO) e, quando necessário levar em consideração o comportamento da variável ao longo do tempo, a ANOVA de medidas repetidas, utilizando como fatores o grupo e o sexo (peso corporal, consumo de ração padrão e curva de corticosterona em resposta ao estresse). Nos casos em que foi encontrado efeito do tamanho da ninhada, essa variável foi utilizada como co-variável (cuidado materno, peso corporal, consumo de ração padrão, análises bioquímicas e gordura abdominal). Para comparar os grupos experimentais com relação a uma variável qualitativa foi utilizado o teste do Qui-Quadrado (realização do comportamento de *Grooming* durante o teste de campo aberto). Para correlação entre o cuidado materno e os níveis de BDNF utilizou-se a correlação de Pearson.

O tamanho da amostra variou conforme o experimento, sendo apresentado individualmente na seção Resultados.

Em todas as análises foi considerado o nível de significância de 5%.

6.4.2 Humanos

A correlação de Pearson foi utilizada para correlacionar os domínios do PBI (cuidado “caloroso”, autoritarismo e superproteção) com os diferentes escores do SCARED (ansiedade de separação, transtorno de pânico, fobia social, transtorno de ansiedade generalizada e fobia escolar). Os dados foram divididos de acordo com a presença ou não do polimorfismo Val66Met do BDNF para investigação da existência de correlação entre os escores do PBI e os níveis de BDNF através da correlação de Pearson.

Os dados foram analisados no programa SPSS versão 18.0 (SPSS Inc., IBM Company, Chicago, EUA). Em todas as análises foi considerado o nível de significância de 5%.

7 RESULTADOS

7.1 ESTUDO EXPERIMENTAL

7.1.1 Cuidado materno

A média do LG foi semelhante entre o grupo controle e o grupo intervenção, no entanto, o desvio padrão do LG foi 2,7 vezes menor no grupo intervenção. A distribuição do escore do LG, conforme os grupos, está apresentada na figura 6. O percentual de tempo que as genitoras do grupo intervenção amamentaram seus filhotes foi maior [F(1,14)=6,00, p=0,028], porém encontrou-se um maior tempo de amamentação nas posições 1 e 2 [F(1,14)=16,67, p=0,001], consideradas posturas menos eficazes, nesse mesmo grupo. O percentual de tempo que as genitoras do grupo intervenção ficaram fora do ninho foi menor [F(1,14)=10,57, p=0,006], sendo assim, elas passaram mais tempo em contato com seus filhotes, quando comparadas às genitoras do grupo controle. Porém, observou-se que as genitoras do grupo intervenção estiveram mais tempo no ninho sem amamentar e sem lambe seus filhotes, demonstrando um maior tempo de contato de baixa qualidade [F(1,14)=5,30, p=0,037] (Tabela 1).

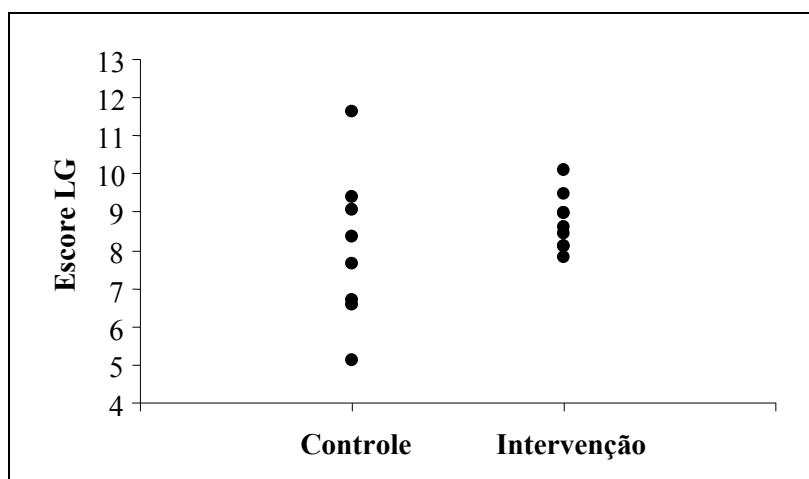


Figura 6 – Distribuição do escore do LG nos grupos controle (n=8) e intervenção (n=9).

Tabela 1 – Comparação entre as médias das variáveis relacionadas com o cuidado materno.

Variáveis	Controle (n=8)	Intervenção (n=9)	valor <i>p</i>
LG	8,06±2,02	8,73±0,73	0,630
Fora do ninho	44,01±5,48	35,24±2,76	0,006*
Contato puro ^a	5,66±2,38	7,43±2,85	0,037*
Amamentação total	49,63±5,63	56,10±6,68	0,028*
Amamentação passiva	5,05±2,28	3,80±2,37	0,299
Posição de amamentação 1 e 2	32,86±6,97	40,76±5,85	0,001*
Posição de amamentação 3 e 4	11,73±4,70	11,53±4,96	0,635

ANOVA de uma via; usando como co-variável o tamanho da ninhada; valores expressos em média ± DP; * $p < 0,05$

^a percentual do tempo em contato sem amamentar e sem lambe os filhotes, ou seja, contato de baixa qualidade

7.1.2 Peso corporal

A ANOVA de medidas repetidas, considerando oito semanas de acompanhamento de ganho de peso, utilizando grupo e sexo como fatores e o tamanho da ninhada como co-variável, demonstrou que houve efeito do tempo [$F(7,630)=652,63$, $p < 0,0001$], mostrando que os animais ganharam peso ao longo das semanas, assim como interação entre o tempo e o tamanho da ninhada [$F(7,630)=6,61$, $p=0,012$], no qual filhotes nascidos de ninhadas maiores ganharam menos peso ao longo do tempo. Também se encontrou efeito do sexo [$F(1,90)=305,91$, $p < 0,0001$], confirmando que os machos pesaram mais que as fêmeas, conforme esperado. Não se observou efeito do grupo [$F(1,90)=3,30$, $p=0,073$], nem interação entre outras variáveis (Figura 7).

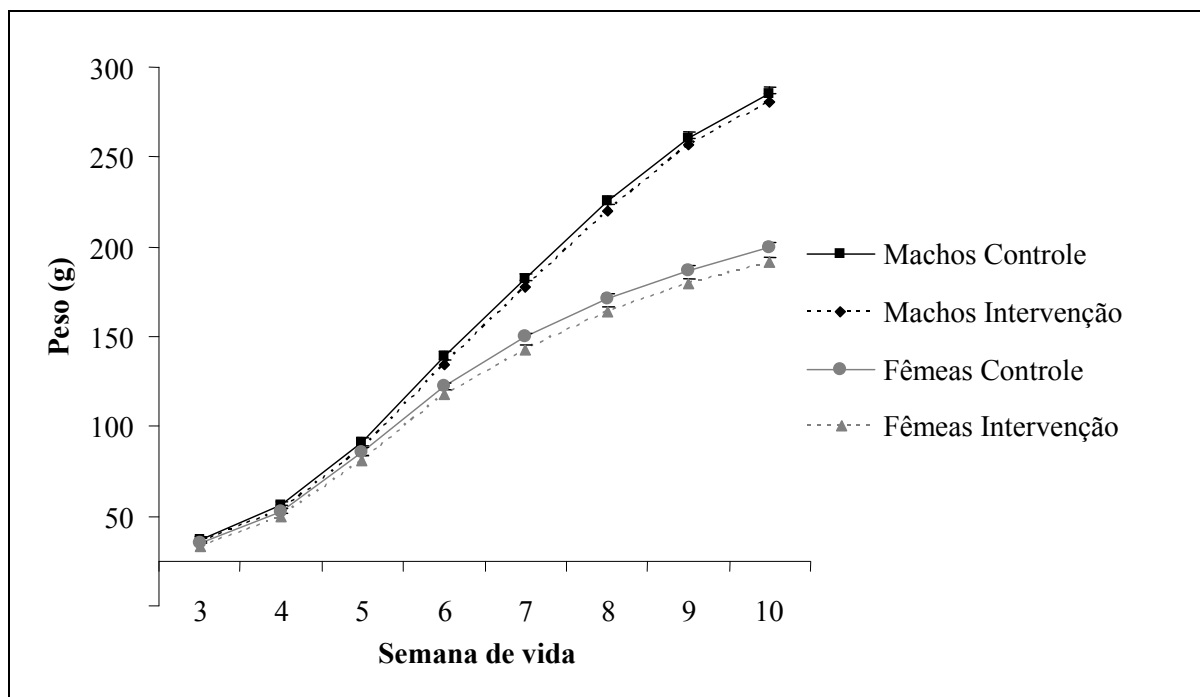


Figura 7 - Peso corporal, ao longo de oito semanas de vida após o desmame, nos machos controle (n=16), machos intervenção (n=28), fêmeas controle (n=27) e fêmeas intervenção (n=24). Dados expressos em média \pm EP. ANOVA de medidas repetidas mostrou efeito do tempo ($p < 0,0001$) e do sexo ($p < 0,0001$).

7.1.3 Consumo de ração padrão

A ANOVA de medidas repetidas, considerando cinco semanas de acompanhamento do consumo de ração padrão, utilizando grupo e sexo como fatores e o tamanho da ninhada como co-variável, demonstrou que houve efeito do tempo [$F(4,136)=50,54$, $p < 0,0001$], mostrando que os animais consumiram mais ração ao longo das semanas, assim como efeito do tamanho da ninhada [$F(1,34)=16,44$, $p < 0,0001$], no qual filhotes nascidos de ninhadas maiores consumiram menos ração. Também se encontrou efeito do sexo [$F(1,34)=144,27$, $p < 0,0001$], confirmando que os machos consumiram mais ração que as fêmeas, e efeito do grupo [$F(1,34)=11,22$, $p=0,002$], sendo que os animais do grupo intervenção consumiram menos ração que os animais do grupo controle. Não houve interação entre as variáveis (Figura 8).

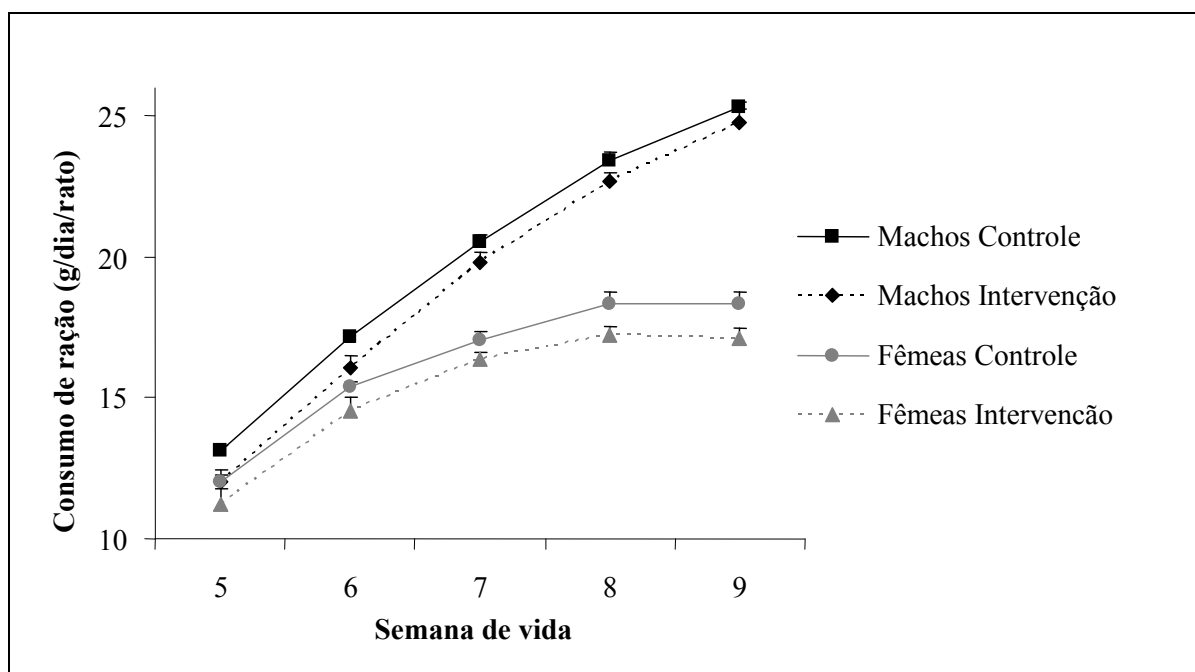


Figura 8 – Consumo de ração padrão, da 5ª a 9ª semana de vida, nos machos controle (n=7 caixas), machos intervenção (n=11 caixas), fêmeas controle (n=10 caixas) e fêmeas intervenção (n=11 caixas). Dados expressos em média \pm EP. ANOVA de medidas repetidas mostrou efeito do tempo ($p<0,0001$), efeito do sexo ($p<0,0001$) e efeito do grupo ($p=0,002$).

7.1.4 Testes comportamentais

7.1.4.1 Consumo de alimento palatável

A figura 9 mostra que os animais se habituaram ao alimento doce durante os cinco dias de habituação, pois foram aumentando o consumo do alimento novo com o passar dos dias, conforme analisado pela ANOVA de medidas repetidas que mostrou efeito do tempo [$F(1,4)=157,59, p<0,0001$] e nenhum outro efeito ou interação.

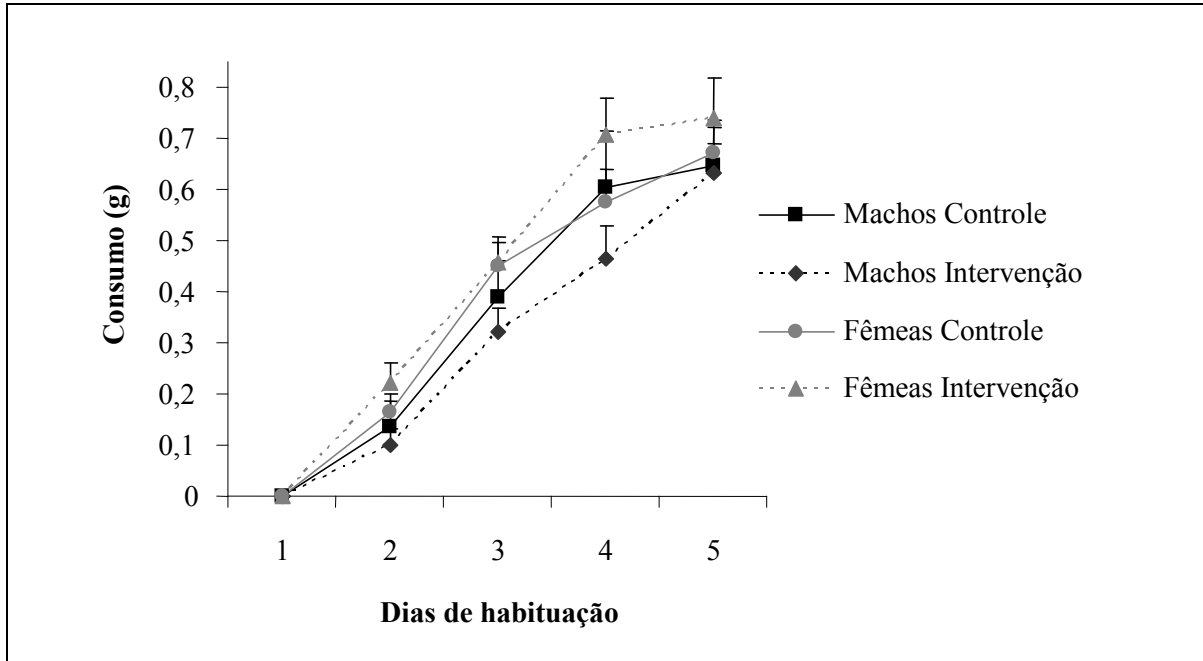


Figura 9 – Consumo de alimento doce nos dias de habituação nos machos controle (n=8), machos intervenção (n=19), fêmeas controle (n=19) e fêmeas intervenção (n=14). Dados expressos em média \pm EP. ANOVA de medidas repetidas mostrou efeito do tempo ($p < 0,0001$).

Na análise do consumo de alimento doce no dia do teste, através da ANOVA de duas vias, utilizando como fatores o sexo e o grupo, a interação entre grupo e sexo não chegou a atingir significância estatística [$F(1,56)=3,81$, $p=0,056$], apontando que as fêmeas do grupo intervenção tenderam a consumir mais alimento doce. Não houve, isoladamente, efeito do sexo [$F(1,56)=0,97$, $p=0,329$], nem efeito do grupo [$F(1,56)=0,81$, $p=0,373$] (Figura 10).

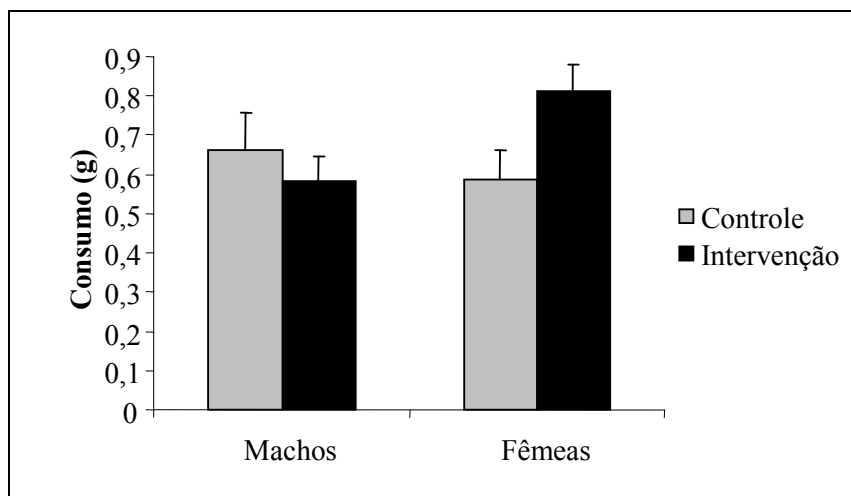


Figura 10 – Consumo de alimento doce no dia do teste nos machos controle (n=8), machos intervenção (n=19), fêmeas controle (n=19) e fêmeas intervenção (n=14). Dados expressos em média \pm EP. Na ANOVA de duas vias a interação entre grupo e sexo não chega a atingir significância estatística ($p=0,056$).

7.1.4.2 Hiperfagia de rebote

Ao analisar o consumo de ração padrão após jejum de 24h, através da ANOVA de duas vias, utilizando como fatores o sexo e o grupo, não houve efeito do grupo [$F(1,24)=1,88$, $p=0,182$], nem interação entre o grupo e o sexo [$F(1,24)=0,19$, $p=0,663$], porém observou-se efeito do sexo [$F(1,24)=130,93$, $p<0,0001$], mostrando que os machos consumiram mais ração após um jejum prolongado (Figura 11).

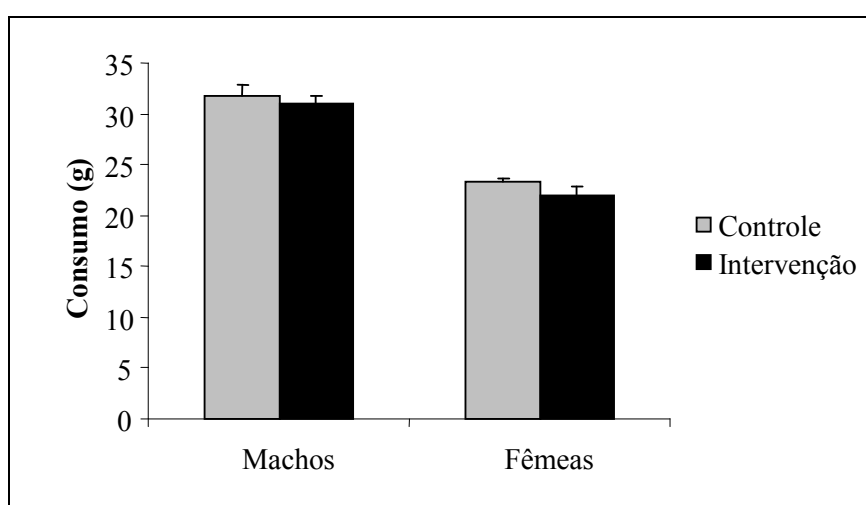


Figura 11 – Consumo de ração padrão em 24h, após jejum prolongado, nos machos controle (n=4 caixas), machos intervenção (n=9 caixas), fêmeas controle (n=8 caixas) e fêmeas intervenção (n=7 caixas). Dados expressos em média ± EP. ANOVA de duas vias mostrou efeito do sexo ($p<0,0001$).

7.1.4.3 Teste do campo aberto

Ao analisar as variáveis do teste do campo aberto, através da ANOVA de duas vias, utilizando como fatores o grupo e o sexo, observou-se apenas efeito do sexo no tempo de permanência nos quadrantes centrais [$F(1,55)=9,27$, $p=0,004$] e na frequência de respostas de orientação [$F(1,55)=7,30$, $p=0,009$], indicando que os machos permaneceram menos tempo no centro do aparato e também realizaram menos respostas de orientação (menos exploração). Não houve efeitos isolados, nem interação entre as variáveis no número de cruzamentos

totais, no entanto o efeito do sexo quase atingiu significância estatística [$F(1,55)=3,91$, $p=0,053$], sendo menor a média da frequência de cruzamentos nos machos, apesar da diferença não ser estatisticamente significativa. Analisando a frequência de *grooming*, através do teste do Qui-Quadrado, não foram observadas diferenças entre os grupos ($p=0,206$) (Tabela 2).

Tabela 2 – Variáveis analisadas no teste do campo, conforme sexo e grupo.

Variável	Machos		Fêmeas	
	Controle (n=8)	Intervenção (n=19)	Controle (n=18)	Intervenção (n=14)
tempC	22,9±19,25 ^a	24,3±13,96 ^a	34,3±20,04 ^b	41,9±16,30 ^b
tempP	277,1±19,25 ^a	275,7±13,95 ^a	265,8±20,03 ^b	258,1±16,31 ^b
freqCruz	132,75±38,07	139,4±30,17	146,4±28,84	158,1±24,38
freqRear	8,0±5,58 ^a	7,5±4,22 ^a	13,8±7,02 ^b	11,4±8,61 ^b
FezGroom*	4 (50%)	5 (26,3%)	4 (22,2%)	4 (21,4%)

ANOVA de duas vias; valores expressos em média ± DP; ^{a,b}letras diferentes demonstram diferença estatística significativa ($p<0,05$).

*Teste do Qui-Quadrado ($p>0,05$).

tempC: tempo de permanência nos quadrantes centrais (s); tempP: tempo de permanência na periferia (s); freqCruz: número total de cruzamentos; freqRear: número de *rearings*; FezGroom: realizaram *grooming* durante o teste.

7.1.4.4 Teste do labirinto em cruz elevado

A ANOVA de duas vias, utilizando como fatores o grupo e o sexo, mostrou interação entre o grupo e o sexo nas variáveis tempo de permanência nos braços abertos [$F(1,57)=5,75$, $p=0,020$], frequência de entrada nos braços abertos [$F(1,57)=4,02$, $p=0,050$] e tempo de permanência nos braços fechados [$F(1,57)=10,61$, $p=0,002$], revelando um maior comportamento do tipo ansioso nos machos do grupo intervenção que permaneceram menos tempo nos braços abertos. A análise da frequência de entrada nos braços fechados não demonstrou efeitos isolados, nem interação entre as variáveis. Observou-se efeito do grupo ao

avaliar a frequência de mergulhos [$F(1,57)=7,94$, $p=0,007$], mostrando que o grupo intervenção realizou menos mergulhos nos braços abertos (Tabela 3).

Tabela 3 – Variáveis analisadas no teste do labirinto em cruz elevado, conforme sexo e grupo.

Variável	Machos		Fêmeas	
	Controle (n=9)	Intervenção (n=19)	Controle (n=18)	Intervenção (n=15)
tempBA	116,1±39,08 ^a	74,5±30,93 ^b	89,5±41,73 ^a	92,4±26,59 ^a
tempBF	115,0±26,41 ^a	169,3±32,20 ^b	158,1±36,89 ^a	155,2±31,79 ^a
freqBA	6,2±2,68 ^a	4,6±2,14 ^b	5,5±2,17 ^a	6,5±2,53 ^a
freqBF	6,8±1,98	7,5±2,04	7,6±1,88	8,2±1,37
freqM	14,2±4,79 ^a	10,9±3,45 ^b	12,0±4,20 ^a	9,3±3,84 ^b

ANOVA de duas vias; valores expressos em média ± DP; ^{a,b}letras diferentes demonstram diferença estatística significativa ($p<0,05$).

tempBA: tempo de permanência no braço aberto (s); tempBF: tempo de permanência no braço fechado (s); freqBA: número de entradas no braço aberto; freqBF: número de entradas no braço fechado; freqM: frequência do comportamento de mergulhar

7.1.5 Análises bioquímicas

Ao analisar os níveis plasmáticos de colesterol total, HDL, LDL, triglicerídeos e glicose, através da ANOVA de duas vias, utilizando grupo e sexo como fatores e o tamanho da ninhada como co-variável, observou-se efeito do sexo no HDL [$F(1,24)=7,44$, $p=0,012$], sendo maiores os níveis de HDL nas fêmeas e, também, efeito do tamanho da ninhada no LDL [$F(1,24)=4,29$, $p=0,049$], no qual filhotes nascidos de ninhadas maiores apresentaram maiores níveis de LDL na vida adulta. No caso do colesterol total, o efeito do tamanho da ninhada não chegou a atingir significância estatística [$F(1,24)=3,90$, $p=0,060$], sendo maior a média do colesterol total nos animais provenientes de ninhadas maiores, apesar da diferença não ser estatisticamente significativa. Não houve outros efeitos ou interações no restante das variáveis. Os dados completos das análises bioquímicas estão apresentados na tabela 4.

Tabela 4 – Resultados das análises de colesterol total, HDL, LDL, triglicerídeos e glicose, conforme sexo e grupo.

Variável	Machos		Fêmeas	
	Controle (n=4)	Intervenção (n=9)	Controle (n=9)	Intervenção (n=7)
CT	52,7±2,06	50,8±6,61	56,8±8,65	57,7±11,99
HDL	19,2±0,50 ^a	18,0±1,73 ^a	21,9±3,78 ^b	22,3±3,72 ^b
LDL	15,1±2,45	17,4±9,80	22,4±5,24	17,6±9,85
TGs	91,7±11,84	77,0±30,14	62,2±11,68	89,3±21,94
Glicose	148,2±11,87	153,6±10,68	149,1±10,67	146,8±11,03

ANOVA de duas vias; usando como co-variável o tamanho da ninhada; valores expressos em média ± DP; ^{a,b}letras diferentes significam diferença estatística significativa ($p < 0,05$).
CT: colesterol total; TGs: triglicerídeos

7.1.6 Gordura abdominal

A análise da gordura abdominal como percentual do peso corporal, através da ANOVA de duas vias, utilizando grupo e sexo como fatores e o tamanho da ninhada como co-variável, mostrou efeito do tamanho da ninhada tanto na gordura retroperitoneal [$F(1,56)=4,47$, $p=0,039$], quanto na gordura gonadal [$F(1,56)=15,35$, $p < 0,001$] e, conseqüentemente, no total de gordura abdominal [$F(1,56)=12,13$, $p=0,001$], sendo menor o percentual de gordura abdominal nos animais provenientes de ninhadas maiores. Observou-se também efeito do sexo sobre a gordura retroperitoneal [$F(1,56)=22,47$, $p < 0,001$] e a gordura gonadal [$F(1,56)=5,18$, $p=0,027$], sendo maior o percentual de gordura retroperitoneal nos machos e o de gordura gonadal nas fêmeas. Não houve outros efeitos ou interações no percentual de gordura abdominal, conforme apresentado na tabela 5.

Tabela 5 – Percentual de gordura abdominal, conforme sexo e grupo.

% gordura	Machos		Fêmeas	
	Controle (n=9)	Intervenção (n=19)	Controle (n=18)	Intervenção (n=15)
RetroP	1,03±0,33 ^a	0,89±0,26 ^a	0,67±0,19 ^b	0,63±0,22 ^b
Gonadal	1,16±0,43 ^a	1,00±0,20 ^a	1,24±0,41 ^b	1,27±0,44 ^b
Abd. Total	2,19±0,74	1,89±0,41	1,91±0,54	1,90±0,64

ANOVA de duas vias; usando como co-variável o tamanho da ninhada; valores expressos em média ± DP; ^{a,b}letras diferentes significam diferença estatística significativa ($p < 0,05$). RetroP: retroperitoneal; Abd. Total: abdominal total.

7.1.7 Fator neurotrófico derivado do encéfalo (BDNF)

Ao avaliar os níveis de BDNF plasmáticos, através da ANOVA de duas vias, utilizando como fatores o sexo e o grupo, observou-se efeito do grupo [$F(1,22)=4,79$, $p=0,040$], estando a intervenção associada a um maior nível de BDNF no plasma. Não houve efeito do sexo, nem interação entre as variáveis (Figura 12).

Pretendendo investigar a associação entre o contato de baixa qualidade (contato puro) e o BDNF periférico, foi encontrada uma correlação positiva entre o contato puro e os níveis plasmáticos de BDNF ($r=0,512$; $p=0,008$), mostrando que quanto maior o contato puro no período neonatal, maiores os níveis de BDNF plasmáticos na vida adulta (Figura 13).

Ao analisar a quantidade de BDNF nas estruturas cerebrais, encontrou-se efeito do sexo no hipocampo [$F(1,15)=9,52$, $p=0,008$] e substância cinzenta periaquedutal [$F(1,21)=22,5$, $p < 0,001$], sendo os níveis de BDNF maiores, nessas estruturas, nos machos. Não houve outros efeitos ou interações entre as variáveis conforme apresentado na tabela 6.

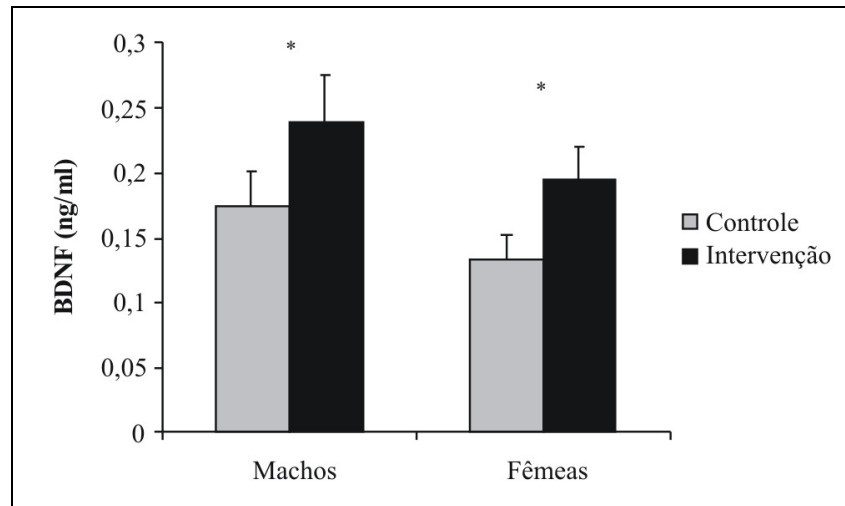


Figura 12 – Níveis plasmáticos de BDNF nos machos controle (n=6), machos intervenção (n=7), fêmeas controle (n=7) e fêmeas intervenção (n=6). Dados expressos em média \pm EP. ANOVA de duas vias mostrou efeito do grupo ($p=0,040$).

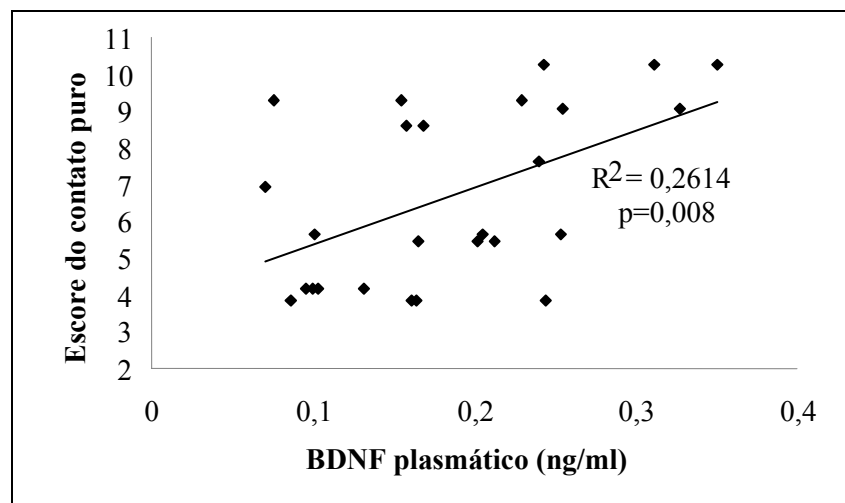


Figura 13 – Correlação entre os níveis de BDNF plasmático e o escore do contato puro (n=26).

Tabela 6 – Quantidade de BDNF (ng/mg de proteína) no hipocampo (n=4-6), amígdala (n=5-7) e substância cinzenta periaquedutal (n=5-7), conforme sexo e grupo.

Estruturas	Machos		Fêmeas	
	Controle	Intervenção	Controle	Intervenção
HC	1,11 \pm 0,78 ^a	1,00 \pm 0,55 ^a	0,38 \pm 0,06 ^b	0,41 \pm 0,13 ^b
AMG	0,30 \pm 0,18	0,33 \pm 0,21	0,26 \pm 0,08	0,27 \pm 0,04
PAG	2,06 \pm 1,04 ^a	2,40 \pm 1,45 ^a	0,65 \pm 0,27 ^b	0,54 \pm 0,12 ^b

ANOVA de duas vias; valores expressos em média \pm DP; ^{a,b}letras diferentes significam diferença estatística significativa ($p<0,05$).

C: hipocampo, AMG: amígdala, PAG: substância cinzenta periaquedutal.

7.1.8 Óxido Nítrico (NO)

A análise da quantidade de óxido nítrico no hipocampo, através da ANOVA de duas vias, utilizando como fatores o sexo e o grupo, mostrou não haver efeito do grupo [$F(1,21)=0,0001$, $p=0,992$], nem efeito do sexo [$F(1,21)=0,89$, $p=0,335$]. Também não foi observada interação entre as variáveis [$F(1,21)=0,07$, $p=0,787$] (Figura 14).

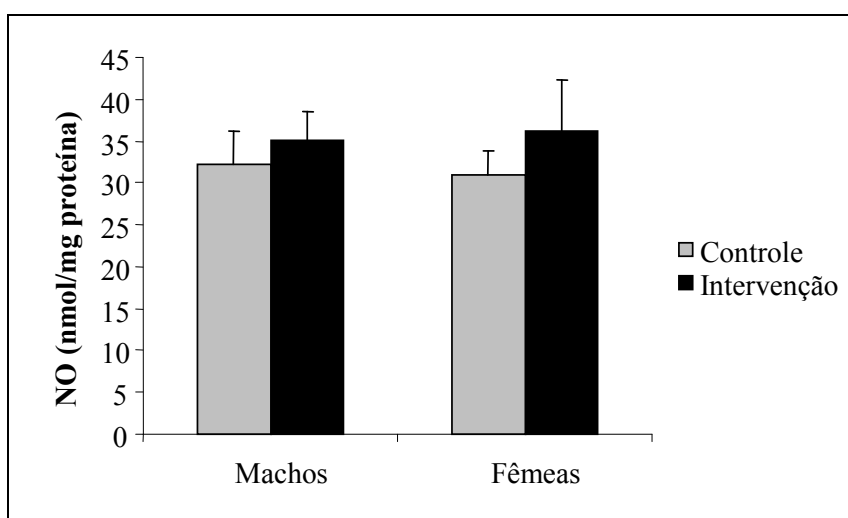


Figura 14 – Quantidade de NO no hipocampo nos machos controle (n=5), machos intervenção (n=6), fêmeas controle (n=8) e fêmeas intervenção (n=6). Dados expressos em média \pm EP. ANOVA de duas vias não mostrou efeitos, nem interação.

7.1.9 Curva de corticosterona em resposta ao estresse por restrição de movimento

Ao avaliar a curva de corticosterona em resposta ao estresse por restrição de movimento, através da ANOVA de medidas repetidas, utilizando como fatores o sexo e o grupo, observou-se efeito do tempo [$F(1,4)=48,57$, $p<0,001$], mostrando que os níveis de corticosterona variaram ao longo do tempo, e também efeito do sexo [$F(1,25)=9,81$, $p=0,004$], sendo os níveis de corticosterona mais altos nas fêmeas. A interação entre o tempo e o sexo não chegou a atingir significância estatística [$F(1,4)=2,24$, $p=0,069$]. No entanto, encontrou-se uma interação entre o tempo, o sexo e o grupo [$F(1,4)=3,15$, $p=0,017$], mostrando que os

machos do grupo intervenção apresentaram uma variação diferenciada nos níveis de corticosterona ao longo do tempo, levando mais tempo para atingir o pico de corticosterona (Figura 15).

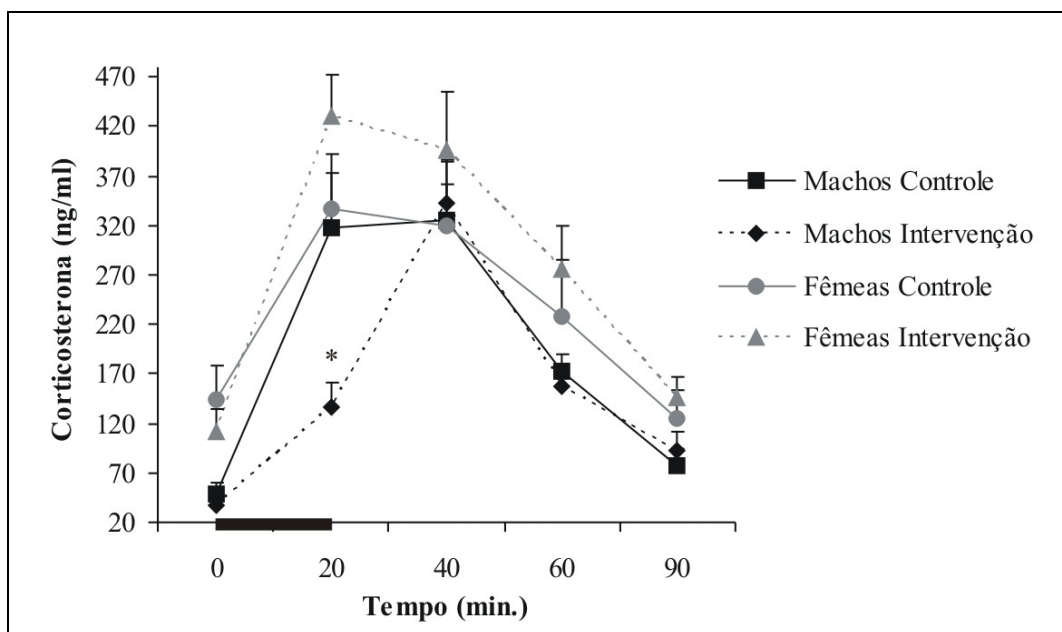


Figura 15 – Curva de corticosterona em resposta ao estresse por restrição de movimento nos machos controle (n=6), machos intervenção (n=7), fêmeas controle (n=8) e fêmeas intervenção (n=8). A barra preta representa o período de exposição ao estresse por restrição de movimento. Dados expressos em média \pm EP. ANOVA de medidas repetidas mostrou efeito do tempo ($p<0,001$), efeito do sexo ($p=0,004$) e interação tempo*sexo*grupo ($p=0,017$).

7.2 ESTUDO CLÍNICO

A amostra foi composta por 89 meninas e 40 meninos, mas não houve diferença na média do escore do SCARED entre os sexos (média \pm SD – meninos: 32,49 \pm 11,00 e meninas: 33,27 \pm 12,12, $p=0,732$). Outras características da amostra estão apresentadas na tabela 7. Observaram-se correlações negativas entre o cuidado materno “caloroso” (*maternal warmth*), descrito no PBI, e os escores do SCARED para ansiedade de separação ($r=-0,222$; $p=0,012$), fobia social ($r=-0,200$; $p=0,023$) e fobia escolar ($r=-0,221$; $p=0,012$), mostrando que quanto menor o cuidado materno, reportado no PBI, maior foi o relato de alguns sintomas ansiosos avaliados pelo SCARED. Não houve correlações entre o cuidado materno (*maternal warmth*)

e a ansiedade generalizada ($p=0,479$) ou sintomas de pânico ($p=0,575$). Além disso, não foram encontradas outras correlações entre as medidas de cuidado materno do PBI (superproteção e autoritarismo) e os sintomas ansiosos avaliados pelo SCARED (dados não mostrados).

Tabela 7 – Características da amostra do estudo clínico (n=129).

Variáveis	Sexo		valor <i>p</i>
	Masculino (n=40)	Feminino (n=89)	
Idade (anos) ^a	12,77±2,24	13,62±2,46	0,064
Pós-púberes	14 (35,0%)	40 (44,9%)	0,194
Menarca (sim)	-	57 (64,0%)	-
Ansiosos ^b	17 (42,5%)	44 (49,4%)	0,295
Portadores do alelo Met ^c	13 (32,5%)	31 (34,8%)	0,572

Qui-Quadrado; * $p<0,05$

^aValores expressos em média ± DP – Teste T de Student

^bPonto de corte da curva ROC da escala SCARED

^cPolimorfismo Val66Met do BDNF

Dividindo a análise estatística pela presença ou não do polimorfismo Val66Met do BDNF, encontrou-se uma correlação positiva entre o escore de superproteção materna do PBI, que sugere menor qualidade de interação mãe-filho (PARKER e LIPSCOMBE, 1981), e os níveis séricos de BDNF ($r=0,417$, $p=0,022$), apenas nos indivíduos com presença do alelo Met (Val/Met e Met/Met). Esta associação não foi observada entre os indivíduos não portadores do alelo Met ($r=0,039$, $p=0,765$) (Figura 16).

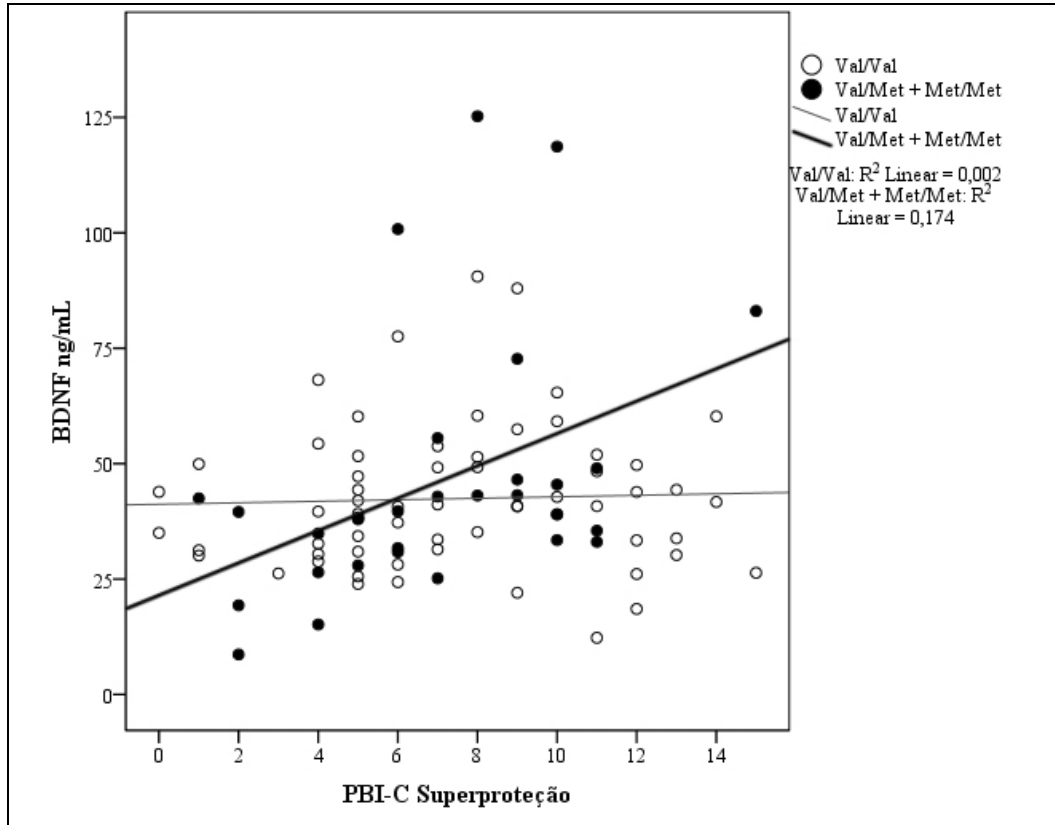


Figura 16 – Correlações entre o escore de superproteção do PBI e os níveis séricos de BDNF nos indivíduos portadores (n=30) e não portadores do alelo Met (n=62).

8 DISCUSSÃO

Neste trabalho observou-se que a intervenção neonatal realizada, que consistiu na redução do material disponível para a confecção do ninho do dia 2 ao dia 9 de vida dos filhotes, impossibilitando sua construção adequada, conseguiu impactar de forma significativa no cuidado materno. Essa alteração na interação entre mãe e filhote associou-se com o desenvolvimento de comportamentos do tipo ansioso na vida adulta, sendo o BDNF periférico um possível marcador dessa associação. Também, neste estudo, foram encontradas associações similares em humanos.

Em relação ao cuidado materno, observou-se que o grupo com restrição do material para a confecção do ninho (grupo intervenção), apresentou uma menor variabilidade no escore do LG (comportamento maternal em que a genitora lambe seus filhotes) que faz parte de um conjunto de comportamentos que reflete atenção para com a prole. Variações naturais do LG se correlacionam com a reatividade dos filhotes ao estresse na vida adulta, sendo que filhotes de mães altamente cuidadoras (maior LG) serão menos responsivos (semelhantemente a animais manipulados no período neonatal), comparados a filhotes de mães pouco cuidadoras (menor LG) (LIU *et al.*, 1997). Essa menor resposta ao estresse se deve a alterações epigenéticas que causam uma maior expressão de receptores glicocorticóides no hipocampo e, portanto, um mecanismo de retroalimentação negativa mais eficiente (LIU *et al.*, 1997; MEANEY *et al.*, 2000; WEAVER *et al.*, 2007). Um estudo que também utilizou a redução do material do ninho como intervenção neonatal relata uma menor duração do LG no grupo com material restrito para a confecção do ninho, porém somente nas observações realizadas no ciclo escuro (IVY *et al.*, 2008). Neste trabalho, o grupo com material disponível para a confecção do ninho (grupo controle) apresentou uma variabilidade normal no escore do LG, reproduzindo achados de que o LG numa população de ratos apresenta grande variabilidade e

distribuiu-se de forma normal (CHAMPAGNE *et al.*, 2003). Ao contrário, as genitoras do grupo intervenção não demonstraram a variabilidade encontrada normalmente em uma população de ratos (Figura 6). Portanto, apesar deste estudo não encontrar uma diminuição do LG conforme relatado por Ivy *et al.* (2008), a diminuição da variabilidade do escore permite inferir que a intervenção teve impacto sobre o LG.

Ainda sobre o cuidado materno, também foi observado que as genitoras do grupo intervenção ficaram um maior percentual do tempo amamentando seus filhotes, no entanto a amamentação nas posições 1 e 2 foi maior nesse grupo, posições consideradas menos eficientes que as posições 3 e 4. Geralmente, a genitora inicia um período de amamentação com o dorso mais arqueado (*kyphotic nursing*) e o sugar dos filhotes induz a um estado de mudança até o dorso ficar pouco arqueado (posição prona) (STERN, 1997; STERN *et al.*, 2002). Enquanto a posição *kyphotic* contribui para uma melhor ejeção de leite e um ótimo crescimento da ninhada, a posição prona é menos eficiente (LONSTEIN *et al.*, 1998). Tanto o LG, quanto a amamentação em dorso arqueado são comportamentos maternos implicados em aspectos da regulação do desenvolvimento do rato, dentre eles o funcionamento do eixo HPA e do sistema cardiovascular (MYERS *et al.*, 1989; LEVINE, 1994). Neste trabalho, a intervenção esteve relacionada com alterações persistentes no funcionamento do eixo HPA em machos (conforme discutido a seguir), mas não com alterações em alguns marcadores de risco cardiovascular avaliados como LDL, colesterol total e triglicerídeos.

Considerando que as genitoras do grupo intervenção permaneceram mais tempo no ninho, houve maior contato com os filhotes (ato que inclui amamentar, LG ou somente estar sobre os filhotes), porém o contato puro, ou seja, sem amamentar e sem LG, também foi maior nesse grupo. Logo, a intervenção levou a um maior percentual de tempo em contato de baixa qualidade (contato sem cuidado em si). Possíveis explicações para esse achado incluem uma dificuldade em manter a temperatura do ninho, pois o material disponível era escasso,

e/ou a maior vocalização dos filhotes, atraindo a genitora para o ninho em virtude da demanda através das vocalizações. A literatura mostra que a temperatura da pele dos filhotes deve estar próxima a 34°C (temperatura do ninho) para que a genitora exiba comportamentos maternos (STERN e JOHNSON, 1990). Além disso, filhotes isolados a uma temperatura menor que 25°C aumentam as vocalizações ultrasônicas (SOKOLOFF e BLUMBERG, 1997), demonstrando que essas duas variáveis podem estar envolvidas em um maior contato sem cuidado. De qualquer forma, independente do mecanismo, viu-se que a intervenção deste estudo foi capaz de alterar o cuidado materno em diversos de seus aspectos, modificando a forma de interação entre mãe e filhote, assim como induzir uma série de alterações comportamentais e bioquímicas na prole conforme discutido abaixo.

Com relação aos desfechos metabólicos, foi encontrado um peso maior nos machos em comparação às fêmeas, assim como um maior consumo de ração padrão, confirmando que a intervenção não teve o poder de alterar achados naturalmente esperados. O tamanho da ninhada mostrou afetar o peso corporal e também o consumo de ração padrão, pois os animais provenientes de ninhadas maiores consumiram menos ração e também ganharam menos peso ao longo do tempo. Outros estudos comprovaram que a elevação do número de filhotes causa um menor consumo alimentar ao longo da vida, levando-os a pesar menos quando adultos (PATTERSON *et al.*, 2010), por outro lado a redução do número de filhotes da ninhada provoca aumento do consumo de alimento e conseqüente obesidade (KENNEDY, 1957; PLAGEMANN *et al.*, 2010).

De forma interessante, observou-se que a intervenção esteve associada com um menor consumo de ração padrão. Ao analisar os dados de ganho de peso entre os grupos percebeu-se que os animais do grupo intervenção apresentaram menores valores de peso quando comparados aos animais do grupo controle, porém essa diferença não atingiu significância estatística, apontando para uma provável relação entre o ganho e peso e o consumo de ração,

não havendo provavelmente diferença na eficiência calórica ou gasto energético entre os grupos. Ao contrário, outros estudos que realizaram intervenções neonatais, como a manipulação neonatal (SILVEIRA *et al.*, 2004) e a separação materna (IWASAKI *et al.*, 2000), não relatam alteração no consumo de ração padrão ao longo da vida dos animais. Ao avaliar o poder da intervenção sobre o consumo de ração padrão após um jejum de 24h (hiperfagia de rebote) não foi observada diferença entre os grupos, apenas diferença entre os sexos, sendo que os machos consumiram mais ração após jejum prolongado, conforme esperado. Segundo Iwasaki *et al.* (2000), a experiência da separação materna tem efeito sobre a hiperfagia de rebote apenas em fêmeas, que consomem mais ração quando disponibilizada *ad libitum* após um período de restrição de alimento programada (6 dias de alimentação com duração de 2h). Apesar de neste estudo não ter sido encontrada diferença no teste de hiperfagia de rebote, observou-se que as fêmeas do grupo intervenção tenderam a consumir mais alimento doce em um teste de exposição aguda, parecendo haver uma preferência por alimento palatável nas fêmeas desse grupo. A literatura descreve um aumento do consumo de alimento palatável, quando oferecido por um curto período de tempo, tanto em machos quanto em fêmeas manipulados no início da vida (SILVEIRA *et al.*, 2004; da S BENETTI *et al.*, 2007). Outro estudo que comparou o consumo de alimento palatável entre animais manipulados, separados e controles mostra um maior consumo de “*snack*” nos manipulados, de ambos os sexos, e nas fêmeas separadas, quando comparados aos controles (McINTOSH *et al.*, 1999), mostrando que a separação materna também leva a uma resposta diferente entre os sexos no consumo de alimento palatável. Não foram encontradas descrições de comportamento alimentar de animais submetidos ao modelo de restrição de material para a confecção do ninho, sendo assim, esse tipo de intervenção, que altera o cuidado materno de forma particular, leva a um conjunto de desfechos de consumo alimentar diferente de outras

intervenções neonatais descritas na literatura e sugere haver uma resposta sexo específica no consumo de alimento palatável.

Corroborando com os resultados do peso corporal, não foi encontrada diferença entre os grupos em se tratando do percentual de gordura abdominal. No entanto, o tamanho da ninhada teve efeito na adiposidade abdominal, sendo menor o percentual de gordura nos animais provenientes de ninhadas maiores, de acordo com os achados de Patterson *et al.* (2010), que mostram ser a maior sensibilidade à leptina o provável mecanismo envolvido. Ao analisar a gordura abdominal dividindo-a nas suas maiores porções, gonadal e retroperitoneal, encontrou-se apenas efeito do sexo, sendo maior o percentual de gordura gonadal nas fêmeas e de gordura retroperitoneal nos machos, semelhante ao descrito em homens e mulheres pré-menopausa que diferem na distribuição de gordura corporal, denominadas gordura andróide e ginecóide, respectivamente (LOVEJOY e SAINSBURY, 2009).

Os resultados das análises bioquímicas mostraram que os animais provenientes de ninhadas maiores apresentaram níveis mais elevados de LDL, tendendo também a maiores níveis de colesterol total, mesmo apresentando um peso e um percentual de gordura abdominal menores. Esse achado concorda com a hipótese de Barker *et al.* (1989), em que condições adversas intra-uterinas e durante a infância (como a restrição de crescimento) aumentam o risco de doenças cardiovasculares na vida adulta. Essa hipótese foi testada em vários outros estudos, sendo que um deles comprovou a existência de associação entre o baixo peso ao nascer e maiores níveis de colesterol total na vida adulta (DAVIES *et al.*, 2004). No entanto, a intervenção no material disponível para a construção do ninho não esteve associada com alterações no perfil lipídico e glicemia. Observou-se apenas um efeito do sexo no HDL, sendo maior nas fêmeas em comparação aos machos, de acordo com dados já descritos na literatura (NEVALA *et al.*, 2000).

Uma importante contribuição do presente trabalho foi o resultado da avaliação do comportamento do tipo ansioso na vida adulta, utilizando o teste clássico do labirinto em cruz elevado. Observou-se que os machos do grupo intervenção permaneceram menos tempo e fizeram menos entradas nos braços abertos, demonstrando um maior comportamento do tipo ansioso. Além disso, tanto os machos quanto as fêmeas do grupo intervenção realizaram menos mergulhos nos braços abertos, indicando uma menor exploração do ambiente, ligada a um maior comportamento do tipo ansioso. Utilizaram-se também outras medidas de ansiedade, mensuradas através do teste do campo aberto. No entanto, não foi encontrada diferença entre os grupos, apenas um efeito do sexo no qual os machos permaneceram mais tempo na periferia e apresentaram menos respostas de orientação quando comparados às fêmeas. Segundo Martínez-Pereda *et al.* (1989), machos apresentam uma maior reatividade emocional do que fêmeas quando testados no campo aberto. Portanto, os resultados obtidos nos testes clássicos para avaliar ansiedade na vida adulta indicam que o estresse realizado no período neonatal, que afetou o cuidado materno, conseguiu levar a um maior comportamento do tipo ansioso na vida adulta. É interessante notar que a intervenção neonatal realizada neste estudo foi aplicada no período hiporresponsivo ao estresse, que tem duração até o fim da segunda semana de vida do rato (GUILLET e MICHAELSON, 1978; SAPOLSKY e MEANEY, 1986). Neste período, caracteristicamente, há uma exacerbação do mecanismo de retroalimentação negativa dos glicocorticóides na hipófise e diminuição da sensibilidade da adrenal ao ACTH (YOSHIMURA *et al.*, 2003). Sugere-se que a submissão a um estímulo ou estressor nesses primeiros dias determina alterações neuroquímicas e comportamentais observáveis durante toda a vida. Logo, a exposição à intervenção neste momento do desenvolvimento pode ter causado alterações permanentes em estruturas implicadas na resposta ao estresse, levando a um amadurecimento precoce das mesmas, e desta forma

programando de forma persistente o funcionamento do eixo HPA em resposta ao estresse (MORICEAU *et al.*, 2009).

Também observou-se que o tipo de intervenção realizada impactou em machos e fêmeas de forma diferente, pois mesmo levando a um maior comportamento ansioso em ambos os sexos, o perfil comportamental de expressão de ansiedade, avaliado pelo teste do labirinto em cruz elevado, foi diferenciado, o que concorda com as diferenças observadas em homens e mulheres com relação à prevalência, comorbidades e curso dos transtornos de ansiedade (VESGA-LOPEZ *et al.*, 2008; MCLEAN *et al.*, 2011). Por outro lado, estudos em roedores que realizaram a mesma intervenção neonatal e que fizeram seguimento apenas dos machos, não encontraram resultados comportamentais indicando maior ansiedade na vida adulta daqueles submetidos ao estresse neonatal, utilizando o teste do campo aberto (RICE *et al.*, 2008) ou o labirinto em cruz elevado (BRUNSON *et al.*, 2005). Provavelmente variações de espécie ou linhagem de roedores, assim como condições de cuidados no ratário podem estar envolvidas nestas divergências.

Destaca-se que, no modelo animal proposto neste trabalho, a intervenção neonatal impactou sobre o cuidado materno e esteve associada ao desenvolvimento de ansiedade na vida adulta, e achados similares foram descritos no estudo clínico. Observou-se, nos humanos, que quanto menor o cuidado materno, reportado no PBI, maior foi o relato de alguns sintomas ansiosos avaliados pelo SCARED, achado similar ao originalmente descrito por Parker (1979) e outros (ENNS *et al.*, 2002). Um estudo recente que utilizou o PBI também mostra que, enquanto os grupos de baixo e alto cuidado materno apresentam respostas igualmente reduzidas ao estresse agudo, há maiores escores nas avaliações para depressão e ansiedade no grupo de baixo cuidado materno (ENGERT *et al.*, 2010).

Buscando possíveis mecanismos envolvidos com o maior comportamento do tipo ansioso encontrado no presente trabalho, investigou-se o papel da nNOS no hipocampo dos

animais através da mensuração de um de seus metabólitos, o NO, porém não foram encontradas diferenças entre os grupos na quantidade de NO no hipocampo. Ao contrário, a literatura mostra que a inibição da nNOS tem efeito ansiolítico em camundongos machos alojados em grupos (POKK e VALI, 2002; WORKMAN *et al.*, 2008), e também que camundongos *knock-out* para nNOS apresentam uma latência menor para se alimentar em um teste de novidade alimentar, sugerindo um fenótipo menos ansioso (ZHANG *et al.*, 2010). Porém esses estudos que mostram associação da nNOS com o comportamento do tipo ansioso não testam esse mecanismo em modelos de intervenções neonatais. Sendo assim, os resultados encontrados indicam que a nNOS não parece ser um mecanismo em potencial envolvido no comportamento do tipo ansioso observado em animais submetidos a um ambiente neonatal hostil que afeta o cuidado materno.

Da mesma forma, avaliou-se a curva de corticosterona em resposta ao estresse por restrição de movimento para elucidar o possível envolvimento do eixo HPA no desenvolvimento de ansiedade. Um achado interessante foi a diferença encontrada na resposta dos machos do grupo intervenção, que levaram mais tempo para atingir o pico de corticosterona. Essa resposta diferenciada reflete o dimorfismo sexual observado no teste do labirinto em cruz elevado, sugerindo que a resposta ao estresse pode estar envolvida no desenvolvimento da ansiedade na vida adulta neste modelo. Também foi observado um nível maior de corticosterona nas fêmeas quando comparadas aos machos em geral, ressaltando a existência de diferença entre os sexos com relação às respostas do organismo frente a um estímulo estressor, como já relatado na literatura (KITAY, 1961; SEALE *et al.*, 2004; BUTKEVICH *et al.*, 2009).

Outras intervenções neonatais também geram alterações no funcionamento do eixo HPA associadas a alterações comportamentais, sendo que as respostas variam conforme a intervenção realizada. A manipulação neonatal associa-se a uma maior habilidade em lidar

com estímulos estressores, menor medo e resposta atenuada do eixo HPA (NEWPORT *et al.*, 2002; CIRULLI *et al.*, 2003; PRYCE e FELDON, 2003), ao contrário a separação materna está associada com aumento de comportamentos relacionados à ansiedade e maior resposta ao estresse na vida adulta (PLOTSKY *et al.*, 2005; MACRI, 2008). Como nestas intervenções (incluindo a realizada no presente trabalho) há concomitância entre a alteração do eixo HPA e o desenvolvimento de comportamentos relacionados à ansiedade na vida adulta, acredita-se que a programação do funcionamento do eixo pela exposição a um trauma em um período vulnerável possa ser um potencial mecanismo que explique a associação entre o estresse neonatal e o desenvolvimento de ansiedade.

Considerando que os machos do grupo intervenção demoraram mais para atingir o pico de corticosterona em resposta ao estresse, é possível que a intervenção afete sistemas de recepção dos sinais ambientais que disparam a resposta ao estresse, como regiões corticais. Por exemplo, Roth *et al.* (2009) encontrou alterações epigenéticas persistentes que afetam a expressão gênica de BDNF no córtex pré-frontal de animais submetidos ao mesmo estresse neonatal realizado neste trabalho. Outra potencial explicação para essa elevação mais lenta de corticosterona seria a secreção diferenciada de ACTH ou variações na sensibilidade da glândula adrenal a este hormônio.

Cabe destacar que o tipo de estresse realizado nos animais, além de estimular a secreção de corticosterona, indicando ativação do eixo HPA, causa a liberação de noradrenalina durante o período da imobilização, mostrando que esse neurotransmissor também tem papel na resposta ao estresse, conforme revisado por Morilak *et al.* (2005). Inclusive, a falta de regulação no sistema noradrenérgico tem sido implicada no desenvolvimento de alguns transtornos de ansiedade (SOUTHWICK *et al.*, 1993; SULLIVAN *et al.*, 1999). Então, a liberação da noradrenalina também pode estar envolvida na divergência encontrada entre o fenótipo ansioso dos machos e das fêmeas. Futuros estudos

avaliando a sensibilidade aos glicocorticóides a nível celular, a sensibilidade adrenal ao ACTH, assim como a liberação de noradrenalina podem auxiliar para uma melhor compreensão do papel da resposta ao estresse no desenvolvimento de comportamentos do tipo ansioso na vida adulta neste modelo.

A investigação do possível envolvimento do BDNF no desenvolvimento de ansiedade na vida adulta acarretou um achado que merece atenção, pois se viu que a intervenção esteve associada a maiores níveis de BDNF periférico. A literatura relata que, em humanos, algumas psicopatologias associam-se com um menor nível periférico de BDNF (KAREGE *et al.*, 2002, TOYOOKA *et al.*, 2002, KIM *et al.*, 2007), assim como adultos que sofreram algum tipo de trauma precoce apresentam redução nos níveis séricos dessa neurotrofina (GRASSI-OLIVEIRA *et al.*, 2008a). Por outro lado, estudos recentes encontraram níveis séricos aumentados de BDNF em pacientes que passaram por algum evento traumático (HAUCK *et al.*, 2010) e em adolescentes pré-púberes que sofreram negligência física (SALUM *et al.*, 2011b). Estas divergências indicam que tanto o momento do trauma, quanto a idade podem interferir no nível periférico de BDNF. O fato de neste trabalho ter-se encontrado níveis aumentados de BDNF periférico nos animais que passaram pelo estresse neonatal, sugere que o BDNF está envolvido em uma resposta adaptativa do organismo, e que a sua elevação faz parte de uma estratégia para proteção contra os efeitos deletérios do estresse. Alguns autores (GRASSI-OLIVEIRA *et al.*, 2008b) argumentam que o abuso e negligência na infância podem resultar em uma cascata de efeitos neurobiológicos associados à resposta alostática, ou seja, resposta adaptativa utilizada para manter a estabilidade do organismo frente a um processo ativo (McEWEN, 2002).

Como discutido anteriormente, a intervenção neonatal realizada, mediada pelo cuidado materno, associou-se ao desenvolvimento de ansiedade e achados similares foram encontrados nos humanos. De maneira interessante, também foram observadas associações

similares entre o cuidado materno e os níveis de BDNF no modelo animal e no estudo clínico, refletindo o conceito de carga alostática. No modelo animal, quanto maior o contato puro (contato de baixa qualidade) entre a genitora e seus filhotes no período neonatal, maiores os níveis de BDNF plasmáticos na vida adulta. Este maior período de contato puro, observado no grupo intervenção, pode ser interpretado como um comportamento materno relacionado ao controle das necessidades do ninho, por exemplo, manter a temperatura (conforme discutido nos primeiros parágrafos), ao invés de um comportamento realmente de cuidado para com os filhotes. No estudo clínico, o escore de superproteção materna do PBI, que sugere menor qualidade de interação mãe-filho (PARKER e LIPSCOMBE, 1981), se correlacionou positivamente com os níveis séricos de BDNF nos indivíduos portadores do alelo Met. Então, um cuidado materno controlador parece estar associado com o desenvolvimento de ansiedade e um aumento periférico de BDNF na vida adulta. Similar ao descrito neste trabalho, um estudo recente mostra que um baixo escore de cuidado materno avaliado pelo PBI se correlaciona com aumento de evitação de dano e diminuição de auto-direcionamento em adultos saudáveis, e para ambos os traços de personalidade o coeficiente de correlação é maior nos indivíduos com genótipo Met/Met, sugerindo que o polimorfismo Val66Met do BDNF modula os efeitos do cuidado parental nestes traços de personalidade (SUZUKI *et al.*, 2011). Outros mostram que indivíduos portadores do alelo Met do BDNF que foram expostos ao estresse no início da vida apresentam neuroticismo elevado e maior ansiedade, assim como menor volume do hipocampo e da amígdala (GATT *et al.*, 2009). Portanto, como reportado no presente trabalho, o efeito da superproteção materna sobre os níveis periféricos de BDNF foi evidente apenas nos portadores do alelo Met, estando de acordo com a literatura que sugere uma maior vulnerabilidade às influências ambientais nos portadores deste alelo do polimorfismo Val66Met (COLZATO *et al.*, 2011). Da mesma forma, em roedores, foi demonstrado que uma mutação nula no gene do BDNF modera os efeitos do cuidado materno

sobre o comportamento do tipo ansioso (CAROLA *et al.*, 2010), enfatizando o papel desta neurotrofina no desenvolvimento de ansiedade na vida adulta.

Ainda em relação ao BDNF, no modelo animal, foi encontrada uma maior quantidade de BDNF no hipocampo, amígdala e substância cinzenta periaquedutal dos machos, comparados às fêmeas, mostrando haver dimorfismo sexual, conforme descrito na literatura (BLAND *et al.*, 2005). No entanto, não se encontrou relação entre a intervenção e níveis alterados de BDNF nessas mesmas estruturas cerebrais. Estudos com roedores mostram alterações cerebrais dessa neurotrofina relacionadas ao comportamento do tipo ansioso. Alguns descrevem uma associação positiva entre os níveis de BDNF e o comportamento do tipo ansioso (GOVINDARAJAN *et al.*, 2006; YEE *et al.*, 2007), enquanto outro mostra que a depleção pós-natal exclusivamente central de BDNF está associada com maior ansiedade na vida adulta (RIOS *et al.* 2001). Além disso, também está documentada a ocorrência de metilação do gene do BDNF, com diminuição da sua expressão no córtex pré-frontal, em um modelo animal de maus-tratos infantis (ROTH *et al.* 2009). Apesar de a literatura mostrar variações nos níveis de BDNF centrais associadas à ansiedade e ao trauma precoce, neste estudo isso não foi observado. No entanto, os achados deste trabalho não excluem a possibilidade de um funcionamento alterado da via através da modulação da quantidade/atividade dos receptores de tropomiosina quinase B (TrkB). Futuros estudos que investiguem funcionalmente a via do BDNF podem elucidar melhor essa questão neste modelo.

De qualquer forma, ambas as abordagens experimental e clínica, evidenciaram que um trauma no início da vida, capaz de alterar o cuidado materno, esteve associado a maiores níveis periféricos de BDNF. Isto pode ser uma resposta adaptativa associada à exposição a um estressor agudo em um período da vida de maior vulnerabilidade (GRASSI-OLIVEIRA *et al.*, 2008b; HAUCK *et al.*, 2010; BÜCKER *et al.*, 2010), alterando de forma persistente a

produção de BDNF. É possível que, com o passar dos anos e/ou com a exposição a outras situações de estresse ou doença, estes indivíduos apresentem mais facilmente um esgotamento de recursos ou uma menor capacidade biológica de resposta aos insultos. Assim, faria sentido o que classicamente está relatado na literatura em relação aos menores níveis periféricos de BDNF observados em diferentes psicopatologias como depressão maior (GRASSI-OLIVEIRA *et al.*, 2008a) e transtorno bipolar (KAUER-SANT'ANNA *et al.*, 2007), quando associadas ao trauma no início da vida.

O presente trabalho conseguiu mostrar associações similares entre o estudo experimental e clínico, promovendo uma interessante abordagem translacional do assunto proposto. Este é considerado um dos pontos fortes do estudo, assim como a consistência do modelo animal (as diferentes coortes realizadas foram estatisticamente comparáveis nos diversos componentes do comportamento materno). Também, teve-se o cuidado de considerar o ciclo estral das fêmeas antes da realização do teste do labirinto em cruz elevado, visto que está documentado na literatura que alterações hormonais podem interferir no comportamento do tipo ansioso (MARCONDES *et al.*, 2001). Apesar disso, este estudo também tem algumas limitações. Por exemplo, as correlações observadas entre o cuidado materno e os sintomas ansiosos nos humanos foram significativas, porém modestas. Mesmo assim, elas estão de acordo com as correlações observadas no modelo animal. Também, a escala SCARED é uma ferramenta de *screening*, não de diagnóstico para ansiedade. Além disso, o cuidado materno nos humanos, diferentemente do modelo animal, foi medido de forma indireta, pois a escala PBI considera a percepção dos indivíduos em relação aos cuidados maternos recebidos na infância, não necessariamente refletindo com exatidão o cuidado efetivamente ofertado pela mãe. Por fim, não foi possível considerar confundidores nas análises dos humanos devido ao pequeno tamanho da amostra, que foi composta por mais meninas, porém sem diferença no

escore do SCARED entre os sexos. Apesar das limitações, ainda foi possível encontrar semelhanças entre as duas espécies, o que reforça a validade deste estudo.

9 CONCLUSÃO

Neste trabalho mostrou-se que a intervenção neonatal realizada, que consistiu na redução do material disponível para a confecção do ninho do dia 2 ao dia 9 de vida dos filhotes, impossibilitando sua construção adequada, conseguiu impactar de forma significativa no cuidado materno. Essa alteração na interação entre mãe e filhote associou-se com o desenvolvimento de comportamentos do tipo ansioso na vida adulta. A investigação de possíveis mecanismos relacionados ao desenvolvimento de ansiedade mostrou que tanto o eixo HPA, quanto os níveis periféricos de BDNF podem estar envolvidos na associação entre trauma precoce e ansiedade.

Cabe destacar a investigação do papel do BDNF, sendo a abordagem translacional da questão um dos pontos fortes do trabalho, evidenciando a presença de associação entre o cuidado materno e os níveis de BDNF periféricos na vida adulta tanto no modelo animal, quanto no estudo clínico. Portanto, um trauma no início da vida, mediado pelo cuidado materno, esteve associado ao desenvolvimento de ansiedade, sendo o aumento do BDNF periférico um marcador em potencial para essa associação.

Sendo assim, devido à possibilidade da abordagem translacional observada neste trabalho, o modelo animal proposto mostra-se útil na investigação de outros mecanismos que expliquem a associação entre a adversidade no início da vida, mediada pelo cuidado materno, e o desenvolvimento de psicopatologias na vida adulta.

REFERÊNCIAS

1. Ader R, Grotta L. Effects of early experience on adrenocortical reactivity. *Physiol Behav.* 1969;4:303-5.
2. Andrade L, Walters EE, Gentil V, Laurenti R. Prevalence of ICD-10 mental disorders in a catchment area in the city of Sao Paulo, Brazil. *Soc Psychiatry Psychiatr Epidemiol.* 2002;37(7):316-25.
3. Balon R. Mood, anxiety, and physical illness: body and mind, or mind and body? *Depress Anxiety.* 2006;23(6):377-87.
4. Bamberger CM, Schulte HM, Chrousos GP. Molecular determinants of glucocorticoid receptor function and tissue sensitivity to glucocorticoids. *Endocr Rev.* 1996;17(3):245-61.
5. Barker DJ, Winter PD, Osmond C, Margetts B, Simmonds SJ. Weight in infancy and death from ischaemic heart disease. *Lancet.* 1989;2(8663):577-80.
6. Bijl RV, Ravelli A, van Zessen G. Prevalence of psychiatric disorder in the general population: results of The Netherlands Mental Health Survey and Incidence Study (NEMESIS). *Soc Psychiatry Psychiatr Epidemiol.* 1998;33(12):587-95.
7. Bland ST, Schmid MJ, Der-Avakian A, Watkins LR, Spencer RL, Maier SF. Expression of c-fos and BDNF mRNA in subregions of the prefrontal cortex of male and female rats after acute uncontrollable stress. *Brain Res.* 2005;1051(1-2):90-9.
8. Bocchio-Chiavetto L, Bagnardi V, Zanardini R, Molteni R, Nielsen MG, Placentino A, et al. Serum and plasma BDNF levels in major depression: a replication study and meta-analyses. *World J Biol Psychiatry.* 2010;11(6):763-73.
9. Bolton JM, Cox BJ, Afifi TO, Enns MW, Bienvenu OJ, Sareen J. Anxiety disorders and risk for suicide attempts: findings from the Baltimore Epidemiologic Catchment area follow-up study. *Depress Anxiety.* 2008;25(6):477-81.
10. Brunson KL, Kramar E, Lin B, Chen Y, Colgin LL, Yanagihara TK, et al. Mechanisms of late-onset cognitive decline after early-life stress. *J Neurosci.* 2005;25(41):9328-38.

11. Bückner J, Kapczinski F, Kapczinski NS, Cereser KM, Post R, Szobot C, et al., editors. Aumento dos níveis de fator neurotrófico derivado do cérebro e psicopatologia em crianças com trauma quando comparadas a controles. XXVIII Congresso Brasileiro de Psiquiatria; 2010; Fortaleza: Revista Brasileira de Psiquiatria, p.S61.
12. Butkevich I, Mikhailenko V, Semionov P, Bagaeva T, Otellin V, Aloisi AM. Effects of maternal corticosterone and stress on behavioral and hormonal indices of formalin pain in male and female offspring of different ages. *Horm Behav.* 2009;55(1):149-57.
13. Campeau S, Day HE, Helmreich DL, Kollack-Walker S, Watson SJ. Principles of psychoneuroendocrinology. *Psychiatr Clin North Am.* 1998;21(2):259-76.
14. Canetti L, Bachar E, Berry EM. Food and emotion. *Behav Processes.* 2002;60(2):157-64.
15. Carola V, Gross C. BDNF moderates early environmental risk factors for anxiety in mouse. *Genes Brain Behav.* 2010;9(4):379-89.
16. Champagne FA, Francis DD, Mar A, Meaney MJ. Variations in maternal care in the rat as a mediating influence for the effects of environment on development. *Physiol Behav.* 2003;79(3):359-71.
17. Charmandari E, Tsigos C, Chrousos G. Endocrinology of the stress response. *Annu Rev Physiol.* 2005;67:259-84.
18. Chen ZY, Jing D, Bath KG, Ieraci A, Khan T, Siao CJ, et al. Genetic variant BDNF (Val66Met) polymorphism alters anxiety-related behavior. *Science.* 2006;314(5796):140-3.
19. Chiavegatto S, Dawson VL, Mamounas LA, Koliatsos VE, Dawson TM, Nelson RJ. Brain serotonin dysfunction accounts for aggression in male mice lacking neuronal nitric oxide synthase. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2001;98(3):1277-81.
20. Chrousos GP. Stress and disorders of the stress system. *Nat Rev Endocrinol.* 2009;5(7):374-81.
21. Cirulli F, Berry A, Alleva E. Early disruption of the mother-infant relationship: effects on brain plasticity and implications for psychopathology. *Neurosci Biobehav Rev.* 2003;27(1-2):73-82.

22. Colzato LS, Van der Does AJ, Kouwenhoven C, Elzinga BM, Hommel B. BDNF Val(66)Met polymorphism is associated with higher anticipatory cortisol stress response, anxiety, and alcohol consumption in healthy adults. *Psychoneuroendocrinology*. 2011. *In press*.
23. Coplan JD, Andrews MW, Rosenblum LA, Owens MJ, Friedman S, Gorman JM, et al. Persistent elevations of cerebrospinal fluid concentrations of corticotropin-releasing factor in adult nonhuman primates exposed to early-life stressors: implications for the pathophysiology of mood and anxiety disorders. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1996;93(4):1619-23.
24. Davies AA, Smith GD, Ben-Shlomo Y, Litchfield P. Low birth weight is associated with higher adult total cholesterol concentration in men: findings from an occupational cohort of 25,843 employees. *Circulation*. 2004;110(10):1258-62.
25. Davis C, Levitan RD, Carter J, Kaplan AS, Reid C, Curtis C, et al. Personality and eating behaviors: a case-control study of binge eating disorder. *Int J Eat Disord*. 2008;41(3):243-50.
26. De Bellis MD. The psychobiology of neglect. *Child Maltreat*. 2005;10(2):150-72.
27. De Kloet ER, Vreugdenhil E, Oitzl MS, Joels M. Brain corticosteroid receptor balance in health and disease. *Endocr Rev*. 1998;19(3):269-301.
28. Egan MF, Kojima M, Callicott JH, Goldberg TE, Kolachana BS, Bertolino A, et al. The BDNF val66met polymorphism affects activity-dependent secretion of BDNF and human memory and hippocampal function. *Cell*. 2003;112(2):257-69.
29. Engert V, Efanov SI, Dedovic K, Duchesne A, Dagher A, Pruessner JC. Perceived early-life maternal care and the cortisol response to repeated psychosocial stress. *J Psychiatry Neurosci*. 2010;35(6):370-7.
30. Enns MW, Cox BJ, Clara I. Parental bonding and adult psychopathology: results from the US National Comorbidity Survey. *Psychol Med*. 2002;32(6):997-1008.
31. Fumagalli F, Molteni R, Racagni G, Riva MA. Stress during development: Impact on neuroplasticity and relevance to psychopathology. *Prog Neurobiol*. 2007;81(4):197-217.

32. Garipey G, Nitka D, Schmitz N. The association between obesity and anxiety disorders in the population: a systematic review and meta-analysis. *Int J Obes (Lond)*. 2010;34(3):407-19.
33. Gatt JM, Nemeroff CB, Dobson-Stone C, Paul RH, Bryant RA, Schofield PR, et al. Interactions between BDNF Val66Met polymorphism and early life stress predict brain and arousal pathways to syndromal depression and anxiety. *Mol Psychiatry*. 2009;14(7):681-95.
34. Goodwin RD, Fergusson DM, Horwood LJ. Asthma and depressive and anxiety disorders among young persons in the community. *Psychol Med*. 2004;34(8):1465-74.
35. Govindarajan A, Rao BS, Nair D, Trinh M, Mawjee N, Tonegawa S, et al. Transgenic brain-derived neurotrophic factor expression causes both anxiogenic and antidepressant effects. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2006;103(35):13208-13.
36. Grande I, Fries GR, Kunz M, Kapczinski F. The role of BDNF as a mediator of neuroplasticity in bipolar disorder. *Psychiatry Investig*. 2010;7(4):243-50.
37. Grassi-Oliveira R, Stein LM, Lopes RP, Teixeira AL, Bauer ME. Low plasma brain-derived neurotrophic factor and childhood physical neglect are associated with verbal memory impairment in major depression--a preliminary report. *Biol Psychiatry*. 2008a;64(4):281-5.
38. Grassi-Oliveira R, Ashy M, Stein LM. Psychobiology of childhood maltreatment: effects of allostatic load? *Rev Bras Psiquiatr*. 2008b;30(1):60-8.
39. Gross C, Santarelli L, Brunner D, Zhuang X, Hen R. Altered fear circuits in 5-HT(1A) receptor KO mice. *Biol Psychiatry*. 2000;48(12):1157-63.
40. Gross C, Zhuang X, Stark K, Ramboz S, Oosting R, Kirby L, et al. Serotonin1A receptor acts during development to establish normal anxiety-like behaviour in the adult. *Nature*. 2002;416(6879):396-400.
41. Guillet R, Michaelson SM. Corticotropin responsiveness in the neonatal rat. *Neuroendocrinology*. 1978;27(3-4):119-25.
42. Guix FX, Uribealago I, Coma M, Munoz FJ. The physiology and pathophysiology of nitric oxide in the brain. *Prog Neurobiol*. 2005;76(2):126-52.

43. Hashimoto K, Shimizu E, Iyo M. Critical role of brain-derived neurotrophic factor in mood disorders. *Brain Res Brain Res Rev.* 2004;45(2):104-14.
44. Hauck S, Kapczinski F, Roesler R, de Moura Silveira E, Jr., Magalhaes PV, Krueh LR, et al. Serum brain-derived neurotrophic factor in patients with trauma psychopathology. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry.* 2010;34(3):459-62.
45. Hauck S, Schestatsky S, Terra L, Knijnik L, Sanchez P, Ceitlin L. Adaptação transcultural para o português brasileiro do Parental Bonding Instrument (PBI). *Rev Psiquiatr.* 2006;28(2):162-8.
46. Heldt E, Blaya C, Isolan L, Kipper L, Teruchkin B, Otto MW, et al. Quality of life and treatment outcome in panic disorder: cognitive behavior group therapy effects in patients refractory to medication treatment. *Psychother Psychosom. Switzerland*2006. p. 183-6.
47. Horesh N, Amir M, Kedem P, Goldberger Y, Kotler M. Life events in childhood, adolescence and adulthood and the relationship to panic disorder. *Acta Psychiatr Scand.* 1997;96(5):373-8.
48. Isolan LR, Zeni CP, Mezzomo K, Blaya C, Kipper L, Heldt E, et al. Behavioral inhibition and history of childhood anxiety disorders in Brazilian adult patients with panic disorder and social anxiety disorder. *Rev Bras Psiquiatr. Brazil*2005. p. 97-100.
49. Ivy AS, Brunson KL, Sandman C, Baram TZ. Dysfunctional nurturing behavior in rat dams with limited access to nesting material: a clinically relevant model for early-life stress. *Neuroscience.* 2008;154(3):1132-42.
50. Iwasaki S, Inoue K, Kiriike N, Hikiji K. Effect of maternal separation on feeding behavior of rats in later life. *Physiol Behav.* 2000;70(5):551-6.
51. Joëls M, Baram TZ. The neuro-symphony of stress. *Nat Rev Neurosci.* 2009;10(6):459-66.
52. Isolan L, Salum GA, Osowski AT, Amaro E, Manfro GG. Psychometric properties of the Screen for Child Anxiety Related Emotional Disorders (SCARED) in Brazilian children and adolescents. *J Anxiety Disord.* 2011;25(5):741-8.

53. Kaffman A, Meaney MJ. Neurodevelopmental sequelae of postnatal maternal care in rodents: clinical and research implications of molecular insights. *J Child Psychol Psychiatry*. 2007;48(3-4):224-44.
54. 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.
55. Kandel ER. Biology and the future of psychoanalysis: a new intellectual framework for psychiatry revisited. *Am J Psychiatry*. 1999;156(4):505-24.
56. Kanter ED, Wilkinson CW, Radant AD, Petrie EC, Dobie DJ, McFall ME, et al. Glucocorticoid feedback sensitivity and adrenocortical responsiveness in posttraumatic stress disorder. *Biol Psychiatry*. 2001;50(4):238-45.
57. Kapczinski F, Frey BN, Kauer-Sant'Anna M, Grassi-Oliveira R. Brain-derived neurotrophic factor and neuroplasticity in bipolar disorder. *Expert Rev Neurother*. 2008;8(7):1101-13.
58. Karege F, Perret G, Bondolfi G, Schwald M, Bertschy G, Aubry JM. Decreased serum brain-derived neurotrophic factor levels in major depressed patients. *Psychiatry Res*. 2002;109(2):143-8.
59. Kauer-Sant'Anna M, Tramontina J, Andreazza AC, Cereser K, da Costa S, Santin A, et al. Traumatic life events in bipolar disorder: impact on BDNF levels and psychopathology. *Bipolar Disord*. 2007;9 Suppl 1:128-35.
60. Kennedy GC. The development with age of hypothalamic restraint upon the appetite of the rat. *J Endocrinol*. 1957;16(1):9-17.
61. Kessler RC, McGonagle KA, Zhao S, Nelson CB, Hughes M, Eshleman S, et al. Lifetime and 12-month prevalence of DSM-III-R psychiatric disorders in the United States. Results from the National Comorbidity Survey. *Arch Gen Psychiatry*. 1994;51(1):8-19.
62. Kim YK, Lee HP, Won SD, Park EY, Lee HY, Lee BH, et al. Low plasma BDNF is associated with suicidal behavior in major depression. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*. 2007;31(1):78-85.

63. Kitay JL. Sex differences in adrenal cortical secretion in the rat. *Endocrinology*. 1961;68:818-24.
64. Konnopka A, Leichsenring F, Leibing E, Konig HH. Cost-of-illness studies and cost-effectiveness analyses in anxiety disorders: a systematic review. *J Affect Disord*. Netherlands 2009. p. 14-31.
65. Kyrou I, Tsigos C. Stress mechanisms and metabolic complications. *Horm Metab Res*. 2007;39(6):430-8.
66. Levine S. The ontogeny of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis. The influence of maternal factors. *Ann N Y Acad Sci*. 1994;746:275-88; discussion 89-93.
67. Levine S, Haltmeyer G, Karas G, Denenberg V. Physiological and behavioral effects of infantile stimulation. *Physiol Behav*. 1967;2:55-9.
68. Lewis A. Problems Presented by the Ambiguous Word "Anxiety" as Used in Psychopathology. *The Later Papers of Sir Aubrey Lewis: Oxford University Press*; 1979.
69. Lima DC, Vale TG, Arganaraz GA, Varella PP, Frussa-Filho R, Cavaleiro EA, et al. Behavioral evaluation of adult rats exposed in utero to maternal epileptic seizures. *Epilepsy Behav*. 2010;18(1-2):45-9.
70. Liu D, Caldji C, Sharma S, Plotsky PM, Meaney MJ. Influence of neonatal rearing conditions on stress-induced adrenocorticotropin responses and norepinephrine release in the hypothalamic paraventricular nucleus. *J Neuroendocrinol*. 2000;12(1):5-12.
71. Liu D, Diorio J, Tannenbaum B, Caldji C, Francis D, Freedman A, et al. Maternal care, hippocampal glucocorticoid receptors, and hypothalamic-pituitary-adrenal responses to stress. *Science*. 1997;277(5332):1659-62.
72. Lonstein JS, Simmons DA, Stern JM. Functions of the caudal periaqueductal gray in lactating rats: kyphosis, lordosis, maternal aggression, and fearfulness. *Behav Neurosci*. 1998;112(6):1502-18.
73. Lovejoy JC, Sainsbury A. Sex differences in obesity and the regulation of energy homeostasis. *Obes Rev*. 2009;10(2):154-67.

74. Lyons WE, Mamounas LA, Ricaurte GA, Coppola V, Reid SW, Bora SH, et al. Brain-derived neurotrophic factor-deficient mice develop aggressiveness and hyperphagia in conjunction with brain serotonergic abnormalities. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1999;96(26):15239-44.
75. Macri S, Chiarotti F, Wurbel H. Maternal separation and maternal care act independently on the development of HPA responses in male rats. *Behav Brain Res*. 2008;191(2):227-34.
76. Maina G, Rosso G, Zanardini R, Bogetto F, Gennarelli M, Bocchio-Chiavetto L. Serum levels of brain-derived neurotrophic factor in drug-naive obsessive-compulsive patients: a case-control study. *J Affect Disord*. 2010;122(1-2):174-8.
77. Manfro GG, Otto MW, McArdle ET, Worthington JJ, 3rd, Rosenbaum JF, Pollack MH. Relationship of antecedent stressful life events to childhood and family history of anxiety and the course of panic disorder. *J Affect Disord*. 1996;41(2):135-9.
78. Marcondes FK, Miguel KJ, Melo LL, Spadari-Bratfisch RC. Estrous cycle influences the response of female rats in the elevated plus-maze test. *Physiol Behav*. 2001;74(4-5):435-40.
79. Martinez-Pereda JA, Castander FJ, Labrador P, Cardenas R. [Analysis of sexual differences in emotional reactions in rats]. *Rev Esp Fisiol*. 1989;45(3):239-43.
80. McEwen BS. Sex, stress and the hippocampus: allostasis, allostatic load and the aging process. *Neurobiol Aging*. 2002;23(5):921-39.
81. McEwen BS. Physiology and neurobiology of stress and adaptation: central role of the brain. *Physiol Rev*. 2007;87(3):873-904.
82. McIntosh J, Anisman H, Merali Z. Short- and long-periods of neonatal maternal separation differentially affect anxiety and feeding in adult rats: gender-dependent effects. *Brain Res Dev Brain Res*. 1999;113(1-2):97-106.
83. McLean CP, Asnaani A, Litz BT, Hofmann SG. Gender differences in anxiety disorders: Prevalence, course of illness, comorbidity and burden of illness. *J Psychiatr Res*. 2011;45(8):1027-35.

84. Meaney MJ, Aitken DH, Viau V, Sharma S, Sarrieu A. Neonatal handling alters adrenocortical negative feedback sensitivity and hippocampal type II glucocorticoid receptor binding in the rat. *Neuroendocrinology*. 1989;50(5):597-604.
85. Meaney MJ, Diorio J, Francis D, Weaver S, Yau J, Chapman K, et al. Postnatal handling increases the expression of cAMP-inducible transcription factors in the rat hippocampus: the effects of thyroid hormones and serotonin. *J Neurosci*. 2000;20(10):3926-35.
86. Meaney MJ, Diorio J, Francis D, Widdowson J, LaPlante P, Caldji C, et al. Early environmental regulation of forebrain glucocorticoid receptor gene expression: implications for adrenocortical responses to stress. *Dev Neurosci*. 1996;18(1-2):49-72.
87. Mello AF, Mello MF, Carpenter LL, Price LH. Update on stress and depression: the role of the hypothalamic-pituitary-adrenal (HPA) axis. *Rev Bras Psiquiatr*. 2003;25(4):231-8.
88. Miguel TT, Nunes-de-Souza RL. Anxiogenic-like effects induced by NMDA receptor activation are prevented by inhibition of neuronal nitric oxide synthase in the periaqueductal gray in mice. *Brain Res*. 2008;1240:39-46.
89. Miranda KM, Espey MG, Wink DA. A rapid, simple spectrophotometric method for simultaneous detection of nitrate and nitrite. *Nitric Oxide*. 2001;5(1):62-71.
90. Mitchell JB, Betito K, Rowe W, Boksa P, Meaney MJ. Serotonergic regulation of type II corticosteroid receptor binding in hippocampal cell cultures: evidence for the importance of serotonin-induced changes in cAMP levels. *Neuroscience*. 1992;48(3):631-9.
91. Montag C, Basten U, Stelzel C, Fiebach CJ, Reuter M. The BDNF Val66Met polymorphism and anxiety: support for animal knock-in studies from a genetic association study in humans. *Psychiatry Res*. 2010;179(1):86-90.
92. Moriceau S, Shionoya K, Jakubs K, Sullivan RM. Early-life stress disrupts attachment learning: the role of amygdala corticosterone, locus ceruleus corticotropin releasing hormone, and olfactory bulb norepinephrine. *J Neurosci*. 2009; 29(50):15745-55.
93. Morilak DA, Barrera G, Echevarria DJ, Garcia AS, Hernandez A, Ma S, et al. Role of brain norepinephrine in the behavioral response to stress. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*. 2005;29(8):1214-24.

94. Munck A, Guyre PM, Holbrook NJ. Physiological functions of glucocorticoids in stress and their relation to pharmacological actions. *Endocr Rev.* 1984;5(1):25-44.
95. Myers MM, Brunelli SA, Squire JM, Shindeldecker RD, Hofer MA. Maternal behavior of SHR rats and its relationship to offspring blood pressures. *Dev Psychobiol.* 1989;22(1):29-53.
96. Nevala R, Vaskonen T, Vehniainen J, Korpela R, Vapaatalo H. Soy based diet attenuates the development of hypertension when compared to casein based diet in spontaneously hypertensive rat. *Life Sci.* 2000;66(2):115-24.
97. Newport DJ, Stowe ZN, Nemeroff CB. Parental depression: animal models of an adverse life event. *Am J Psychiatry.* 2002;159(8):1265-83.
98. Parker G. Reported parental characteristics in relation to trait depression and anxiety levels in a non-clinical group. *Aust N Z J Psychiatry.* 1979;13(3):260-4
99. Parker G, Lipscombe P. Influences of maternal overprotection. *Br J Psychiatry.* 1981;138:303-11.
100. Parker G, Tupling H, Brown L. A Parental Bonding Instrument. *British Journal of Medical Psychology.* 1979;52:1-10.
101. Patterson CM, Bouret SG, Park S, Irani BG, Dunn-Meynell AA, Levin BE. Large litter rearing enhances leptin sensitivity and protects selectively bred diet-induced obese rats from becoming obese. *Endocrinology.* 2010;151(9):4270-9.
102. Plagemann A, Roepke K, Harder T, Brunn M, Harder A, Wittrock-Staar M, et al. Epigenetic malprogramming of the insulin receptor promoter due to developmental overfeeding. *J Perinat Med.* 2010;38(4):393-400.
103. Plotsky PM, Meaney MJ. Early, postnatal experience alters hypothalamic corticotropin-releasing factor (CRF) mRNA, median eminence CRF content and stress-induced release in adult rats. *Brain Res Mol Brain Res.* 1993;18(3):195-200.
104. Plotsky PM, Thirivikraman KV, Nemeroff CB, Caldji C, Sharma S, Meaney MJ. Long-term consequences of neonatal rearing on central corticotropin-releasing factor systems in adult male rat offspring. *Neuropsychopharmacology.* 2005;30(12):2192-204.

105. Pokk P, Vali M. The effects of the nitric oxide synthase inhibitors on the behaviour of small-platform-stressed mice in the plus-maze test. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*. 2002;26(2):241-7.
106. Posener JA, DeBattista C, Williams GH, Chmura Kraemer H, Kalehzan BM, Schatzberg AF. 24-Hour monitoring of cortisol and corticotropin secretion in psychotic and nonpsychotic major depression. *Arch Gen Psychiatry*. 2000;57(8):755-60.
107. Pryce CR, Bettschen D, Feldon J. Comparison of the effects of early handling and early deprivation on maternal care in the rat. *Dev Psychobiol*. 2001;38(4):239-51.
108. Pryce CR, Feldon J. Long-term neurobehavioural impact of the postnatal environment in rats: manipulations, effects and mediating mechanisms. *Neurosci Biobehav Rev*. 2003;27(1-2):57-71.
109. Rasmusson AM, Lipschitz DS, Wang S, Hu S, Vojvoda D, Bremner JD, et al. Increased pituitary and adrenal reactivity in premenopausal women with posttraumatic stress disorder. *Biol Psychiatry*. 2001;50(12):965-77.
110. Ribases M, Gratacos M, Fernandez-Aranda F, Bellodi L, Boni C, Anderluh M, et al. Association of BDNF with anorexia, bulimia and age of onset of weight loss in six European populations. *Hum Mol Genet*. 2004;13(12):1205-12.
111. Rice CJ, Sandman CA, Lenjavi MR, Baram TZ. A novel mouse model for acute and long-lasting consequences of early life stress. *Endocrinology*. 2008;149(10):4892-900.
112. Rios M, Fan G, Fekete C, Kelly J, Bates B, Kuehn R, et al. Conditional deletion of brain-derived neurotrophic factor in the postnatal brain leads to obesity and hyperactivity. *Mol Endocrinol*. 2001;15(10):1748-57.
113. Roth TL, Lubin FD, Funk AJ, Sweatt JD. Lasting epigenetic influence of early-life adversity on the BDNF gene. *Biol Psychiatry*. 2009;65(9):760-9.
114. Salum GA, Isolan LR, Bosa VL, Tocchetto AG, Teche SP, Schuch I, et al. The multidimensional evaluation and treatment of anxiety in children and adolescents: rationale, design, methods and preliminary findings. *Rev Bras Psiquiatr*. 2011a;33(2):181-95.

115. Salum G, Silveira PP, Grassi-Oliveira R, Aguiar BW, Stertz L, Bosa VL, Schuch I, Goldani MZ, Kapczinski FP, Manfro GG. Brain Derived Neurotrophic Factor in sensitive periods: interaction between childhood neglect and puberty. Artigo submetido em 2011b.
116. Sapolsky RM, Meaney MJ. Maturation of the adrenocortical stress response: neuroendocrine control mechanisms and the stress hyporesponsive period. *Brain Res.* 1986;396(1):64-76.
117. Sapolsky RM, Romero LM, Munck AU. How do glucocorticoids influence stress responses? Integrating permissive, suppressive, stimulatory, and preparative actions. *Endocr Rev.* 2000;21(1):55-89.
118. Sargent PA, Kjaer KH, Bench CJ, Rabiner EA, Messa C, Meyer J, et al. Brain serotonin_{1A} receptor binding measured by positron emission tomography with [¹¹C]WAY-100635: effects of depression and antidepressant treatment. *Arch Gen Psychiatry.* 2000;57(2):174-80.
119. da S Benetti C, Silveira PP, Portella AK, Diehl LA, Nunes E, de Oliveira VS, et al. Could preference for palatable foods in neonatally handled rats alter metabolic patterns in adult life? *Pediatr Res.* 2007;62(4):405-11.
120. Scott KM, Bruffaerts R, Simon GE, Alonso J, Angermeyer M, de Girolamo G, et al. Obesity and mental disorders in the general population: results from the world mental health surveys. *Int J Obes (Lond).* England2008. p. 192-200.
121. Seale JV, Wood SA, Atkinson HC, Bate E, Lightman SL, Ingram CD, et al. Gonadectomy reverses the sexually dimorphic patterns of circadian and stress-induced hypothalamic-pituitary-adrenal axis activity in male and female rats. *J Neuroendocrinol.* 2004;16(6):516-24.
122. Seganfredo AC, Torres M, Salum GA, Blaya C, Acosta J, Eizirik C, et al. Gender differences in the associations between childhood trauma and parental bonding in panic disorder. *Rev Bras Psiquiatr.* 2009;31(4):314-21.
123. Severino GS, Fossati IA, Padoin MJ, Gomes CM, Trevizan L, Sanvitto GL, et al. Effects of neonatal handling on the behavior and prolactin stress response in male and female rats at various ages and estrous cycle phases of females. *Physiol Behav.* 2004;81(3):489-98.

124. Silveira PP, Portella AK, Clemente Z, Bassani E, Tabajara AS, Gamaro GD, et al. Neonatal handling alters feeding behavior of adult rats. *Physiol Behav.* 2004;80(5):739-45.
125. Silveira PP, Portella AK, Clemente Z, Gamaro GD, Dalmaz C. The effect of neonatal handling on adult feeding behavior is not an anxiety-like behavior. *Int J Dev Neurosci.* 2005;23(1):93-9.
126. Smythe JW, Rowe WB, Meaney MJ. Neonatal handling alters serotonin (5-HT) turnover and 5-HT₂ receptor binding in selected brain regions: relationship to the handling effect on glucocorticoid receptor expression. *Brain Res Dev Brain Res.* 1994;80(1-2):183-9.
127. Sokoloff G, Blumberg MS. Thermogenic, respiratory, and ultrasonic responses of week-old rats across the transition from moderate to extreme cold exposure. *Dev Psychobiol.* 1997;30(3):181-94.
128. Southwick SM, Krystal JH, Morgan CA, Johnson D, Nagy LM, Nicolaou A, et al. Abnormal noradrenergic function in posttraumatic stress disorder. *Arch Gen Psychiatry.* 1993;50(4):266-74.
129. Sowden GL, Huffman JC. The impact of mental illness on cardiac outcomes: a review for the cardiologist. *Int J Cardiol. Netherlands*2009. p. 30-7.
130. Spertus IL, Yehuda R, Wong CM, Halligan S, Seremetis SV. Childhood emotional abuse and neglect as predictors of psychological and physical symptoms in women presenting to a primary care practice. *Child Abuse Negl.* 2003;27(11):1247-58.
131. Stern JM. Offspring-induced nurturance: animal-human parallels. *Dev Psychobiol.* 1997;31(1):19-37.
132. Stern JM, Johnson SK. Ventral somatosensory determinants of nursing behavior in Norway rats. I. Effects of variations in the quality and quantity of pup stimuli. *Physiol Behav.* 1990;47(5):993-1011.
133. Stern JM, Yu YL, Crockett DP. Dorsolateral columns of the spinal cord are necessary for both suckling-induced neuroendocrine reflexes and the kyphotic nursing posture in lactating rats. *Brain Res.* 2002;947(1):110-21.

134. Sullivan GM, Coplan JD, Kent JM, Gorman JM. The noradrenergic system in pathological anxiety: a focus on panic with relevance to generalized anxiety and phobias. *Biol Psychiatry*. 1999;46(9):1205-18.
135. Suzuki A, Matsumoto Y, Shibuya N, Sadahiro R, Kamata M, Goto K, et al. The brain-derived neurotrophic factor Val66Met polymorphism modulates the effects of parental rearing on personality traits in healthy subjects. *Genes Brain Behav*. 2011;10(4):385-91.
136. Swanson L. *Brain maps: Structure of the rat brain*. 2^a edição ed: Elsevier; 1998.
137. Tannenbaum B, Rowe W, Sharma S, Diorio J, Steverman A, Walker M, et al. Dynamic variations in plasma corticosteroid-binding globulin and basal HPA activity following acute stress in adult rats. *J Neuroendocrinol*. 1997;9(3):163-8.
138. Tasker JG, Herman JP. Mechanisms of rapid glucocorticoid feedback inhibition of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis. *Stress*. 2011;14(4):398-406.
139. 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.
140. Toyooka K, Asama K, Watanabe Y, Muratake T, Takahashi M, Someya T, et al. Decreased levels of brain-derived neurotrophic factor in serum of chronic schizophrenic patients. *Psychiatry Res*. 2002;110(3):249-57.
141. van Hasselt FN, Cornelisse S, Yuan Zhang T, Meaney MJ, Velzing EH, Krugers HJ, et al. Adult hippocampal glucocorticoid receptor expression and dentate synaptic plasticity correlate with maternal care received by individuals early in life. *Hippocampus*. 2011. Epub 18/01/2011.
142. Verhagen M, van der Meij A, van Deurzen PA, Janzing JG, Arias-Vasquez A, Buitelaar JK, et al. Meta-analysis of the BDNF Val66Met polymorphism in major depressive disorder: effects of gender and ethnicity. *Mol Psychiatry*. 2010;15(3):260-71.
143. Vesga-Lopez O, Schneier FR, Wang S, Heimberg RG, Liu SM, Hasin DS, et al. Gender differences in generalized anxiety disorder: results from the National Epidemiologic Survey on Alcohol and Related Conditions (NESARC). *J Clin Psychiatry*. 2008;69(10):1606-16.

144. Wang Y, Mathews CA, Li Y, Lin Z, Xiao Z. Brain-derived neurotrophic factor (BDNF) plasma levels in drug-naive OCD patients are lower than those in healthy people, but are not lower than those in drug-treated OCD patients. *J Affect Disord*. 2011.
145. Weaver IC. Shaping adult phenotypes through early life environments. *Birth Defects Res C Embryo Today*. 2009;87(4):314-26.
146. Weaver IC, D'Alessio AC, Brown SE, Hellstrom IC, Dymov S, Sharma S, et al. The transcription factor nerve growth factor-inducible protein a mediates epigenetic programming: altering epigenetic marks by immediate-early genes. *J Neurosci*. 2007;27(7):1756-68.
147. Workman JL, Trainor BC, Finy MS, Nelson RJ. Inhibition of neuronal nitric oxide reduces anxiety-like responses to pair housing. *Behav Brain Res*. 2008;187(1):109-15.
148. Xiu MH, Hui L, Dang YF, Hou TD, Zhang CX, Zheng YL, et al. Decreased serum BDNF levels in chronic institutionalized schizophrenia on long-term treatment with typical and atypical antipsychotics. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*. 2009;33(8):1508-12.
149. Yau JL, Noble J, Seckl JR. Site-specific regulation of corticosteroid and serotonin receptor subtype gene expression in the rat hippocampus following 3,4-methylenedioxymethamphetamine: role of corticosterone and serotonin. *Neuroscience*. 1997;78(1):111-21.
150. Yau JL, Noble J, Widdowson J, Seckl JR. Impact of adrenalectomy on 5-HT6 and 5-HT7 receptor gene expression in the rat hippocampus. *Brain Res Mol Brain Res*. 1997;45(1):182-6.
151. Yee BK, Zhu SW, Mohammed AH, Feldon J. Levels of neurotrophic factors in the hippocampus and amygdala correlate with anxiety- and fear-related behaviour in C57BL6 mice. *J Neural Transm*. 2007;114(4):431-44.
152. Yoshimura S, Sakamoto S, Kudo H, Sassa S, Kumai A, Okamoto R. Sex-differences in adrenocortical responsiveness during development in rats. *Steroids*. 2003;68(5):439-45.
153. Zhang J, Huang XY, Ye ML, Luo CX, Wu HY, Hu Y, et al. Neuronal nitric oxide synthase alteration accounts for the role of 5-HT1A receptor in modulating anxiety-related behaviors. *J Neurosci*. 2010;30(7):2433-41.

ANEXO A – ARTIGO SUBMETIDO (VERSÃO EM INGLÊS)

Early origins of anxiety: translational evidence of biological correlates associating parenting and anxiety-like behaviors.

Running title: Translational evidence for the early origins of anxiety

Authors: Roberta Dalle Molle¹, André Krumel Portella¹, Marcelo Zubaran Goldani¹, Flávio Pereira Kapczinski², Sandra Leistner-Segala³, Giovanni Abrahão Salum², Gisele Gus Manfro², Patrícia Pelufo Silveira¹

1. Núcleo de Estudos da Saúde da Criança e do Adolescente (NESCA), Faculdade de Medicina, Hospital de Clínicas de Porto Alegre. UFRGS, Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brazil.
2. Programa de Pós-Graduação em Ciências Médicas: Psiquiatria. Faculdade de Medicina, Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brazil.
3. Serviço de Genética Médica, Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brazil.

Corresponding author: Roberta Dalle Molle

Departamento de Pediatria e Puericultura–FAMED-Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Ramiro Barcelos, 2350, Largo Eduardo Zaccaro Faraco. 90035-903, Porto Alegre, RS, Brazil. Phone: 051- 3359-8019. Fax: 051- 3359-8001. E-mail: betinha_dm@yahoo.com

Keywords: Anxiety, developmental origins of adult disease, early trauma, maternal care, BDNF.

Number of words

Abstract: 248

Introduction: 461

Discussion: 1340

Date of submission: 09/08/2011

ABSTRACT

Introduction: In both humans and other mammals an adverse early life environment is associated with anxiety-like behaviors and disorders. The brain derived neurotrophic factor (BDNF) is sensible to this environment and could be a marker of the underlying brain changes. We investigated these associations in an experimental model and in a communitarian sample of adolescents. **Methodology:** Litters were divided into intervention group (limited access to nesting material), or control. Maternal behavior was observed from days 1-9 of life. Adult rats were submitted to behavioral testing and BDNF measurements in plasma, hippocampus, amygdala and periaqueductal gray. In humans, 129 adolescents screened using the Screen for Children and Anxiety Related Emotional Disorders (SCARED) responded to the Parental Bonding Instrument (PBI); serum BDNF and the Val66Met polymorphism were investigated. **Results:** Intervention dams showed low quality maternal care, and adult offspring demonstrated higher anxiety-like behaviors and plasma BDNF levels. Low quality maternal care positively correlated with adult peripheral BDNF without differences in central BDNF contents. In humans, there were negative correlations between maternal warmth and separation anxiety, social phobia and school phobia, and a positive correlation between maternal overprotection and serum BDNF in Met carriers but not among the non-Met carriers. **Conclusion:** Early life stress that alters the dam/pup relationship persistently impacts anxiety-like behaviors and plasma BDNF levels. Similar findings were seen in humans. Our translational approach evidenced that the effects of early trauma may be mediated through maternal care, being the increased peripheral BDNF a potential relevant marker of these phenomena.

INTRODUCTION

Anxiety disorders is associated to worse outcome, contributing significantly to disability, morbidity and mortality (Balon, 2006). Early stressful life events, such as childhood abuse and neglect, have been associated with the development of anxiety disorders (Weaver, 2009). In spite of that, few studies have investigated how stressful life events can “get into the skin” (Rutter, 2006), i.e., can change the brain, modifying psychological processes, emotions and behaviors.

Anxiety is an emotion fairly conserved between species and intrinsically linked to stress responses. The nature and timing of early life events that can induce alterations later in life have been designed in animal models. Dysfunctional maternal nurturing behavior, based on limiting nesting material in the cage, influences the quality as well as the quantity of the maternal behaviors, recapitulating an important element of human early-life neglect and abuse (Ivy *et al.*, 2008). Pups reared in this model show high plasma corticosterone levels associated with depletion of corticotropin-releasing hormone (CRH) mRNA stores in the hypothalamic paraventricular nucleus (PVN). These alterations on hypothalamic-pituitary-adrenal (HPA) axis remain to adult life (Rice *et al.*, 2008), characterizing neuroendocrine abnormalities similar to those found in anxiety. Moreover, impaired maternal behavior can generate procedural memory records that predispose to neurobiological changes, with repercussions on the HPA axis and hippocampal functioning (Kandel, 1999).

The pathophysiology of anxiety disorders is complex. Although in an unspecific way, in recent years, the Brain-Derived Neurotrophic Factor (BDNF) has emerged as a potential biomarker for anxiety as well as for other psychiatric disorders such as depression and eating disorders (Hashimoto *et al.*, 2004, Lyons *et al.*, 1999, Ribases *et al.*, 2004). BDNF influences the proliferation, differentiation, morphology, and functional activity of neuronal cells. Interestingly, a genetically modified mouse with a variant BDNF Met allele that reproduces

the phenotypic hallmarks found in humans exhibits increased anxiety-related behaviors when placed in stressful settings (Chen *et al.*, 2006), suggesting a potential association between the physiology of this neurotrophin and the pathophysiology of anxiety disorders. In addition, the Met allele is associated with poorer episodic memory and abnormal hippocampal activation assayed with fMRI (Egan *et al.*, 2003).

As early trauma seems to influence the risk for later psychopathology (Horesh *et al.*, 1997, Manfro *et al.*, 1996) and the physiopathological mechanisms that link stress and anxious behavior are expected to be extremely complex, translational approaches seem to be extremely helpful in order to manipulate controlled environments and test at the same time its clinical meaningful correlates. Therefore, we aimed at studying the development of anxiety in a rat model of early adversity impacting the quality of maternal care, as well as the possible association with peripheral and central BDNF levels. In addition, searching for the relevance of our experimental findings to humans, we investigated similar associations in a sample of adolescents.

EXPERIMENTAL PROCEDURES

Rat studies:

Pregnant Wistar rats, bred at our animal facility, were single-housed in home cages (40cm x 40cm x 30cm) with a metal mesh bottom (1cm x 1cm), 2cm apart of a removable metal plate used to collect urine and droppings, specially done for this animal model. During pregnancy the floor was covered with wood chips and dams were maintained in a controlled environment: standard dark/light cycle (lights on between 09:00 h and 19:00 h), temperature of 22 + 2°C, cage cleaning once a week, food and water provided *ad libitum*.

The day of birth was considered as day 0. On day 2, dams and pups were randomly selected to two groups (see below) and maintained undisturbed until day 9. The maternal behavior was observed from day 1 to day 9 (see details below). On day 10, dams and pups were removed to home cages made of Plexiglas (46 x 31 x 16 cm) with the floor covered with wood chips and maintained in the same controlled environment cited above.

At postnatal day 21, pups were weaned and separated by sex into two or three per cage and maintained in a controlled environment similar to the one described above, except for the light cycle (lights on between 07:00 and 19:00 h). At the time of cage cleaning, animals' body weight and standard chow consumption were measured using a scale with precision of 0,01g (Marte®).

Seventeen litters were used for maternal behavior, divided in two cohorts. The cohorts were compared regarding the different components of maternal behavior, and no statistical differences were found (data not shown). Ninety-five adult male and female rats were used in the behavioral tasks initiated at day 60 of life. All animal procedures were approved by the ethical committee of Hospital de Clínicas de Porto Alegre (GPPG/HCPA, project number 09-527). The tasks were performed in acclimated behavioral rooms inside our animal facility (Unidade de Experimentação Animal/HCPA).

Early-life stress model

Early-life stress (ES) group: followed the procedure described in Ivy *et al.* (2008) with adaptations. ES group had limited access to the nesting material from postnatal day 2 (PND2) to postnatal day 9 (PND9). In the morning of PND2, the wood chips was removed, without touching the animals, and a nesting material consisting of paper towel (approximately 2000 cm³) was provided. This was the only material available for the dam to construct a rudimentary nest area. All home cages were kept in a room with laminar airflow that

eliminated accumulation of ammonia and odors. Droppings fell through the mesh to the metal place below, and the mesh was generally kept clean by the dam. All litters were completely undisturbed, and bedding was not changed during PND2-PND9.

Control group: dam and pups are left undisturbed, during PND2-PND9, in a home cage identical to the ES group but having abundant nesting material available (approximately 7200 cm³ of wood chips).

Maternal behavior observations

Followed the procedures described in Champagne *et al.* (2003). The maternal behavior of each dam was observed for five periods, with 72 min each, daily from PND1 to PND9. Briefly, the observations occurred at regular times each day with three periods during the light phase (10:00, 13:00, 17:00 h) and two periods during the dark phase (07:00 and 20:00 h) of the light/dark cycle. Within each observation period the behavior of each mother was scored every 3 min. The following behaviors were scored: dam on or off the nest (i.e. in contact with more than half of the litter), dam licking and grooming (LG) any pup, dam nursing pups in either an arched-back posture, or a passive posture in which the dam is lying either on her back or side while nursing the pups. Behavioral categories were not mutually exclusive, for example, licking and grooming often occurred while the mother was nursing the pups. The behavioral data for each female were analyzed as a percentage of the total number of observations for that female over the entire observation period. The pure contact score was calculated subtracting the contact + nursing or the contact + LG from the total contact score. Therefore, “pure contact” score represents a lower quality of interaction (contact without care).

Open field test

Adult male and female rats were tested. Tests were performed from 09:00 to 13:00 h. The open field consisted of a circular open arena (diameter: 78 cm) with floor divided into 25 parts. An acrylic wall of 36 cm high bordered the field. The animals were filmed directly and continuously for 5 minutes on two consecutive days (training and test sessions). The open field was cleaned after each trial with 70% ethanol. Afterwards, films were scored using OpenFLD v1.0 software (available at <http://blog.sbneec.org.br/2010/07/software-gratuitos-para-analise-do-labirinto-em-cruz-elevado-e-campo-aberto/>), by the same observer blind to the neonatal intervention. The following behavioral components were measured: locomotion (the number of line crossings), rearing (standing upright on the hind legs), grooming and the time spent in central zone.

Plus maze test

Adult males and diestrous females were tested (Marcondes *et al.*, 2001, Severino *et al.*, 2004). Tests occurred between 10:00 and 13:00 h. In the case of females, estrous cycle phases were determined by vaginal smearing every morning between 08:00 and 09:00 h, starting a week before the test. On the day of the test, the estrous cycle was confirmed 1h previously to the exposure to the apparatus. All animals were transferred to the observational room, with red light illumination, and were allowed to habituate for 30 minutes. The elevated plus maze apparatus was made of wood and consisted of two opposed open arms (50 x 10 cm), two opposed enclosed arms with no roof (50 x 10 x 40 cm), and an open square (10 x 10 cm) in the center. The maze was elevated 64 cm above the floor. The animal was placed in the center of the plus-maze, facing one of the open arms, and remained in the apparatus for five minutes, being continuously filmed during this period. The plus maze was cleaned after each trial with 70% ethanol. Films were scored using PlusMZ v1.0 software (see above), by the

same observer blind to the neonatal intervention. The number of entries, the time spent in open or enclosed arms and the frequency of head dips were analyzed.

Blood collection, brain and abdominal fat dissection

One day after the last behavioral test, animals were decapitated following 4 h of fasting. Trunk blood was collected into heparinized tubes for BDNF determination. The tubes were centrifuged and plasma was separated and frozen at -80°C until the day of analysis. The brain was quickly removed and flash frozen in isopentane and stored at -80°C until assayed. The two major portions of abdominal fat (gonadal and retroperitoneal adipose tissue depots) were dissected and weighed using a scale with a precision of 0.01g (Marte®). The results of abdominal fat were expressed as percentage of the total body weight.

BDNF determination

Plasma BDNF was measured by ELISA, using a commercial kit (ChemiKine™ Brain Derived Neurotrophic Factor (BDNF) Sandwich ELISA Kit, Millipore, USA), according to the manufacturer's instructions. The brains were sliced using an atlas (Swanson, 1998), and punches of the hippocampus, amygdala and periaqueductal gray were extracted. For determination of BDNF levels in these structures, samples were homogenized in Nuclear Extraction Buffer I (NEB1 - 10 mM HEPES, 10mM KCl, 0,1mM EDTA, 0,1mM EGTA, pH 7,9) with a protease inhibitor (100:1). Then, a detergent (NP40 1%) was added and the homogenate was centrifuged at 6000 rpm for 10 minutes at 4°C. The supernatant (cytosolic fraction) was used to determine BDNF levels by ELISA (ChemiKine™ Brain Derived Neurotrophic Factor (BDNF) Sandwich ELISA Kit, Millipore, USA), as previously described. The results were normalized by the total protein detected in the supernatant using a

commercial kit (Pierce® BCA Protein Assay Kit, Thermo Scientific, USA), according to the manufacturer's instructions. BDNF values were calculated as ng/mg protein.

Human studies:

A total of 2457 adolescents from a communitarian sample were studied. Detailed description of the study can be found elsewhere (Salum *et al.*, 2011). Briefly, all subjects investigated by the survey that were in the upper quartile of the Screen for Children and Anxiety Related Emotional Disorders scores (SCARED) (Isolan *et al.*, 2011) and a 10% random sample of the three remaining quartiles were selected for further evaluation. This study includes a sub-sample of 129 adolescents who completed the whole evaluation including psychiatric diagnosis and symptoms and genotyping. This protocol deliberately oversampling for anxiety was designed aiming to obtain adequate power to investigate the effects of anxiety, as well as internalizing symptoms and disorders. The Parental Bonding Instrument was used to assess patterns of care, overprotection and authoritarianism (Hauck *et al.*, 2006, Parker *et al.*, 1979, Seganfredo *et al.*, 2009). Blood samples were collected between 7:00 and 10:00 h after a fasting period of 10-12 hours, centrifuged for 5 minutes at 4,500 rpm and serum samples were stored at -80C until analysis. All BDNF measurements were performed in the same day by sandwich-ELISA using monoclonal antibodies specific for BDNF (R&D Systems, Minneapolis, Minnesota), according to the manufacturer's instructions. DNA was extracted from biological samples of saliva using the DNA 2006 Oragene® Kit (Laboratory Protocol for Manual Purification of DNA from 4.0mL of Oragene® DNA saliva). The BDNF genotyping for Val66Met polymorphism was based on the technique described by Ribases (Ribases *et al.*, 2004) and divided the individuals into Met carrier and non Met carrier. Ethical approval was obtained at the ethical committee of Hospital de Clínicas de Porto Alegre (GPPG/HCPA, project number 08-017).

Statistical analysis

For the rat studies, data were analyzed by one-way ANOVA, using group as factor (maternal behavior), two-way ANOVA, using group and sex as factors (open field test, plus maze test, BDNF analysis, abdominal fat and BDNF levels) and repeated measures ANOVA, using group and sex as factors (body weight and chow consumption) to compare the experimental groups. When an effect of litter size was found, this was used as a co-variable (maternal behavior, body weight, chow consumption and abdominal fat). Chi-Square was used to compare the experimental groups in the occurrence or not of grooming behavior during the Open Field test. Pearson correlation using maternal care and BDNF levels were performed. Sample size varies in each experiment and is shown individually in Results.

For human studies, Pearson correlations using the domains of Warmth, Overprotection and Authoritarianism on the PBI and the different SCARED scores (separation anxiety, social phobia, school phobia, generalized anxiety and panic symptoms) were performed. Studies in humans have found that the Val66Met polymorphism can be an important moderator in the association between early stressors and serum BDNF levels (Elzinga *et al.*, 2011). Therefore, data was splitted according to the BDNF Val66Met polymorphism and Pearson correlations were performed between the PBI scores and serum BDNF values.

Data were analyzed with Statistical Package for the Social Sciences (SPSS) version 18.0 (SPSS Inc., IBM Company, Chicago, EUA). Significance levels for all measures were set at $p < 0.05$.

RESULTS

Rat studies:

Maternal behavior

The mean duration of licking and grooming (LG) was similar between the control and intervention group, however the standard deviation was 2.7 times lower in the intervention group. Dams of the intervention group spent more time nursing her pups, mainly due to a greater duration of arched-back nursing in the lower, less efficient positions (1 and 2) [F(1,14)=16.67, p=0.001]. The percentage of time that intervention dams were off the nest was shorter [F(1,14)=10.57, p=0.006], however they spent more time in the nest without nursing or performing LG, resulting in a longer contact time without care in this group [F(1,14)=5.30, p=0.037] (Table 1).

Body weight, chow consumption and abdominal fat

Repeated measures ANOVA, using group and sex as factors and litter size as a co-variable, showed an effect of time in body weight [F (7,630)=652.63, p<0.0001] and chow consumption [F (4,136)=50.54, p<0.0001], as well as an effect of sex in both [body weight - F(1,90)=305.91, p<0.0001 / chow consumption - F(1,34)=144.27, p<0.0001]. Also an effect of the litter size was observed in body weight [F(1,90)=47.49, p<0.0001] and in chow consumption [F(1,34)=16.44, p<0.0001], in which pups born in larger litters were lighter and consumed less chow. In addition, there was an effect of the group [F(1,34)=11.22, p=0.002] in chow consumption, showing that the intervention group consumed less chow than controls, but this effect was not observed in body weight [F(1,90)=3.30, p=0.073] (Figure 1).

The analysis of abdominal fat as a percentage of the total body weight, by two-way ANOVA, using group and sex as factors and litter size as a co-variable, showed an effect of the litter size in the total of abdominal fat [F(1,56)=12.13, p=0.001], in which animals from larger litters had a smaller percentage of abdominal fat. However, the percentage of total

abdominal fat in control males (2.19 ± 0.74), intervention males (1.89 ± 0.41), control females (1.91 ± 0.54) and intervention females (1.90 ± 0.64), did not differ.

Behavioral responses

Open Field Test

Analyzing the open field test by two-way ANOVA, using group and sex as factors, it was not observed differences between groups in the time spent in central zone [$F(1,55)=0.90$, $p=0.346$], number of line crossings [$F(1,55)=1.26$, $p=0.267$], frequency of rearing [$F(1,55)=0.64$, $p=0.428$], and frequency of grooming ($p=0.206$) (data not shown).

Plus Maze Test

Two-Way ANOVA, using group and sex as factors, showed an interaction between group and sex in three variables: time spent in open arms [$F(1,57)=5.75$, $p=0.020$], number of entries in open arms [$F(1,57)=4.02$, $p=0.050$] and time spent in enclosed arms [$F(1,57)=10.61$, $p=0.002$], revealing a higher anxiety-like behavior in males of the intervention group that spent less time and entered less frequently in the open arms. There were no effects or interaction when analyzing the number of entries in the enclosed arms. An effect of group was observed in the frequency of head dips [$F(1,57)=7.94$, $p=0.007$], showing that the intervention was associated with a lower frequency of head dips in both sexes (Table 2).

Brain-Derived Neurotrophic Factor (BDNF)

When evaluating plasma BDNF levels, by two-way ANOVA, using group and sex as factors, it was observed that the intervention was associated with higher BDNF levels [$F(1,22)=4.79$, $p=0.040$]. There was no effect of sex, neither interaction (Figure 2).

When investigating if low quality maternal care was correlated with adult peripheral BDNF in rats, it was found a positive correlation between plasma BDNF levels and pure contact (contact without care) ($r=0.512$; $p=0.008$), in which the more pure contact it was observed in the neonatal period, the higher plasma BDNF levels were found in adult life.

The analysis of BDNF levels in the brain structures showed an effect of sex in hippocampus [$F(1,15)=9.52$, $p=0.008$] and in periaqueductal gray [$F(1,21)=22.5$, $p<0.001$], being higher the BDNF levels in these structures in males. There were no other effects or interaction between variables, as shown in table 3.

Human studies:

There were 89 girls and 40 boys in the sample, but no differences in the mean SCARED score were seen between the two sexes (mean+SD was $32.49+11.00$ among boys and $33.27+12.12$ in girls, Student's T Test, $p=0.732$).

Negative correlations between maternal warmth on the PBI and the SCARED scores for separation anxiety ($r=-0.222$; $p=0.012$), social phobia ($r=-0.200$; $p=0.023$) and school phobia ($r=-0.221$; $p=0.012$) were found, in which the less maternal warmth was reported on the PBI, the more anxiety symptoms were reported on the SCARED. There were no correlations between maternal warmth with generalized anxiety ($p=0.479$) or panic symptoms ($p=0.575$). Moreover, there were no other correlations between the other maternal PBI measurements (overprotection and authoritarianism) with the SCARED (data not shown).

When we split the data considering the BDNF Val66Met polymorphism absence or presence for further analysis there is a positive correlation between the PBI maternal overprotection score (an indicative of a more negative value in the earlier parental interactions) and the serum BDNF values ($r=0.417$, $p=0.022$) in the Met carriers (Val/Met and

Met/Met) individuals. This association was not found among the non-Met carriers ($r=0.039$, $p=0.765$). Please see figure 3.

DISCUSSION

In this study it was shown that, in rats, an early life intervention that alters the relationship between the mother and the pups is associated with anxiety and increased peripheral BDNF in adult life. Moreover, the degree by which the genitors demonstrate low quality maternal care correlates positively with the plasma BDNF levels in the adult rat offspring. Interestingly, similar associations were found in our cohort of adolescents, especially for those BDNF Met carriers.

Regarding maternal care, it was observed that the control group showed the well described normal distribution of the LG score (Champagne *et al.*, 2003), which correlates with endocrine responses to acute stress in adulthood (Liu *et al.*, 1997). On the other hand, the intervention seems to have affected the variance of the LG score, concentrating it to a certain level, and was associated with an increased time spent in lower arched back postures, which are less efficient considering the milk let-down (Lonstein *et al.*, 1998). The intervention also lead to an increased time spent in pure contact with the pups (without LG or nursing), which suggests a lower quality of maternal care performed by these dams.

Interestingly, this intervention was associated with the development of adult anxiety in the rat offspring. Similarly, in the human cohort described here, low maternal care scores in the PBI predicted higher levels of anxiety symptoms measured by the SCARED, similarly to what was originally described by Parker (1979) and others (Enns *et al.*, 2002). Another recent clinical study using the PBI equally shows that whereas low and high maternal care groups exhibit similarly low responses to acute stress, there are increased levels of depression and anxiety in the low care group (Engert *et al.*, 2010).

Besides that, Parker also proposes that maternal overprotection is associated with low, rather than with high maternal care (Parker & Lipscombe, 1981), which appears to be in congruence with our findings. The increased time spent in “pure contact” seen in the intervention group could be interpreted as a behavior related to maternal focus on controlling the nest’s physical needs (e.g. temperature maintenance) (Sokoloff & Blumberg, 1997, Stern & Johnson, 1990), rather than really caring for the pups. It is noteworthy that this behavior correlates with peripheral measures of BDNF in adulthood, as did the PBI overprotection scores in the human cohort BDNF Met carriers. That is, a rigidly controlled type of mothering seems to be associated with increased peripheral BDNF levels and anxiety later in life.

Similarly to what was described here, a very recent study shows that decreased maternal care assessed by the PBI correlates with increased harm avoidance and decreased self-directedness in healthy adult subjects, and for both personality traits the partial correlation coefficient was highest in the Met/Met genotype group, suggesting that the BDNF Val66Met polymorphism modulates the effects of parental rearing on these personality traits (Suzuki *et al.*, 2011). Others have shown that BDNF Met carriers exposed to early life stress have elevated neuroticism and higher anxiety, as well as smaller hippocampal and amygdala volumes (Gatt *et al.*, 2009). Therefore, as this study reports that the effect of maternal overprotection in the peripheral BDNF levels is evident only in the BDNF Met carriers, it is in accordance with the literature that suggests an increased vulnerability of this gene variant to environmental influences (Colzato *et al.*, 2011). The same way, in rodents, it was shown that a null mutation in the mouse BDNF gene moderates the long-term effect of maternal care on innate anxiety behavior (Carola & Gross, 2010), supporting the role of this neurotrophic factor in the development of adult anxiety.

The BDNF (Val66Met) Met variant is associated with a functional alteration, in which there is a decrease in intracellular trafficking and activity-dependent secretion of BDNF (Egan

et al., 2003). It is possible that the increased peripheral BDNF levels in these individuals in response to early adversity is a way to compensate for a functional deficit in this system, as BDNF is a key protein in maintaining neuronal integrity. In animal models, however, some studies describe that intra-hippocampal infusions of BDNF induces an anxiogenic-like activity (Deltheil *et al.*, 2009). Interestingly, in our animal model, although the intervention was associated with anxiety in the EPM paradigm, there were no differences in the BDNF central measurements (hippocampus, amygdala and periaqueductal gray). We cannot exclude, though, a possible dysfunctional activity at the receptor level in our model. Others have shown that early maltreatment in rodents produces persisting epigenetic changes in BDNF DNA, altering the BDNF gene expression in the adult prefrontal cortex (Roth *et al.*, 2009). In addition, deletion of TrkB in newborn neuron results in enhanced anxiety-like behavior in adult mice (Bergami *et al.*, 2008), as well as attenuated anxiety-like behavior is seen in mice overexpressing this receptor (Koponen *et al.*, 2004).

In any way, in both the experimental and the clinical studies reported here, early adversity leading to altered maternal care was associated with increased BDNF peripheral levels. This may be due to an adapting response associated to the exposure to an acute stressor in a vulnerable period of life (Bücker *et al.*, 2010, Grassi-Oliveira *et al.*, 2008a, Hauck *et al.*, 2010), persistently altering the baseline BDNF production and increasing BDNF levels. It is possible that, as these individuals age or face other stressful situations or diseases during the life-course, their resilience will be dampened for having chronically “wasted” their resources, or for having less biological capacity to respond to these insults. Therefore, it would make sense that peripheral BDNF is classically decreased in different psychopathologies such as major depression (Grassi-Oliveira *et al.*, 2008b) and bipolar disorder (Kauer-Sant'anna *et al.*, 2007) when these diseases are associated with childhood trauma.

This paper adds to the literature of research aiming to find biological correlates for the effects of early environmental factors on mental health. It offers an extremely interesting opportunity to provide links between clinical and experimental research and is the first translational approach considering the impact of early adversity in anxiety and in peripheral BDNF levels in adult life. We recognize this as a strength, as well as the consistency of the animal model (different cohorts were statistically comparable in the several components of maternal behavior). We were also careful to consistently check the female's estrous cycle before the plus maze test, as it is documented that female hormonal changes can interfere with anxiety-like behavior (Marcondes *et al.*, 2001). Nevertheless, this study also has some limitations. For instance, the correlations observed between maternal care and anxiety symptoms in humans are significant, but modest. However, they are pretty much in accordance to the animal data. In addition, the SCARED is a screening tool, and not diagnostic for anxiety, and we could not consider the potential confounders in the human analysis because of the small sample size, that was oversampled for girls although the mean SCARED score was not different between the two sexes. Despite these limitations it was still possible to highlight similarities between the two species, which strengthens their validity. It is important to add that we are still very far to comprehend the specificities and complexities of the anxiety-like behaviors and certainly a complete inter-species overlap it was not expected a priori. On the other hand similar correlates with similar measures provide a prolific framework for experimentation in clinically poised research questions.

In conclusion, our study contributes to the body of evidence showing that an early trauma that impacts the mother/offspring relationship is associated with adult anxiety and increased peripheral BDNF levels, both in a rodent model and in a human cohort. In accordance to the findings reported here, successful cognitive-behavioral therapy for generalized anxiety disorder in humans increases NGF serum concentrations (Jockers-

Scherubl *et al.*, 2007), suggesting that peripheral levels of neurotrophin could serve as a biomarker for this affective disorder. The translational approach employed in this study was successful and we propose the rodent model described here as a useful tool to investigate other mechanisms by which early adversity altering the maternal behavior is linked to adult psychopathology.

REFERENCES

Balon, R. (2006) Mood, anxiety, and physical illness: body and mind, or mind and body? *Depress Anxiety*, **23**, 377-387.

Bergami, M., Rimondini, R., Santi, S., Blum, R., Gotz, M. & Canossa, M. (2008) Deletion of TrkB in adult progenitors alters newborn neuron integration into hippocampal circuits and increases anxiety-like behavior. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **105**, 15570-15575.

Bücker, J., Kapczinski, F., Kapczinski, N.S., Cereser, K.M., Post, R., Szobot, C., Pfaffenseller, B., Magalhães, P. & Kauer-Santanna, M. (2010) Aumento dos níveis de fator neurotrófico derivado do cérebro e psicopatologia em crianças com trauma quando comparadas a controles. *XXVIII Congresso Brasileiro de Psiquiatria*. Revista Brasileira de Psiquiatria, Fortaleza, p. S61.

Carola, V. & Gross, C. (2010) BDNF moderates early environmental risk factors for anxiety in mouse. *Genes Brain Behav*, **9**, 379-389.

Champagne, F.A., Francis, D.D., Mar, A. & Meaney, M.J. (2003) Variations in maternal care in the rat as a mediating influence for the effects of environment on development. *Physiol Behav*, **79**, 359-371.

Chen, Z.Y., Jing, D., Bath, K.G., Ieraci, A., Khan, T., Siao, C.J., Herrera, D.G., Toth, M., Yang, C., McEwen, B.S., Hempstead, B.L. & Lee, F.S. (2006) Genetic variant BDNF (Val66Met) polymorphism alters anxiety-related behavior. *Science*, **314**, 140-143.

Colzato, L.S., Van der Does, A.J., Kouwenhoven, C., Elzinga, B.M. & Hommel, B. (2011) BDNF Val(66)Met polymorphism is associated with higher anticipatory cortisol stress response, anxiety, and alcohol consumption in healthy adults. *Psychoneuroendocrinology*.

Deltheil, T., Tanaka, K., Reperant, C., Hen, R., David, D.J. & Gardier, A.M. (2009) Synergistic neurochemical and behavioural effects of acute intrahippocampal injection of brain-derived neurotrophic factor and antidepressants in adult mice. *Int J Neuropsychopharmacol*, **12**, 905-915.

Egan, M.F., Kojima, M., Callicott, J.H., Goldberg, T.E., Kolachana, B.S., Bertolino, A., Zaitsev, E., Gold, B., Goldman, D., Dean, M., Lu, B. & Weinberger, D.R. (2003) The BDNF val66met polymorphism affects activity-dependent secretion of BDNF and human memory and hippocampal function. *Cell*, **112**, 257-269.

- Elzinga, B.M., Molendijk, M.L., Oude Voshaar, R.C., Bus, B.A., Prickaerts, J., Spinhoven, P. & Penninx, B.J. (2011) The impact of childhood abuse and recent stress on serum brain-derived neurotrophic factor and the moderating role of BDNF Val66Met. *Psychopharmacology (Berl)*, **214**, 319-328.
- Engert, V., Efanov, S.I., Dedovic, K., Duchesne, A., Dagher, A. & Pruessner, J.C. (2010) Perceived early-life maternal care and the cortisol response to repeated psychosocial stress. *J Psychiatry Neurosci*, **35**, 370-377.
- Enns, M.W., Cox, B.J. & Clara, I. (2002) Parental bonding and adult psychopathology: results from the US National Comorbidity Survey. *Psychol Med*, **32**, 997-1008.
- Gatt, J.M., Nemeroff, C.B., Dobson-Stone, C., Paul, R.H., Bryant, R.A., Schofield, P.R., Gordon, E., Kemp, A.H. & Williams, L.M. (2009) Interactions between BDNF Val66Met polymorphism and early life stress predict brain and arousal pathways to syndromal depression and anxiety. *Mol Psychiatry*, **14**, 681-695.
- Grassi-Oliveira, R., Ashy, M. & Stein, L.M. (2008a) Psychobiology of childhood maltreatment: effects of allostatic load? *Rev Bras Psiquiatr*, **30**, 60-68.
- Grassi-Oliveira, R., Stein, L.M., Lopes, R.P., Teixeira, A.L. & Bauer, M.E. (2008b) Low plasma brain-derived neurotrophic factor and childhood physical neglect are associated with verbal memory impairment in major depression--a preliminary report. *Biol Psychiatry*, **64**, 281-285.
- Hashimoto, K., Shimizu, E. & Iyo, M. (2004) Critical role of brain-derived neurotrophic factor in mood disorders. *Brain Res Brain Res Rev*, **45**, 104-114.
- Hauck, S., Kapczinski, F., Roesler, R., de Moura Silveira, E., Jr., Magalhaes, P.V., Kruel, L.R., Schestatsky, S.S. & Ceitlin, L.H. (2010) Serum brain-derived neurotrophic factor in patients with trauma psychopathology. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*, **34**, 459-462.
- Hauck, S., Schestatsky, S., Terra, L., Knijnik, L., Sanchez, P. & Ceitlin, L. (2006) Adaptação transcultural para o português brasileiro do Parental Bonding Instrument (PBI). *Rev Psiquiatr*, **28**, 162-168.
- Horesh, N., Amir, M., Kedem, P., Goldberger, Y. & Kotler, M. (1997) Life events in childhood, adolescence and adulthood and the relationship to panic disorder. *Acta Psychiatr Scand*, **96**, 373-378.
- Isolan, L., Salum, G.A., Osowski, A.T., Amaro, E. & Manfro, G.G. (2011) Psychometric properties of the Screen for Child Anxiety Related Emotional Disorders (SCARED) in Brazilian children and adolescents. *J Anxiety Disord*, **25**, 741-748.
- Ivy, A.S., Brunson, K.L., Sandman, C. & Baram, T.Z. (2008) Dysfunctional nurturing behavior in rat dams with limited access to nesting material: a clinically relevant model for early-life stress. *Neuroscience*, **154**, 1132-1142.
- Jockers-Scherubl, M.C., Zubraegel, D., Baer, T., Linden, M., Danker-Hopfe, H., Schulte-Herbruggen, O., Neu, P. & Hellweg, R. (2007) Nerve growth factor serum concentrations rise

after successful cognitive-behavioural therapy of generalized anxiety disorder. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*, **31**, 200-204.

Kandel, E.R. (1999) Biology and the future of psychoanalysis: a new intellectual framework for psychiatry revisited. *Am J Psychiatry*, **156**, 505-524.

Kauer-Sant'Anna, M., Tramontina, J., Andreazza, A.C., Cereser, K., da Costa, S., Santin, A., Yatham, L.N. & Kapczinski, F. (2007) Traumatic life events in bipolar disorder: impact on BDNF levels and psychopathology. *Bipolar Disord*, **9 Suppl 1**, 128-135.

Koponen, E., Voikar, V., Riekkii, R., Saarelainen, T., Rauramaa, T., Rauvala, H., Taira, T. & Castren, E. (2004) Transgenic mice overexpressing the full-length neurotrophin receptor trkB exhibit increased activation of the trkB-PLCgamma pathway, reduced anxiety, and facilitated learning. *Mol Cell Neurosci*, **26**, 166-181.

Liu, D., Diorio, J., Tannenbaum, B., Caldji, C., Francis, D., Freedman, A., Sharma, S., Pearson, D., Plotsky, P.M. & Meaney, M.J. (1997) Maternal care, hippocampal glucocorticoid receptors, and hypothalamic-pituitary-adrenal responses to stress. *Science*, **277**, 1659-1662.

Lonstein, J.S., Simmons, D.A. & Stern, J.M. (1998) Functions of the caudal periaqueductal gray in lactating rats: kyphosis, lordosis, maternal aggression, and fearfulness. *Behav Neurosci*, **112**, 1502-1518.

Lyons, W.E., Mamounas, L.A., Ricaurte, G.A., Coppola, V., Reid, S.W., Bora, S.H., Wihler, C., Koliatsos, V.E. & Tessarollo, L. (1999) Brain-derived neurotrophic factor-deficient mice develop aggressiveness and hyperphagia in conjunction with brain serotonergic abnormalities. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **96**, 15239-15244.

Manfro, G.G., Otto, M.W., McArdle, E.T., Worthington, J.J., 3rd, Rosenbaum, J.F. & Pollack, M.H. (1996) Relationship of antecedent stressful life events to childhood and family history of anxiety and the course of panic disorder. *J Affect Disord*, **41**, 135-139.

Marcondes, F.K., Miguel, K.J., Melo, L.L. & Spadari-Bratfisch, R.C. (2001) Estrous cycle influences the response of female rats in the elevated plus-maze test. *Physiol Behav*, **74**, 435-440.

Parker, G. (1979) Reported parental characteristics in relation to trait depression and anxiety levels in a non-clinical group. *Aust N Z J Psychiatry*, **13**, 260-264.

Parker, G. & Lipscombe, P. (1981) Influences of maternal overprotection. *Br J Psychiatry*, **138**, 303-311.

Parker, G., Tupling, H. & Brown, L. (1979) A Parental Bonding Instrument. *British Journal of Medical Psychology*, **52**, 1-10.

Ribases, M., Gratacos, M., Fernandez-Aranda, F., Bellodi, L., Boni, C., Anderluh, M., Cavallini, M.C., Cellini, E., Di Bella, D., Erzegovesi, S., Foulon, C., Gabrovsek, M., Gorwood, P., Hebebrand, J., Hinney, A., Holliday, J., Hu, X., Karwautz, A., Kipman, A., Komel, R., Nacmias, B., Remschmidt, H., Ricca, V., Sorbi, S., Wagner, G., Treasure, J., Collier, D.A. & Estivill, X. (2004) Association of BDNF with anorexia, bulimia and age of onset of weight loss in six European populations. *Hum Mol Genet*, **13**, 1205-1212.

- Rice, C.J., Sandman, C.A., Lenjavi, M.R. & Baram, T.Z. (2008) A novel mouse model for acute and long-lasting consequences of early life stress. *Endocrinology*, **149**, 4892-4900.
- Roth, T.L., Lubin, F.D., Funk, A.J. & Sweatt, J.D. (2009) Lasting epigenetic influence of early-life adversity on the BDNF gene. *Biol Psychiatry*, **65**, 760-769.
- Rutter, M. (2006) Implications of resilience concepts for scientific understanding. *Ann N Y Acad Sci*, **1094**, 1-12.
- Salum, G.A., Isolan, L.R., Bosa, V.L., Tocchetto, A.G., Teche, S.P., Schuch, I., Costa, J.R., Costa Mde, A., Jarros, R.B., Mansur, M.A., Knijnik, D., Silva, E.A., Kieling, C., Oliveira, M.H., Medeiros, E., Bortoluzzi, A., Toazza, R., Blaya, C., Leistner-Segal, S., Salles, J.F., Silveira, P.P., Goldani, M.Z., Heldt, E. & Manfro, G.G. (2011) The multidimensional evaluation and treatment of anxiety in children and adolescents: rationale, design, methods and preliminary findings. *Rev Bras Psiquiatr*, **33**, 181-195.
- Seganfredo, A.C., Torres, M., Salum, G.A., Blaya, C., Acosta, J., Eizirik, C. & Manfro, G.G. (2009) Gender differences in the associations between childhood trauma and parental bonding in panic disorder. *Rev Bras Psiquiatr*, **31**, 314-321.
- Severino, G.S., Fossati, I.A., Padoin, M.J., Gomes, C.M., Trevizan, L., Sanvitto, G.L., Franci, C.R., Anselmo-Franci, J.A. & Lucion, A.B. (2004) Effects of neonatal handling on the behavior and prolactin stress response in male and female rats at various ages and estrous cycle phases of females. *Physiol Behav*, **81**, 489-498.
- Sokoloff, G. & Blumberg, M.S. (1997) Thermogenic, respiratory, and ultrasonic responses of week-old rats across the transition from moderate to extreme cold exposure. *Dev Psychobiol*, **30**, 181-194.
- Stern, J.M. & Johnson, S.K. (1990) Ventral somatosensory determinants of nursing behavior in Norway rats. I. Effects of variations in the quality and quantity of pup stimuli. *Physiol Behav*, **47**, 993-1011.
- Suzuki, A., Matsumoto, Y., Shibuya, N., Sadahiro, R., Kamata, M., Goto, K. & Otani, K. (2011) The brain-derived neurotrophic factor Val66Met polymorphism modulates the effects of parental rearing on personality traits in healthy subjects. *Genes Brain Behav*, **10**, 385-391.
- Swanson, L. (1998) *Brain maps: Structure of the rat brain.*, Elsevier.
- Weaver, I.C. (2009) Shaping adult phenotypes through early life environments. *Birth Defects Res C Embryo Today*, **87**, 314-326.

ACKNOWLEDGEMENTS

Financial support from PRONEX 2009, FAPERGS/CNPq 10/0018.3, Projeto IVAPSA – Impacto das Variações do Ambiente Perinatal sobre a Saúde do Adulto; Universal National Counsel of Technological and Scientific Development (CNPq) – Brazil 14/2009; FIPE/HCPA

and Foundation for the Coordination of Higher Education and graduate Training (CAPES) - Brazil.

TABLES

Table 1 – Comparison between means of variables related to maternal care.

Variables	Control (n=8)	Intervention (n=9)	p value
LG	8.06±2.02	8.73±0.73	0.630
Off the nest	44.01±5.48	35.24±2.76	0.006*
Pure contact ^a	5.66±2.38	7.43±2.85	0.037*
Arched-back nursing postures 1 e 2	32.86±6.97	40.76±5.85	0.001*
Arched-back nursing postures 3 e 4	11.73±4.70	11.53±4.96	0.635

One-Way ANOVA; litter size used as a co-variable; data are expressed as mean ± SD; *p<0.05
^apercent of time spent in contact without nursing and without LG, in other words, contact of low quality.

Table 2 – Variables analysed in the plus maze test, according to sex and group.

Variable	Males		Females	
	Control (n=9)	Intervention (n=19)	Control (n=18)	Intervention (n=15)
timeOA	116.1±39.08 ^a	74.5±30.93 ^b	89.5±41.73 ^a	92.4±26.59 ^a
timeEA	115.0±26.41 ^a	169.3±32.20 ^b	158.1±36.89 ^a	155.2±31.79 ^a
freqOA	6.2±2.68 ^a	4.6±2.14 ^b	5.5±2.17 ^a	6.5±2.53 ^a
freqEA	6.8±1.98	7.5±2.04	7.6±1.88	8.2±1.37
freqHD	14.2±4.79 ^a	10.9±3.45 ^b	12.0±4.20 ^a	9.3±3.84 ^b

Two-Way ANOVA; data are expressed as mean ± SD; ^{a,b}different letters mean statistically significant difference (p<0.05).

timeOA: time in open arms (s); timeEA: time in enclosed arms (s); freqOA: entries in open arms; freqEA: entries in enclosed arms; freqHD: frequency of head dips.

Table 3 – BDNF levels (ng/mg protein) in hippocampus (n=4-6), amygdala (n=5-7) e periaqueductal gray (n=5-7), according to sex and group.

Structures	Males		Females	
	Control	Intervention	Control	Intervention
HC	1.11±0.78 ^a	1.00±0.55 ^a	0.38±0.06 ^b	0.41±0.13 ^b
AMG	0.30±0.18	0.33±0.21	0.26±0.08	0.27±0.04
PAG	2.06±1.04 ^a	2.40±1.45 ^a	0.65±0.27 ^b	0.54±0.12 ^b

Two-Way ANOVA; data are expressed as mean ± SD; ^{a,b}different letters means statistically significant difference (p<0.05).

HC: hippocampus, AMG: amygdala, PAG: periaqueductal grey.

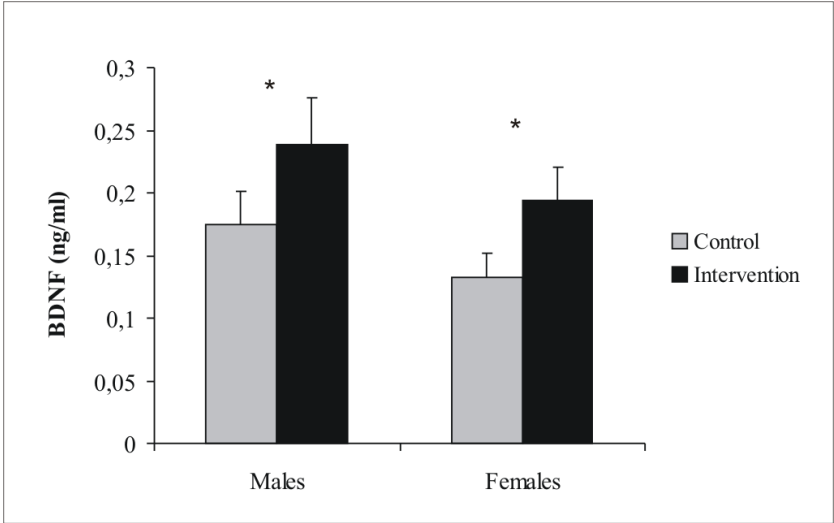
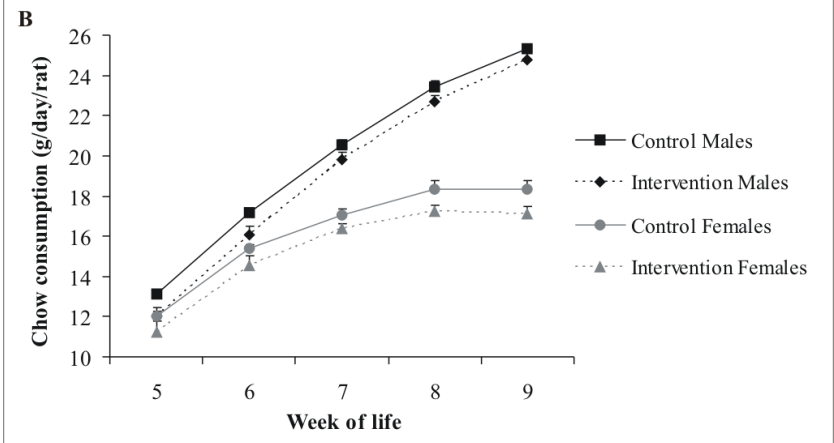
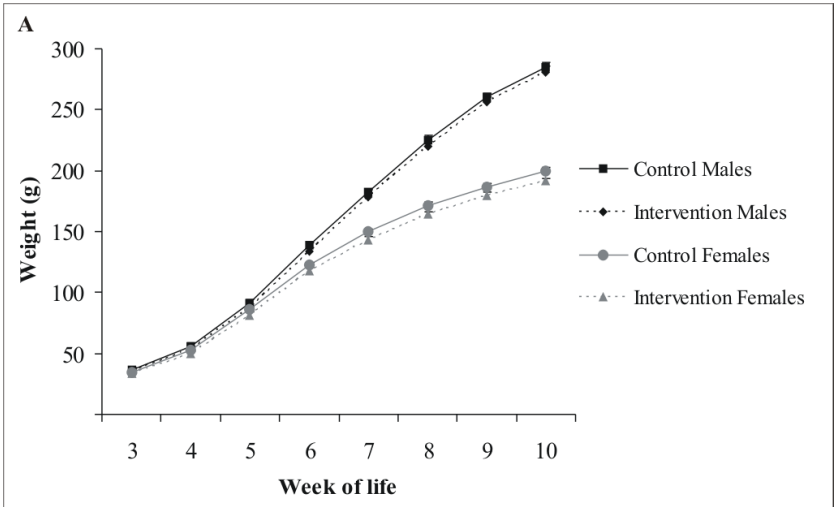
LEGENDS TO FIGURES

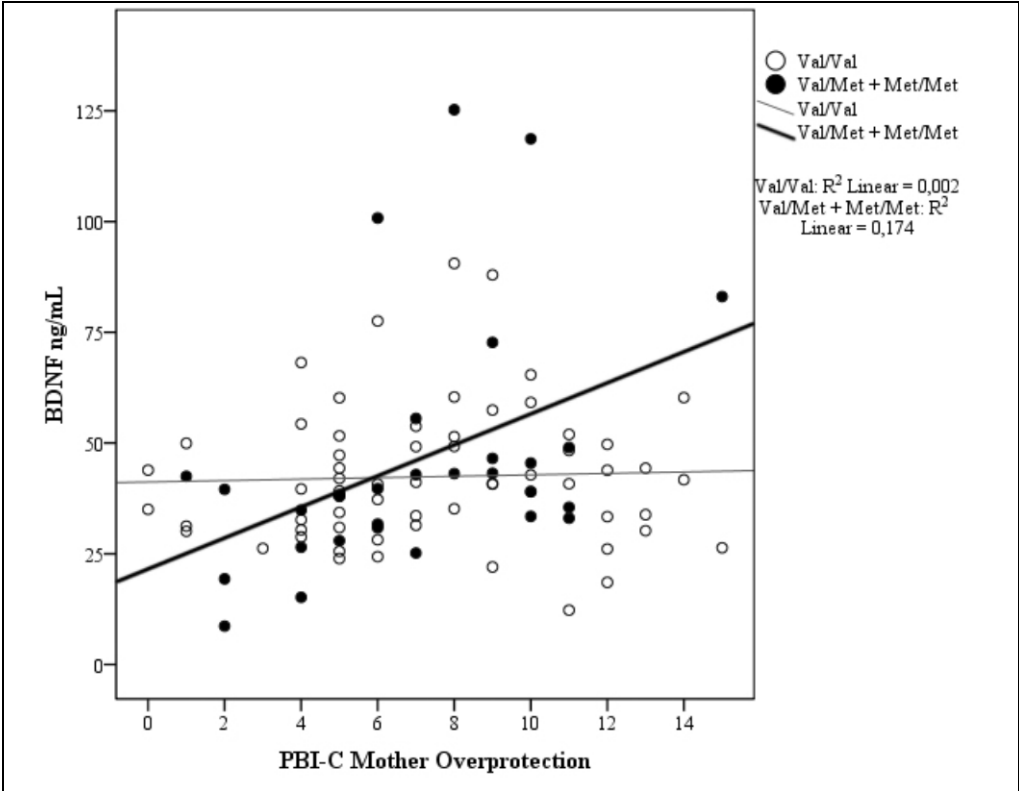
Figure 1 – (A) Body weight, eight weeks of follow-up after weaning, in control males (n=16), intervention males (n=28), control females (n=27) and intervention females (n=24). Data are expressed as mean ± SEM. Repeated measures ANOVA showed an effect of time (p<0.0001) and sex (p<0.0001). (B) Chow consumption, from 5th to 9th week of life, in control males (n=7 cages), intervention males (n=11 cages), control females (n=10 cages) and intervention females (n=11 cages). Data are expressed as mean ± SEM. Repeated measures ANOVA showed an effect of time (p<0.0001) sex (p<0.0001) and group (p=0.002).

Figure 2 – BDNF plasma levels in control males (n=6), intervention males (n=7), control females (n=7) and intervention females (n=6). Data are expressed as mean ± SEM. Two-way ANOVA showed an effect of group (p=0.040).

Figure 3 – Correlations between PBI maternal overprotection score and serum BDNF values in Met (n=30) and non-Met carriers (n=62).

FIGURES





ANEXO B – ARTIGO (VERSÃO EM PORTUGUÊS)**Origens desenvolvimentistas da ansiedade: evidências translacionais de correlatos biológicos associando o cuidado materno e comportamentos ansiosos.**

Título abreviado: Evidência translacional para as origens desenvolvimentistas da ansiedade.

Autores: Roberta Dalle Molle¹, André Krumel Portella¹, Marcelo Zubaran Goldani¹, Flávio Pereira Kapczinski², Sandra Leistner-Segala³, Giovanni Abrahão Salum², Gisele Gus Manfro², Patrícia Pelufo Silveira¹

1. Núcleo de Estudos da Saúde da Criança e do Adolescente (NESCA), Faculdade de Medicina, Hospital de Clínicas de Porto Alegre. UFRGS, Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brasil.
2. Programa de Pós-Graduação em Ciências Médicas: Psiquiatria. Faculdade de Medicina, Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Universidade Federal do Rio Grande do Sul.
3. Serviço de Genética Médica, Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Brasil.

Autor para correspondência: Roberta Dalle Molle

Departamento de Pediatria e Puericultura–FAMED-Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Ramiro Barcelos, 2350, Largo Eduardo Zaccaro Faraco. 90035-903, Porto Alegre, RS, Brasil. Telefone: 051- 3359-8019. Fax: 051- 3359-8001. E-mail: betinha_dm@yahoo.com

Palavras-chave: ansiedade, origens desenvolvimentistas da saúde e da doença, trauma precoce, comportamento materno, fator neurotrófico derivado do encéfalo.

Número de palavras

Resumo: 248

Introdução: 461

Discussão: 1340

Data da submissão: 09/08/2011

RESUMO

Introdução: Em humanos e outros mamíferos um ambiente adverso no início da vida está associado à ansiedade e outras psicopatologias. O fator neurotrófico derivado do encéfalo (BDNF) é sensível a este ambiente e pode ser um marcador de alterações cerebrais. Nós investigamos estas associações em um modelo animal e em uma amostra de adolescentes.

Metodologia: As genitoras e suas ninhadas foram divididas em grupo intervenção (com redução do material disponível para a confecção do ninho), ou grupo controle. O comportamento materno foi observado do dia 1 ao dia 9 de vida. Na vida adulta, os ratos foram submetidos a testes comportamentais e avaliação da quantidade de BDNF no plasma, hipocampo, amígdala e substância cinzenta periaquedutal. Em humanos, 129 adolescentes com sintomas ansiosos, avaliados pela escala *Screen for Children and Anxiety Related Emotional Disorders* (SCARED), responderam ao *Parental Bonding Instrument* (PBI), coletaram sangue para avaliação do BDNF e foram genotipados para o polimorfismo Val66Met do BDNF.

Resultados: As genitoras do grupo intervenção demonstraram um maior contato de baixa qualidade com seus filhotes e, na vida adulta, a intervenção esteve associada com um maior comportamento do tipo ansioso e maiores níveis de BDNF plasmático. O contato de baixa qualidade se correlacionou positivamente com o BDNF periférico, mas não houve diferença na quantidade de BDNF central. Em humanos, observaram-se correlações negativas entre o cuidado materno caloroso e os escores para ansiedade de separação, fobia social e fobia escolar, e uma correlação positiva entre a superproteção materna e o BDNF sérico apenas nos indivíduos portadores do alelo Met.

Conclusão: O estresse precoce que altera a relação entre mãe-filhote tem impacto persistente sobre o comportamento do tipo ansioso e o BDNF plasmático. Achados similares foram encontrados em humanos. A abordagem translacional da questão evidenciou que os efeitos do trauma no início da vida podem ser mediados pelo cuidado materno, sendo o aumento do BDNF periférico um marcador em potencial para esses indivíduos.

INTRODUÇÃO

A ansiedade, assim como a depressão e outros transtornos de humor, pode contribuir significativamente para a incapacidade, morbidade e mortalidade (Balon, 2006). Eventos estressantes no início da vida, como o abuso e a negligência, têm sido associados com o desenvolvimento de ansiedade e transtornos de humor (Weaver, 2009). Apesar disso, poucos estudos têm investigado como os eventos estressantes podem deixar marcas persistentes (Rutter, 2006) tais como mudanças no cérebro, alterações nos processos psicológicos, emoções e comportamentos.

Ansiedade é uma emoção bastante conservada entre as espécies e intrinsecamente ligada à resposta ao estresse. A natureza e o “*timing*” dos eventos adversos precoces que podem ter seqüelas a longo prazo têm sido delineados em alguns modelos animais. Um estudo com ratas e suas ninhadas, baseado na diminuição do material para a construção do ninho, mostrou que essa intervenção influencia tanto a qualidade quanto a quantidade do cuidado materno, conseguindo transferir um importante elemento presente na negligência e abuso no início da vida em humanos para o modelo animal (Ivy *et al.*, 2008). Filhotes deste modelo apresentam maior nível plasmático de corticosterona associado a menor expressão de RNAm do hormônio liberador de corticotrofina (CRH) no núcleo paraventricular do hipotálamico (PVN). Estas alterações no eixo hipotálamo-hipófise-adrenal (HPA) permanecem até a vida adulta (Rice *et al.*, 2008), caracterizando anormalidades neuroendócrinas similares às encontradas na ansiedade. Além disso, o comportamento materno inadequado pode gerar registros na memória que predisõem a alterações neurobiológicas com repercussões no eixo HPA e hipocampo (Kandel, 1999).

A fisiopatologia dos transtornos de ansiedade é complexa. Nos últimos anos, embora de maneira inespecífica, o fator neurotrófico derivado do encéfalo (BDNF) tem surgido como um biomarcador em potencial para a ansiedade, assim como para outros transtornos

psiquiátricos como a depressão e os transtornos alimentares (Hashimoto *et al.*, 2004, Lyons *et al.*, 1999, Ribases *et al.*, 2004). O BDNF influencia na proliferação, diferenciação, morfologia e atividade funcional dos neurônios. Curiosamente, camundongos modificados geneticamente portadores do alelo Met do gene do BDNF, que reproduzem as características fenotípicas encontradas nos humanos, exibem um maior comportamento do tipo ansioso quando colocados em situações estressantes (Chen *et al.*, 2006), sugerindo associação entre a fisiologia desta neurotrofina e a patogênese dos transtornos de ansiedade. Além disso, o alelo Met está associado com uma pior memória episódica e uma ativação hipocampal anormal (Egan *et al.*, 2003).

Como o trauma no início da vida parece influenciar o risco para o desenvolvimento de psicopatologias (Horesh *et al.*, 1997, Manfro *et al.*, 1996) e os mecanismos fisiopatológicos que ligam o estresse ao comportamento ansioso são extremamente complexos, abordagens translacionais possibilitam a aplicação de conceitos adquiridos em experimentos com animais para gerar hipóteses e questões relevantes aos estudos clínicos. parecem ser muito úteis para se conseguir trabalhar com ambientes controlados e testar correlações significativas em estudos clínicos. Portanto, nosso objetivo foi investigar o desenvolvimento de ansiedade em um modelo animal de adversidade no início da vida, com impacto na qualidade do cuidado materno, assim como uma possível associação com os níveis centrais e periféricos de BDNF.

Além disso, buscando a relevância de nossos achados experimentais em seres humanos, nós investigamos associações similares em uma amostra de adolescentes.

METODOLOGIA

Estudo Experimental:

Ratas Wistar prenhas nulíparas, acasaladas na Unidade de Experimentação Animal do Hospital de Clínicas de Porto Alegre (UEA-HCPA), permaneceram em caixas-moradia individuais, especialmente desenvolvidas para este modelo animal, medindo 40cm x 40cm x 30cm, com assoalho de malha metálica (1cm x 1cm) que permitisse apenas a passagem das fezes e urina para um coletor localizado na parte inferior da caixa. Durante toda a gestação, as fêmeas foram mantidas nessas caixas-moradia com o assoalho recoberto com maravalha e em um ambiente controlado: ciclo claro/escuro de 10/14horas (luzes acendiam às 9:00h e apagavam às 19:00h), temperatura de $22 \pm 2^{\circ}\text{C}$, água e comida *ad libitum*.

O dia do nascimento dos filhotes foi considerado o Dia 0. O comportamento materno foi monitorado do dia 1 ao dia 9 de vida (ver detalhes abaixo). No dia 2, as fêmeas e suas ninhadas foram randomizadas para dois grupos (ver abaixo). No dia 10, as fêmeas e seus filhotes foram removidos para uma caixa-moradia padrão, medindo 46cm x 31cm x 16cm, com o assoalho recoberto com maravalha e mantidos no mesmo ambiente controlado citado acima.

No dia 21 de vida, os filhotes foram desmamados e separados por sexo em dois ou três por caixa-moradia e mantidos em um ambiente controlado similar ao descrito acima, exceto pelo ciclo claro/escuro (luzes acendiam às 7:00h e apagavam às 19:00h). No momento da limpeza das caixas-moradia, o peso corporal e consumo de ração padrão foram mensurados utilizando uma balança com precisão de 0,01g (Marte®).

As 17 ninhadas utilizadas para a observação do cuidado materno foram divididas em duas coortes e, ao comparar os componentes do cuidado materno entre as duas, não foram observadas diferenças estatísticas significativas (dados não apresentados). Noventa e cinco

ratos machos e fêmeas foram utilizados para os testes comportamentais iniciados no dia 60 de vida. Todos os procedimentos experimentais foram aprovados pelo Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital de Clínicas de Porto Alegre (GPPG/HCPA, número do projeto 09-527). Os testes foram realizados em salas comportamentais aclimatadas da Unidade de Experimentação Animal/HCPA.

Modelo de estresse neonatal

Grupo intervenção (ambiente neonatal hostil): seguindo os procedimentos descritos por Ivy *et al.* (2008), o grupo intervenção teve restrição do material para a confecção do ninho durante oito dias (do dia 2 ao dia 9 pós-natal). A restrição consistiu em remover a maravalha da caixa-moradia, no dia 2, sem tocar nos animais, e oferecer um total de apenas 2000 cm³ de papel toalha para a confecção de um ninho rudimentar neste período. A urina e as fezes dos animais se depositavam no coletor localizado na parte inferior da caixa, e o assoalho de malha metálica era, geralmente, conservado limpo pela genitora. Todas as ninhadas foram mantidas sem troca do papel toalha do dia 2 ao dia 9.

Grupo controle: no grupo controle as genitoras tiveram à sua disposição quantidade suficiente de maravalha para a construção do ninho (aproximadamente 7200 cm³). Todas as ninhadas foram mantidas com este volume de maravalha, sem troca de caixa-moradia do dia 2 ao dia 9.

Observações do cuidado materno

Seguindo os procedimentos descritos por Champagne *et al.* (2003), o comportamento materno de cada genitora foi observado diariamente em cinco períodos, de 72 minutos cada, do dia 1 ao dia 9 pós-natal. As observações ocorriam sempre nos mesmos horários, sendo três períodos durante a fase clara (10:00h, 13:00h, 17:00h) e dois períodos durante a fase escura

(07:00h e 20:00h). Em cada período de observação, o comportamento da genitora foi registrado a cada três minutos. Os seguintes comportamentos foram registrados: genitora dentro ou fora do ninho (isto é, em contato com mais da metade da ninhada), lambendo (LG) qualquer filhote, amamentando os filhotes tanto na posição em dorso arqueado quanto na posição passiva em que ela está deitada de lado ou de costas ao amamentar. As categorias comportamentais não são exclusivas, por exemplo, frequentemente a genitora lambia seus filhotes enquanto os amamentava. Os escores de cada comportamento foram calculados dividindo a frequência do comportamento pelo número total de observações. O escore do contato puro foi calculado a partir do escore do contato total com os filhotes, subtraindo desse valor o contato no momento da amamentação e o contato no momento da lambida. Sendo assim, o escore do contato puro representa uma interação de baixa qualidade (contato sem cuidado).

Teste do campo aberto

Machos e fêmeas adultos foram testados. Os treinos e os testes foram realizados das 9:00h às 13:00h. O campo aberto consiste em uma arena circular, medindo 78 cm de diâmetro, com assoalho dividido em 25 quadrantes, cercada por paredes de acrílico de 36 cm. Os movimentos dos animais no campo aberto foram filmados durante 5 minutos em dois dias consecutivos (treino e teste). Após cada teste, o aparato foi higienizado com álcool 70%. As filmagens foram, posteriormente, avaliadas com a utilização do software livre OpenFLD v1.0 (disponível em <http://blog.sbneec.org.br/2010/07/software-gratuitos-para-analise-do-labirinto-em-cruz-elevado-e-campo-aberto/>), por um observador cego para a intervenção neonatal. Os seguintes componentes comportamentais foram analisados: locomoção (número de linhas cruzadas), respostas de orientação (*rearing* - ficar em pé sobre as patas traseiras), *grooming* (auto-limpeza) e o tempo de permanência nos quadrantes centrais.

Teste do labirinto em cruz elevado

Machos e fêmeas adultos foram testados (Marcondes *et al.*, 2001, Severino *et al.*, 2004). Os testes ocorreram entre 10:00 e 13:00 h. No caso das fêmeas, o ciclo estral foi determinado por esfregaço vaginal todas as manhãs entre 8:00h e 9:00h, procedimento iniciado uma semana antes do teste. No dia do teste, a fase do ciclo (diestro) foi confirmada 1 hora antes da exposição ao aparato. Todos os animais foram transferidos para a sala observacional, iluminada com luz vermelha, 30 minutos antes do início do teste para que houvesse habituação ao local. Os testes ocorreram entre 10:00h e 13:00h. O aparato do labirinto em cruz elevado é feito de madeira, fica 64 cm elevado do chão, e possui: dois braços opostos abertos (50 X 10 cm), dois braços opostos fechados sem cobertura (50 X 10 X 40 cm), e um quadrado central aberto (10 X 10 cm). No momento do teste, o animal foi colocado no quadrado central do labirinto, olhando para um dos braços abertos, e deixado no aparato por cinco minutos, sendo filmado continuamente durante esse período. Após cada teste, o aparato foi higienizado com álcool 70%. Posteriormente, um observador cego para a intervenção neonatal avaliou as filmagens, utilizando o software livre PlusMZ v1.0 (ver disponibilidade acima). O número de entradas/tempo de permanência nos braços abertos e fechados e o número de mergulhos nos braços abertos foram analisados.

Coleta e armazenamento de tecidos

Um dia depois do último teste comportamental, os animais foram decapitados, após jejum de 4 horas. O sangue do tronco foi coletado em tubos heparinizados para determinação do BDNF. As amostras sanguíneas foram centrifugadas e o plasma separado e armazenado a -80°C até o dia das análises. O cérebro foi rapidamente removido e congelado, através de imersão no isopentano, e armazenado a -80°C. As duas maiores porções de gordura abdominal (gonadal e retroperitoneal) foram dissecadas e pesadas usando uma balança da

marca Marte® com precisão de 0,01g. Os resultados da quantidade de gordura abdominal foram calculados como percentual do peso corporal.

Determinação do BDNF

O BDNF plasmático foi avaliado por ELISA, usando o kit comercial ChemiKine™ Brain Derived Neurotrophic Factor (BDNF) Sandwich ELISA Kit, Millipore, USA, seguindo as instruções dos fabricantes. Os cérebros foram cortados com o auxílio de um atlas (Swanson, 1998), e *punches* do hipocampo, amígdala e substância cinzenta periaquedutal foram extraídos. Para a determinação de BDNF nessas estruturas, as amostras foram homogeneizadas com tampão de extração nuclear (10 mM HEPES, 10mM KCl, 0,1mM EDTA, 0,1mM EGTA, pH 7,9) adicionado de um inibidor de protease (100:1). Em seguida, acrescentou-se um detergente a 1% (Nonidet P40 1%) e o homogeneizado foi centrifugado a 6000 rpm por 10 minutos a 4°C. O sobrenadante foi retirado para a avaliação dos níveis de BDNF por ELISA (ChemiKine™ Brain Derived Neurotrophic Factor (BDNF) Sandwich ELISA Kit, Millipore, USA), como previamente descrito. Os resultados foram normalizados pela quantidade total de proteínas presente no sobrenadante, medida pelo método de BCA (Pierce® BCA Protein Assay Kit, Thermo Scientific, USA), seguindo as instruções do fabricante. Os valores de BDNF foram calculados como ng por mg de proteína.

Estudi Clínico:

Um total de 2457 adolescentes de uma amostra comunitária foi estudado. A descrição detalhada do estudo pode ser encontrada em (Salum *et al.*, 2011). De maneira simplificada, todos os sujeitos que foram classificados no quartil superior quando analisados pela escala *Screen for Children and Anxiety Related Emotional Disorders* (SCARED) (Isolan *et al.*, 2011) e amostras de 10% de cada um dos outros três quartis foram convidados para seguir

uma avaliação clínica mais extensa. Este estudo incluiu uma sub-amostra de 129 adolescentes que aceitaram completar todas as avaliações presentes no protocolo, incluindo genotipagem. O desenho da amostra foi escolhido de forma a garantir poder para investigar o efeito da ansiedade, assim como sintomas internalizantes e transtornos relacionados. O *Parental Bonding Instrument* (PBI) foi utilizado para avaliar o cuidado materno, superproteção e autoritarismo (Hauck *et al.*, 2006, Parker *et al.*, 1979, Seganfredo *et al.*, 2009). Amostras sanguíneas foram coletadas entre 7:00 e 10:00 h após jejum de 10-12 h, centrifugadas por 5 minutos a 4.500 rpm e amostras do soro foram armazenadas a -80C até as análises. Todas as análises dos níveis de BDNF foram realizadas no mesmo dia utilizando um kit comercial sanduíche para ELISA (R&D Systems, Minneapolis, Minnesota), seguindo as instruções do fabricante. O DNA foi extraído de amostras de saliva utilizando o kit comercial DNA 2006 Oragene® Kit (Laboratory Protocol for Manual Purification of DNA from 4,0mL of Oragene® DNA saliva). A genotipagem para o polimorfismo Val66Met do BDNF foi baseada na técnica descrita por (Ribases *et al.*, 2004), que divide os indivíduos em portador de Met ou não portador de Met. Aprovação ética foi obtida no Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital de Clínicas de Porto Alegre (GPPG/HCPA, número do projeto 08-017).

Análises estatísticas

No estudo experimental, para comparar os grupos experimentais com relação a uma variável quantitativa foram utilizados os testes: ANOVA de uma via, utilizando como fator o grupo (cuidado materno); ANOVA de duas vias, utilizando como fatores o grupo e o sexo (teste do campo aberto, teste do labirinto em cruz elevado, gordura abdominal e níveis de BDNF); ANOVA de medidas repetidas, utilizando como fatores o grupo e o sexo (peso corporal e consumo de ração padrão). Nos casos em que foi encontrado efeito do tamanho da ninhada, essa variável foi utilizada como co-variável (cuidado materno, peso corporal,

consumo de ração padrão e gordura abdominal). Para comparar os grupos experimentais com relação a realização ou não do comportamento de *Grooming* durante o teste de campo aberto foi utilizado o teste do Qui-Quadrado. Para correlação entre o cuidado materno e os níveis de BDNF utilizou-se a correlação de Pearson. O tamanho da amostra variou conforme o experimento, sendo apresentado individualmente na seção Resultados.

No estudo clínico, A correlação de Pearson foi utilizada para correlacionar os domínios do PBI (cuidado “caloroso”, autoritarismo e superproteção) com os diferentes escores do SCARED (ansiedade de separação, transtorno de pânico, fobia social, transtorno de ansiedade generalizada e fobia escolar). Estudos em humanos encontraram que o polimorfismo Val66Met pode ser um importante moderador da associação entre estresse precoce e níveis séricos de BDNF (Elzinga *et al.*, 2011). Portanto, os dados foram divididos de acordo com a presença ou não do polimorfismo Val66Met do BDNF para investigação da existência de correlação entre os escores do PBI e os níveis de BDNF através da correlação de Pearson.

Os dados foram analisados no programa SPSS versão 18.0 (SPSS Inc., IBM Company, Chicago, EUA). Em todas as análises foi considerado o nível de significância de 5%.

RESULTADOS

Estudo Experimental:

Comportamento materno

A média do LG foi semelhante entre o grupo controle e o grupo intervenção, no entanto, o desvio padrão do LG foi 2,7 vezes menor no grupo intervenção. O percentual de

tempo que as genitoras do grupo intervenção amamentaram seus filhotes foi maior, porém encontrou-se um maior tempo de amamentação nas posições consideradas menos eficientes (1 e 2) [F(1,14)=16,67, p=0,001]. O percentual de tempo que as genitoras do grupo intervenção ficaram fora do ninho foi menor [F(1,14)=10,57, p=0,006], porém observou-se que essas genitoras estiveram mais tempo no ninho sem amamentar e sem lambe seus filhotes, demonstrando um maior tempo de contato sem cuidado [F(1,14)=5,30, p=0,037] (Tabela 1).

Peso corporal, consumo de ração e gordura abdominal

A ANOVA de medidas repetidas, utilizando grupo e sexo como fatores e o tamanho da ninhada como co-variável, mostrou efeito do tempo no peso corporal [F (7,630)=652,63, p<0,0001] e consumo de ração padrão [F (4,136)=50,54, p<0,0001], assim como efeito do sexo em ambas variáveis [peso corporal - F(1,90)=305,91, p<0,0001 / consumo de ração - F(1,34)=144,27, p<0,0001]. Também um efeito do tamanho da ninhada foi observado no peso corporal [F(1,90)=47,49, p<0,0001] e no consumo de ração [F(1,34)=16,44, p<0,0001], no qual filhotes provenientes de ninhadas maiores pesaram menos e consumiram menos ração. Além disso, houve efeito do grupo [F(1,34)=11,22, p=0,002] no consumo de ração padrão, mostrando que os animais do grupo intervenção consumiram menos ração que os controles, mas este efeito não foi observado no peso corporal [F(1,90)=3,30, p=0,073] (Figura 1).

A análise da gordura abdominal como percentual do peso corporal, por ANOVA de duas vias, utilizando grupo e sexo como fatores e o tamanho da ninhada como co-variável, mostrou um efeito do tamanho da ninhada no total de gordura abdominal [F(1,56)=12,13, p=0,001], sendo menor o percentual de gordura abdominal nos animais provenientes de ninhadas maiores. No entanto, o percentual de gordura abdominal total nos machos controle (2,19±0,74), machos intervenção (1,89±0,41), fêmeas controle (1,91±0,54) e fêmeas intervenção (1,90±0,64), não diferiu.

Testes comportamentais

Teste do campo aberto

Analisando as variáveis do teste do campo aberto por ANOVA de duas vias, utilizando grupo e sexo como fatores, não foram observadas diferenças entre os grupos no tempo de permanência nos quadrantes centrais [$F(1,55)=0,90$, $p=0,346$], no número de cruzamentos [$F(1,55)=1,26$, $p=0,267$], na frequência de *rearing* [$F(1,55)=0,64$, $p=0,428$] e na frequência de *grooming* ($p=0,206$) (dados não apresentados).

Teste do labirinto em cruz elevado

A ANOVA de duas vias, utilizando como fatores o grupo e o sexo, mostrou interação entre o grupo e o sexo nas variáveis tempo de permanência nos braços abertos [$F(1,57)=5,75$, $p=0,020$], frequência de entrada nos braços abertos [$F(1,57)=4,02$, $p=0,050$] e tempo de permanência nos braços fechados [$F(1,57)=10,61$, $p=0,002$], revelando um maior comportamento do tipo ansioso nos machos do grupo intervenção que permaneceram menos tempo e entraram menos vezes nos braços abertos. A análise da frequência de entrada nos braços fechados não demonstrou efeitos isolados, nem interação entre as variáveis. Observou-se efeito do grupo ao avaliar a frequência de mergulhos [$F(1,57)=7,94$, $p=0,007$], mostrando que o grupo intervenção realizou menos mergulhos nos braços abertos (Tabela 2).

Fator neurotrófico derivado do encéfalo (BDNF)

Ao avaliar os níveis de BDNF plasmáticos, através da ANOVA de duas vias, utilizando como fatores o sexo e o grupo, observou-se que a intervenção esteve associada com maiores níveis de BDNF [$F(1,22)=4,79$, $p=0,040$]. Não houve efeito do sexo, nem interação (Figura 2).

Pretendendo investigar a associação entre o contato de baixa qualidade (contato puro) e o BDNF periférico, foi encontrada uma correlação positiva entre o contato puro e os níveis plasmáticos de BDNF ($r=0,512$; $p=0,008$), mostrando que quanto maior o contato puro no período neonatal, maiores os níveis de BDNF plasmáticos na vida adulta.

Ao analisar a quantidade de BDNF nas estruturas cerebrais, encontrou-se efeito do sexo no hipocampo [$F(1,15)=9,52$, $p=0,008$] e substância cinzenta periaquedutal [$F(1,21)=22,5$, $p<0,001$], sendo os níveis de BDNF maiores, nessas estruturas, nos machos. Não houve outros efeitos ou interações entre as variáveis conforme apresentado na tabela 3.

Estudo clínico:

A amostra foi composta por 89 meninas e 40 meninos, mas não houve diferença na média do escore do SCARED entre os sexos (média \pm SD – meninos: $32,49\pm 11,00$ e meninas: $33,27\pm 12,12$, $p=0,732$).

Observaram-se correlações negativas entre o cuidado materno “caloroso” (*maternal warmth*), descrito no PBI, e os escores do SCARED para ansiedade de separação ($r=-0,222$; $p=0,012$), fobia social ($r=-0,200$; $p=0,023$) e fobia escolar ($r=-0,221$; $p=0,012$), mostrando que quanto menor o cuidado materno, reportado no PBI, maior foi o relato de alguns sintomas ansiosos avaliados pelo SCARED. Não houve correlações entre o cuidado materno (*maternal warmth*) e a ansiedade generalizada ($p=0,479$) ou sintomas de pânico ($p=0,575$). Além disso, não foram encontradas outras correlações entre as medidas de cuidado materno do PBI (superproteção e autoritarismo) e os sintomas ansiosos avaliados pelo SCARED (dados não apresentados).

Dividindo a análise estatística pela presença ou não do polimorfismo Val66Met do BDNF, encontrou-se uma correlação positiva entre o escore de superproteção materna do PBI (um indicativo de menor qualidade de interação mãe-filho) e os níveis séricos de BDNF

($r=0,417$, $p=0,022$), apenas nos indivíduos portadores do alelo Met (Val/Met e Met/Met). Esta associação não foi observada entre os indivíduos não portadores do alelo Met ($r=0,039$, $p=0,765$) (ver figura 3).

DISCUSSÃO

Neste estudo foi mostrado, nos animais, que uma intervenção neonatal que altera a relação entre a genitora e seus filhotes está associada com ansiedade e aumento do BDNF periférico na vida adulta. Além disso, o grau de cuidado de baixa qualidade demonstrado pela genitora se correlacionou positivamente com os níveis plasmáticos de BDNF da prole quando adulta. De maneira interessante, associações similares foram encontradas na nossa coorte de escolares, especialmente nos portadores do alelo Met.

Em relação ao cuidado materno, foi observado que o grupo controle apresentou uma distribuição normal no escore do LG conforme já descrito (Champagne *et al.*, 2003), que se correlaciona com a resposta ao estresse na vida adulta (Liu *et al.*, 1997). Por outro lado, a intervenção parece ter afetado a variabilidade do escore do LG e, também, esteve associada com maior tempo de amamentação em dorso arqueado nas posições baixas, que são menos eficientes para a ejeção de leite (Lonstein *et al.*, 1998). A intervenção também levou a um maior contato puro (sem amamentar ou LG) com os filhotes, sugerindo uma menor qualidade de cuidado materno provido por essas genitoras.

Destaca-se que a intervenção esteve associada com o desenvolvimento de ansiedade na vida adulta dos animais. Semelhantemente, no estudo clínico descrito aqui, baixos escores de cuidado materno avaliado pelo PBI estiveram associados com maiores níveis de alguns sintomas ansiosos avaliados pela SCARED, similar ao que originalmente foi descrito por Parker (1979) e outros (Enns *et al.*, 2002). Um estudo recente que utilizou o PBI também mostra que, enquanto os grupos de baixo e alto cuidado materno apresentam respostas

igualmente reduzidas ao estresse agudo, há maiores escores nas avaliações para depressão e ansiedade no grupo de baixo cuidado materno (Engert *et al.*, 2010).

Além disso, Parker também propõem que a superproteção materna está associada com baixo assim como alto cuidado materno (Parker & Lipscombe, 1981), o que parece estar em congruência com nossos achados. O maior tempo gasto em contato puro, observado no grupo intervenção, pode ser interpretado como um comportamento materno focado no controle das necessidades físicas do ninho (por exemplo manutenção da temperatura) (Sokoloff & Blumberg, 1997, Stern & Johnson, 1990), ao invés de realmente cuidado para com os filhotes. Observou-se que este comportamento se correlacionou com o BDNF periférico na vida adulta, assim como o escore de superproteção materna nos humanos portadores do alelo Met. Então, um cuidado materno controlador parece estar associado com o desenvolvimento de ansiedade e um aumento periférico de BDNF na vida adulta.

Similar ao descrito neste trabalho, um estudo recente mostra que um baixo escore de cuidado materno avaliado pelo PBI se correlaciona com aumento de evitação de dano e diminuição de auto-direcionamento em adultos saudáveis, e para ambos os traços de personalidade o coeficiente de correlação é maior nos indivíduos com genótipo Met/Met, sugerindo que o polimorfismo Val66Met do BDNF modula os efeitos do cuidado parental nestes traços de personalidade (Suzuki *et al.*, 2011). Outros mostram que indivíduos portadores do alelo Met do BDNF que foram expostos ao estresse no início da vida apresentam neuroticismo elevado e maior ansiedade, assim como menor volume do hipocampo e da amígdala (Gatt *et al.*, 2009). Portanto, como reportado no presente trabalho, o efeito da superproteção materna sobre os níveis periféricos de BDNF foi evidente apenas nos portadores do alelo Met, estando de acordo com a literatura que sugere uma maior vulnerabilidade às influências ambientais nos portadores deste alelo do polimorfismo Val66Met (Colzato *et al.*, 2011). Da mesma forma, em roedores, foi demonstrado que uma

mutação nula no gene do BDNF modera os efeitos do cuidado materno sobre o comportamento do tipo ansioso (Carola & Gross, 2010), enfatizando o papel desta neurotrofina no desenvolvimento de ansiedade na vida adulta.

O polimorfismo Val66Met do gene do BDNF está associado com uma alteração funcional, na qual há diminuição no transporte intracelular e na secreção atividade-dependente do BDNF (Egan *et al.*, 2003). É possível que o maior nível periférico de BDNF observado nestes indivíduos, em resposta à adversidade no início da vida, seja uma forma de compensar um déficit funcional do sistema, já que o BDNF é uma proteína chave para a manutenção da integridade neuronal. Em modelos animais, no entanto, alguns estudos depreendem que infusões intra-hipocâmpais de BDNF induzem a um comportamento ansiogênico (Deltheil *et al.*, 2009). De maneira interessante, no nosso modelo, a intervenção esteve associada com ansiedade no teste clássico do labirinto em cruz elevado e não houve diferenças na quantidade de BDNF central (hipocampo, amígdala e substância cinzenta periaquedutal), no entanto não podemos excluir a possibilidade de um funcionamento alterado a nível de receptor em nosso modelo. Outros estudos com animais têm demonstrado que os maus-tratos no início da vida produzem alterações epigenéticas persistentes no DNA do BDNF, alterando a expressão do gene no córtex pré-frontal (Roth *et al.*, 2009). Além disso, a deleção do TrkB nos neurônios de camundongos recém-nascidos resulta em maior comportamento do tipo ansioso na vida adulta (Bergami *et al.*, 2008), assim como um comportamento do tipo ansioso atenuado é observado em camundongos que tem superexpressão (*overexpressing*) deste receptor (Koponen *et al.*, 2004).

De qualquer forma, ambas as abordagens experimental e clínica, evidenciaram que um trauma no início da vida, capaz de alterar o cuidado materno, esteve associado a maiores níveis periféricos de BDNF. Isto pode ser uma resposta adaptativa associada à exposição a um estressor agudo em um período da vida de maior vulnerabilidade (Bücker *et al.*, 2010, Grassi-

Oliveira *et al.*, 2008a, Hauck *et al.*, 2010), alterando de forma persistente a produção de BDNF. É possível que, com o passar dos anos e/ou com a exposição a outras situações de estresse ou doença, estes indivíduos apresentem mais facilmente um esgotamento de recursos ou uma menor capacidade biológica de resposta aos insultos. Assim, faria sentido o que classicamente está relatado na literatura em relação aos menores níveis periféricos de BDNF observados em diferentes psicopatologias como depressão maior (Grassi-Oliveira *et al.*, 2008b) e transtorno bipolar (Kauer-Sant'anna *et al.*, 2007) quando associadas ao trauma no início da vida.

Este artigo acrescenta a literatura ao apontar a relação entre ambiente no início da vida e alterações biológicas relacionadas à saúde mental, além de ser a primeira abordagem translacional que considerou o impacto da adversidade no início da vida na ansiedade e nos níveis periféricos de BDNF. Nós reconhecemos isso como um ponto forte, assim como a consistência do modelo animal (as diferentes coortes realizadas foram estatisticamente comparáveis nos diversos componentes do comportamento materno). Também, tivemos o cuidado de considerar o ciclo estral das fêmeas antes da realização do teste do labirinto em cruz elevado, visto que está documentado na literatura que alterações hormonais podem interferir no comportamento do tipo ansioso (Marcondes *et al.*, 2001). Apesar disso, este estudo também tem algumas limitações. Por exemplo, as correlações observadas entre o cuidado materno e os sintomas ansiosos nos humanos foram significativas, porém modestas. Mesmo assim, elas estão de acordo com as correlações observadas no modelo animal. Também, a escala SCARED é uma ferramenta de *screening*, não de diagnóstico para ansiedade, e não foi possível considerar confundidores nas análises dos humanos devido ao pequeno tamanho da amostra, que foi composta por mais meninas, porém sem diferença no escore do SCARED entre os sexos. Apesar das limitações, ainda foi possível encontrar semelhanças entre as duas espécies, o que reforça a validade deste estudo. É importante

ressaltar que nós ainda estamos distantes de compreender as especificidades e complexidades do comportamento do tipo ansioso e certamente uma completa superposição entre as espécies não era esperada *a priori*. Por outro lado, correlações semelhantes com medidas similares proporcionaram que os experimentos fossem testados em questões de pesquisa clínica.

Concluindo, nosso estudo contribui com a literatura mostrando que um trauma no início da vida, que impacta na relação mãe-filhote, está associado com ansiedade e maiores níveis de BDNF periféricos na vida adulta, em ambas abordagens experimental e clínica. De acordo com os achados relatados neste estudo, uma terapia de sucesso para o transtorno de ansiedade generalizada em humanos aumenta as concentrações séricas de NGF (Jockers-Scherubl *et al.*, 2007), sugerindo que os níveis periféricos das neurotrofinas podem servir como biomarcadores para os transtornos afetivos. Portanto, devido à possibilidade da abordagem translacional observada neste trabalho, o modelo animal proposto mostra-se útil na investigação de outros mecanismos que expliquem a associação entre a adversidade no início da vida, mediada pelo cuidado materno, e o desenvolvimento de psicopatologias na vida adulta.

REFERÊNCIAS

Balon, R. (2006) Mood, anxiety, and physical illness: body and mind, or mind and body? *Depress Anxiety*, **23**, 377-387.

Bergami, M., Rimondini, R., Santi, S., Blum, R., Gotz, M. & Canossa, M. (2008) Deletion of TrkB in adult progenitors alters newborn neuron integration into hippocampal circuits and increases anxiety-like behavior. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **105**, 15570-15575.

Bücker, J., Kapczinski, F., Kapczinski, N.S., Cereser, K.M., Post, R., Szobot, C., Pfaffenseller, B., Magalhães, P. & Kauer-Santanna, M. (2010) Aumento dos níveis de fator neurotrófico derivado do cérebro e psicopatologia em crianças com trauma quando comparadas a controles. *XXVIII Congresso Brasileiro de Psiquiatria*. Revista Brasileira de Psiquiatria, Fortaleza, p. S61.

Carola, V. & Gross, C. (2010) BDNF moderates early environmental risk factors for anxiety in mouse. *Genes Brain Behav*, **9**, 379-389.

- Champagne, F.A., Francis, D.D., Mar, A. & Meaney, M.J. (2003) Variations in maternal care in the rat as a mediating influence for the effects of environment on development. *Physiol Behav*, **79**, 359-371.
- Chen, Z.Y., Jing, D., Bath, K.G., Ieraci, A., Khan, T., Siao, C.J., Herrera, D.G., Toth, M., Yang, C., McEwen, B.S., Hempstead, B.L. & Lee, F.S. (2006) Genetic variant BDNF (Val66Met) polymorphism alters anxiety-related behavior. *Science*, **314**, 140-143.
- Colzato, L.S., Van der Does, A.J., Kouwenhoven, C., Elzinga, B.M. & Hommel, B. (2011) BDNF Val(66)Met polymorphism is associated with higher anticipatory cortisol stress response, anxiety, and alcohol consumption in healthy adults. *Psychoneuroendocrinology*.
- Deltheil, T., Tanaka, K., Reperant, C., Hen, R., David, D.J. & Gardier, A.M. (2009) Synergistic neurochemical and behavioural effects of acute intrahippocampal injection of brain-derived neurotrophic factor and antidepressants in adult mice. *Int J Neuropsychopharmacol*, **12**, 905-915.
- Egan, M.F., Kojima, M., Callicott, J.H., Goldberg, T.E., Kolachana, B.S., Bertolino, A., Zaitsev, E., Gold, B., Goldman, D., Dean, M., Lu, B. & Weinberger, D.R. (2003) The BDNF val66met polymorphism affects activity-dependent secretion of BDNF and human memory and hippocampal function. *Cell*, **112**, 257-269.
- Elzinga, B.M., Molendijk, M.L., Oude Voshaar, R.C., Bus, B.A., Prickaerts, J., Spinhoven, P. & Penninx, B.J. (2011) The impact of childhood abuse and recent stress on serum brain-derived neurotrophic factor and the moderating role of BDNF Val66Met. *Psychopharmacology (Berl)*, **214**, 319-328.
- Engert, V., Efanov, S.I., Dedovic, K., Duchesne, A., Dagher, A. & Pruessner, J.C. (2010) Perceived early-life maternal care and the cortisol response to repeated psychosocial stress. *J Psychiatry Neurosci*, **35**, 370-377.
- Enns, M.W., Cox, B.J. & Clara, I. (2002) Parental bonding and adult psychopathology: results from the US National Comorbidity Survey. *Psychol Med*, **32**, 997-1008.
- Gatt, J.M., Nemeroff, C.B., Dobson-Stone, C., Paul, R.H., Bryant, R.A., Schofield, P.R., Gordon, E., Kemp, A.H. & Williams, L.M. (2009) Interactions between BDNF Val66Met polymorphism and early life stress predict brain and arousal pathways to syndromal depression and anxiety. *Mol Psychiatry*, **14**, 681-695.
- Grassi-Oliveira, R., Ashy, M. & Stein, L.M. (2008a) Psychobiology of childhood maltreatment: effects of allostatic load? *Rev Bras Psiquiatr*, **30**, 60-68.
- Grassi-Oliveira, R., Stein, L.M., Lopes, R.P., Teixeira, A.L. & Bauer, M.E. (2008b) Low plasma brain-derived neurotrophic factor and childhood physical neglect are associated with verbal memory impairment in major depression--a preliminary report. *Biol Psychiatry*, **64**, 281-285.
- Hashimoto, K., Shimizu, E. & Iyo, M. (2004) Critical role of brain-derived neurotrophic factor in mood disorders. *Brain Res Brain Res Rev*, **45**, 104-114.
- Hauck, S., Kapczinski, F., Roesler, R., de Moura Silveira, E., Jr., Magalhaes, P.V., Kruehl, L.R., Schestatsky, S.S. & Ceitlin, L.H. (2010) Serum brain-derived neurotrophic factor in

patients with trauma psychopathology. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*, **34**, 459-462.

Hauck, S., Schestatsky, S., Terra, L., Knijnik, L., Sanchez, P. & Ceitlin, L. (2006) Adaptação transcultural para o português brasileiro do Parental Bonding Instrument (PBI). *Rev Psiquiatr*, **28**, 162-168.

Horesh, N., Amir, M., Kedem, P., Goldberger, Y. & Kotler, M. (1997) Life events in childhood, adolescence and adulthood and the relationship to panic disorder. *Acta Psychiatr Scand*, **96**, 373-378.

Isolan, L., Salum, G.A., Osowski, A.T., Amaro, E. & Manfro, G.G. (2011) Psychometric properties of the Screen for Child Anxiety Related Emotional Disorders (SCARED) in Brazilian children and adolescents. *J Anxiety Disord*, **25**, 741-748.

Ivy, A.S., Brunson, K.L., Sandman, C. & Baram, T.Z. (2008) Dysfunctional nurturing behavior in rat dams with limited access to nesting material: a clinically relevant model for early-life stress. *Neuroscience*, **154**, 1132-1142.

Jockers-Scherubl, M.C., Zubraegel, D., Baer, T., Linden, M., Danker-Hopfe, H., Schulte-Herbruggen, O., Neu, P. & Hellweg, R. (2007) Nerve growth factor serum concentrations rise after successful cognitive-behavioural therapy of generalized anxiety disorder. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*, **31**, 200-204.

Kandel, E.R. (1999) Biology and the future of psychoanalysis: a new intellectual framework for psychiatry revisited. *Am J Psychiatry*, **156**, 505-524.

Kauer-Sant'Anna, M., Tramontina, J., Andreatza, A.C., Cereser, K., da Costa, S., Santin, A., Yatham, L.N. & Kapczinski, F. (2007) Traumatic life events in bipolar disorder: impact on BDNF levels and psychopathology. *Bipolar Disord*, **9 Suppl 1**, 128-135.

Koponen, E., Voikar, V., Riekk, R., Saarelainen, T., Rauramaa, T., Rauvala, H., Taira, T. & Castren, E. (2004) Transgenic mice overexpressing the full-length neurotrophin receptor trkB exhibit increased activation of the trkB-PLCgamma pathway, reduced anxiety, and facilitated learning. *Mol Cell Neurosci*, **26**, 166-181.

Liu, D., Diorio, J., Tannenbaum, B., Caldji, C., Francis, D., Freedman, A., Sharma, S., Pearson, D., Plotsky, P.M. & Meaney, M.J. (1997) Maternal care, hippocampal glucocorticoid receptors, and hypothalamic-pituitary-adrenal responses to stress. *Science*, **277**, 1659-1662.

Lonstein, J.S., Simmons, D.A. & Stern, J.M. (1998) Functions of the caudal periaqueductal gray in lactating rats: kyphosis, lordosis, maternal aggression, and fearfulness. *Behav Neurosci*, **112**, 1502-1518.

Lyons, W.E., Mamounas, L.A., Ricaurte, G.A., Coppola, V., Reid, S.W., Bora, S.H., Wihler, C., Koliatsos, V.E. & Tessarollo, L. (1999) Brain-derived neurotrophic factor-deficient mice develop aggressiveness and hyperphagia in conjunction with brain serotonergic abnormalities. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **96**, 15239-15244.

Manfro, G.G., Otto, M.W., McArdle, E.T., Worthington, J.J., 3rd, Rosenbaum, J.F. & Pollack, M.H. (1996) Relationship of antecedent stressful life events to childhood and family history of anxiety and the course of panic disorder. *J Affect Disord*, **41**, 135-139.

- Marcondes, F.K., Miguel, K.J., Melo, L.L. & Spadari-Bratfisch, R.C. (2001) Estrous cycle influences the response of female rats in the elevated plus-maze test. *Physiol Behav*, **74**, 435-440.
- Parker, G. (1979) Reported parental characteristics in relation to trait depression and anxiety levels in a non-clinical group. *Aust N Z J Psychiatry*, **13**, 260-264.
- Parker, G. & Lipscombe, P. (1981) Influences of maternal overprotection. *Br J Psychiatry*, **138**, 303-311.
- Parker, G., Tupling, H. & Brown, L. (1979) A Parental Bonding Instrument. *British Journal of Medical Psychology*, **52**, 1-10.
- Ribases, M., Gratacos, M., Fernandez-Aranda, F., Bellodi, L., Boni, C., Anderluh, M., Cavallini, M.C., Cellini, E., Di Bella, D., Erzegovesi, S., Foulon, C., Gabrovsek, M., Gorwood, P., Hebebrand, J., Hinney, A., Holliday, J., Hu, X., Karwautz, A., Kipman, A., Komel, R., Nacmias, B., Remschmidt, H., Ricca, V., Sorbi, S., Wagner, G., Treasure, J., Collier, D.A. & Estivill, X. (2004) Association of BDNF with anorexia, bulimia and age of onset of weight loss in six European populations. *Hum Mol Genet*, **13**, 1205-1212.
- Rice, C.J., Sandman, C.A., Lenjavi, M.R. & Baram, T.Z. (2008) A novel mouse model for acute and long-lasting consequences of early life stress. *Endocrinology*, **149**, 4892-4900.
- Roth, T.L., Lubin, F.D., Funk, A.J. & Sweatt, J.D. (2009) Lasting epigenetic influence of early-life adversity on the BDNF gene. *Biol Psychiatry*, **65**, 760-769.
- Rutter, M. (2006) Implications of resilience concepts for scientific understanding. *Ann N Y Acad Sci*, **1094**, 1-12.
- Salum, G.A., Isolan, L.R., Bosa, V.L., Tocchetto, A.G., Teche, S.P., Schuch, I., Costa, J.R., Costa Mde, A., Jarros, R.B., Mansur, M.A., Knijnik, D., Silva, E.A., Kieling, C., Oliveira, M.H., Medeiros, E., Bortoluzzi, A., Toazza, R., Blaya, C., Leistner-Segal, S., Salles, J.F., Silveira, P.P., Goldani, M.Z., Heldt, E. & Manfro, G.G. (2011) The multidimensional evaluation and treatment of anxiety in children and adolescents: rationale, design, methods and preliminary findings. *Rev Bras Psiquiatr*, **33**, 181-195.
- Seganfredo, A.C., Torres, M., Salum, G.A., Blaya, C., Acosta, J., Eizirik, C. & Manfro, G.G. (2009) Gender differences in the associations between childhood trauma and parental bonding in panic disorder. *Rev Bras Psiquiatr*, **31**, 314-321.
- Severino, G.S., Fossati, I.A., Padoin, M.J., Gomes, C.M., Trevizan, L., Sanvitto, G.L., Franci, C.R., Anselmo-Franci, J.A. & Lucion, A.B. (2004) Effects of neonatal handling on the behavior and prolactin stress response in male and female rats at various ages and estrous cycle phases of females. *Physiol Behav*, **81**, 489-498.
- Sokoloff, G. & Blumberg, M.S. (1997) Thermogenic, respiratory, and ultrasonic responses of week-old rats across the transition from moderate to extreme cold exposure. *Dev Psychobiol*, **30**, 181-194.
- Stern, J.M. & Johnson, S.K. (1990) Ventral somatosensory determinants of nursing behavior in Norway rats. I. Effects of variations in the quality and quantity of pup stimuli. *Physiol Behav*, **47**, 993-1011.

Suzuki, A., Matsumoto, Y., Shibuya, N., Sadahiro, R., Kamata, M., Goto, K. & Otani, K. (2011) The brain-derived neurotrophic factor Val66Met polymorphism modulates the effects of parental rearing on personality traits in healthy subjects. *Genes Brain Behav*, **10**, 385-391.

Swanson, L. (1998) *Brain maps: Structure of the rat brain.*, Elsevier.

Weaver, I.C. (2009) Shaping adult phenotypes through early life environments. *Birth Defects Res C Embryo Today*, **87**, 314-326.

AGRADECIMENTOS

Suporte financeiro do PRONEX 2009, FAPERGS/CNPq 10/0018.3, Projeto IVAPSA – Impacto das Variações do Ambiente Perinatal sobre a Saúde do Adulto; Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) – Brasil 14/2009; FINEP/HCPA e Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) - Brasil.

TABELAS

Tabela 1 – Comparação entre as médias das variáveis relacionadas com o cuidado materno.

Variáveis	Controle (n=8)	Intervenção (n=9)	valor <i>p</i>
LG	8,06±2,02	8,73±0,73	0,630
Fora do ninho	44,01±5,48	35,24±2,76	0,006*
Contato puro ^a	5,66±2,38	7,43±2,85	0,037*
Posição de amamentação 1 e 2	32,86±6,97	40,76±5,85	0,001*
Posição de amamentação 3 e 4	11,73±4,70	11,53±4,96	0,635

ANOVA de uma via; usando como co-variável o tamanho da ninhada; valores expressos em média ± DP; **p*<0,05

^a percentual do tempo em contato sem amamentar e sem lambe os filhotes, ou seja, contato de baixa qualidade

Tabela 2 – Variáveis analisadas no teste do labirinto em cruz elevado, conforme sexo e grupo.

Variável	Machos		Fêmeas	
	Controle (n=9)	Intervenção (n=19)	Controle (n=18)	Intervenção (n=15)
tempBA	116,1±39,08 ^a	74,5±30,93 ^b	89,5±41,73 ^a	92,4±26,59 ^a
tempBF	115,0±26,41 ^a	169,3±32,20 ^b	158,1±36,89 ^a	155,2±31,79 ^a
freqBA	6,2±2,68 ^a	4,6±2,14 ^b	5,5±2,17 ^a	6,5±2,53 ^a
freqBF	6,8±1,98	7,5±2,04	7,6±1,88	8,2±1,37
freqM	14,2±4,79 ^a	10,9±3,45 ^b	12,0±4,20 ^a	9,3±3,84 ^b

ANOVA de duas vias; valores expressos em média ± DP; ^{a,b}letras diferentes demonstram diferença estatística significativa (p<0,05).

tempBA: tempo de permanência no braço aberto (s); tempBF: tempo de permanência no braço fechado (s); freqBA: número de entradas no braço aberto; freqBF: número de entradas no braço fechado; freqM: frequência do comportamento de mergulhar

Tabela 3 – Quantidade de BDNF (ng/mg de proteína) no hipocampo (n=4-6), amígdala (n=5-7) e substância cinzenta periaquedutal (n=5-7), conforme sexo e grupo.

Estruturas	Machos		Fêmeas	
	Controle	Intervenção	Controle	Intervenção
HC	1,11±0,78 ^a	1,00±0,55 ^a	0,38±0,06 ^b	0,41±0,13 ^b
AMG	0,30±0,18	0,33±0,21	0,26±0,08	0,27±0,04
PAG	2,06±1,04 ^a	2,40±1,45 ^a	0,65±0,27 ^b	0,54±0,12 ^b

ANOVA de duas vias; valores expressos em média ± DP; ^{a,b}letras diferentes significam diferença estatística significativa (p<0,05).

C: hipocampo, AMG: amígdala, PAG: substância cinzenta periaquedutal.

LEGENDAS DAS FIGURAS

Figura 1 – (A) Peso corporal, ao longo de oito semanas de vida após o desmame, nos machos controle (n=16), machos intervenção (n=28), fêmeas controle (n=27) e fêmeas intervenção (n=24). Dados expressos em média \pm EP. ANOVA de medidas repetidas mostrou efeito do tempo ($p < 0,0001$) e do sexo ($p < 0,0001$). (B) Consumo de ração padrão, da 5^a a 9^a semana de vida, nos machos controle (n=7 caixas), machos intervenção (n=11 caixas), fêmeas controle (n=10 caixas) e fêmeas intervenção (n=11 caixas). Dados expressos em média \pm EP. ANOVA de medidas repetidas mostrou efeito do tempo ($p < 0,0001$), efeito do sexo ($p < 0,0001$) e efeito do grupo ($p = 0,002$).

Figura 2 – Níveis plasmáticos de BDNF nos machos controle (n=6), machos intervenção (n=7), fêmeas controle (n=7) e fêmeas intervenção (n=6). Dados expressos em média \pm EP. ANOVA de duas vias mostrou efeito do grupo ($p = 0,040$).

Figure 3 – Correlações entre o escore de superproteção do PBI e os níveis séricos de BDNF nos indivíduos portadores (n=30) e não portadores do alelo Met (n=62).

FIGURAS

